

Studio della variabilità intravarietale di cloni di Sangiovese per l'identificazione dei tratti epigenetici

Alessandra Zombardo^{1*}, Paolo Storchi¹, Gabriella De Lorenzis², Lucio Brancadoro²

¹ Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia, viale Santa Margherita 80, 52100, Arezzo

² Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, via G. Celoria 2, 20133, Milano

* Autore corrispondente: alessandra.zombardo@crea.gov.it.

1. Premessa

Le piante di vite (*Vitis vinifera* L.) sono propagate vegetativamente. Di conseguenza, il genoma di ogni cultivar viene preservato nel tempo, ad eccezione dell'accumulo di mutazioni che possono generare cloni fenotipicamente distinguibili, dando vita al fenomeno della variabilità intravarietale (Franks et al. 2002). Le mutazioni somatiche possono essere responsabili di fenotipi anche molto diversi. Ad esempio, la presenza o l'assenza del retrotrasposone Gret1 nel promotore del fattore di trascrizione *VvMybA1* è associata a differenze nel colore delle bacche dei cloni (Kobayashi et al. 2004), mentre la forma del grappolo, più o meno spargola, è legata alla presenza o assenza di un retrotrasposone, il *Hatvine1-rrm*, nel gene *VvTFL1A* (Fernandez et al. 2010). Le mutazioni somatiche che si trasmettono nel tempo attraverso la propagazione vegetativa sono quelle a carico delle cellule del meristema apicale del germoglio.

I principali approcci usati per studiare le variabilità intravarietale si basano sia su strategie chimiche sia su strategie genetiche. Ad esempio, la concentrazione degli antociani è stata utilizzata per discriminare cloni di Barbera (Ferrandino e Guidoni 2010), Sangiovese (Rustioni et al. 2013), i flavonoli sono stati utilizzati per discriminare i cloni Barbera (Ferrandino e Guidoni 2010) e Cabernet Sauvignon (Burin et al. 2011), mentre i composti volatili per discriminare i cloni di Chardonnay (Duchêne et al. 2009) e Moscato di Alessandria (De Lorenzis et al. 2016). Tra le strategie genetiche, si annoverano i marcatori molecolari come gli SSR (Simple Sequence Repeat), utilizzati per discriminare i cloni di Chardonnay (Riaz et al. 2002), o gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism), utilizzati per discriminare i cloni delle principali cultivar siciliane (Mercati et al.



2016). Tuttavia, ad oggi siamo ancora ben lontani dal comprendere a pieno le basi genetiche della variabilità intravarietale, sebbene dei passi in avanti siano stati fatti grazie all'ausilio delle tecniche di sequenziamento dell'intero genoma. Utilizzando l'approccio genomico, Carrier et al. (2012) hanno scoperto che la maggiore variabilità tra i cloni di Pinot è a carico degli elementi trasponibili. Il sequenziamento di 15 cloni di Zinfandel ha evidenziato che le mutazioni eterozigoti erano più frequenti negli spazi intergenici e nelle regioni introniche (le regioni non codificanti di un gene) (Vondras et al. 2019).

Se gli studi basati su approcci di sequenziamento dell'intero genoma sono scarsi, lo sono ancora di più quelli che studiano i cambiamenti epigenetici. I fenomeni epigenetici sono in grado di modificare l'espressione genica senza determinare cambiamenti nella sequenza del DNA e di trasmettersi alle generazioni successive (Haig, 2004). La metilazione del DNA è una delle principali modificazioni epigenetiche coinvolta nel silenziamento genico, ad esempio fattori di trascrizione metilati non vengono trascritti. Numerose sono le evidenze scientifiche che mettono in relazione i cambiamenti epigenetici con la risposta delle piante agli stress biotici ed abiotici. Considerato che la metilazione del DNA rappresenta un meccanismo fondamentale di modulazione dell'espressione genica (Richards 2006), le piante spesso la utilizzano come strategia di adattamento e di risposta a condizioni di stress attraverso regolazioni epigenetiche (Steward *et al.*, 2002). Recentemente, lo studio dei cambiamenti epigenetici è stato utilizzato con successo anche nella definizione del terroir (Xie et al. 2017). Viste le scarse informazioni a riguardo, la Fondazione Banfi ha finanziato un progetto di ricerca biennale che mira all'identificazione dei cambiamenti epigenetici alla base della variabilità intravarietale della cultivar Sangiovese, uno dei più importanti vitigni italiani che ha fatto la storia della viticoltura toscana. A questo scopo, i ricercatori del Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia del Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA-VE) di Arezzo e del Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali dell'Università degli Studi di Milano, ha selezionato sei cloni di Sangiovese provenienti da ambienti distinti, quali Montalcino (cloni TIN 10, VCR 5, VCR 6) e Romagna (cloni VCR 23, FEDIT 30, T 14), aventi marcate differenze fenotipiche a livello di bacca per i caratteri legati alla qualità dell'uva. Il progetto di ricerca prevede una dettagliata caratterizzazione fenotipica delle uve dei sei cloni di Sangiovese in due annate produttive (2019 e 2020) e lo studio globale dei cambiamenti epigenetici nella bacca in tutto il genoma (epigenomica), attraverso le tecniche di sequenziamento ad alta processività (NGS: Next Generation Sequencing), al fine di associare i cambiamenti epigenetici alle differenze

fenotipiche. In questo lavoro saranno presentati i dati preliminari della caratterizzazione fenotipica a livello di bacca dei sei cloni di Sangiovese.

2. Materiale e metodi

2.1 Materiale vegetale e piano sperimentale

L'analisi è stata condotta su sei cloni della varietà Sangiovese, raggruppabili in due distinti gruppi secondo l'origine geografica (Tabella 1). Cinque cloni sono inseriti nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite a cui è stato assegnato un codice di assegnazione ufficiale, mentre uno è un biotipo, selezionato da Università di Bologna, ma non ufficialmente iscritto al Registro. I sei cloni di Sangiovese sono stati scelti secondo alcune marcate differenze fenotipiche a livello di bacca e grappolo, nonché secondo caratteri legati alla qualità delle uve, al fine di identificare i cambiamenti epigenetici alla base della variabilità intravarietale, tipica di tale cultivar.

Tabella 1. Lista dei cloni della varietà Sangiovese analizzati in questo progetto.

Clone Sangiovese	Provenienza	Codice di assegnazione del Registro Nazionale delle Varietà di Vite
VCR 6	Montalcino (Siena, Toscana)	021
TIN 10	Montalcino (Siena, Toscana)	030
VCR 5	Montalcino (Siena, Toscana)	020
T 14	Romagna	-
FEDIT 30	Romagna	053
VCR 23	Romagna	027

I cloni in studio sono coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo e fanno parte della collezione ampelografica. Il vigneto è ubicato a 250 m s.l.m. in un appezzamento con giacitura pianeggiante ed orientamento dei filari nord-sud. Il terreno ha tessitura franco-limoso, la gestione dell'interfila è con inerbimento naturale, lavorato a file alterne. La gestione fitoiatrica è convenzionale, con trattamenti fungicidi a calendario. Le viti presenti, dell'età di circa 20 anni, sono allevate a controspalliera con potatura a cordone speronato con carica media di 10 gemme per pianta. Il portinnesto comune utilizzato è l'SO4. Nel vigneto non è presente irrigazione.

I campionamenti di bacche sono stati effettuati nelle stagioni produttive 2019 e 2020, prelevando tre repliche biologiche di 100 acini, in tre diverse fasi fenologiche, comprese nella curva di maturazione delle uve: fine invaiatura, metà maturazione, vendemmia (Tabella 2).

Tabella 2. Campionamenti effettuati sulle bacche di sei cloni di Sangiovese nelle annate 2019 e 2020.

Fasi fenologiche	Data di prelievo	
	2019	2020
Fine invaiatura	19 agosto	4 agosto
Metà maturazione	10 settembre	31 agosto
Vendemmia	1 ottobre	18 settembre

2.2 Rilevazioni meteorologiche

Nel periodo 1 aprile - 31 ottobre delle due annate (2019 e 2020) comprese nello studio sono stati rilevati i seguenti dati meteorologici: i) precipitazioni, ii) temperature e iii) Growing Degree Days (GDD), vale a dire le somme termiche calcolate su una temperatura base di 10 °C (Winkler et al., 1974). I dati sono stati rilevati utilizzando una stazione meteo posta nelle immediate vicinanze del vigneto.

2.3 Caratterizzazione fenotipica delle uve

Ad ogni campionamento, gli acini sono stati analizzati a livello fenotipico per valutare peso medio dell'acino (PMA) e stadio di maturazione tecnologica e fenolica delle uve. PMA è stato misurato utilizzando una bilancia tecnica da banco. Le misurazioni sono state fatte su 100 acini.

Per ciascuna delle tre fasi fenologiche, sui campioni di acini raccolti in triplicato sono state effettuate le analisi tecnologiche sul mosto, seguendo i protocolli ufficiali (O.I.V., 2018). In particolare, è stato determinato il contenuto di zuccheri (in °Brix), il pH e l'acidità totale (in g/L di acido tartarico).

La maturità fenolica delle uve è stata valutata utilizzando il metodo Glories (Glories, 1993; Saint-Criq e Glories, 1998). In particolare, le uve sono state processate e, in seguito a valutazione spettrofotometrica con specifiche lunghezze d'onda, sono stati ricavati i seguenti indici: antociani totali (mg/Kg di uva), antociani estraibili (mg/Kg di uva), ricchezza fenolica tecnologica (D.O. 280 nm), estraibilità degli antociani (%) e maturità dei vinaccioli (%).

2.4 Analisi dei dati

Tutti i dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente (one-way ANOVA), utilizzando il software Statgraphics (Statgraphics Technologies Inc., USA). Per il campionamento di vendemmia, i valori

statisticamente significativi sono stati sottoposti al test post-hoc di Duncan, utilizzando il software Statgraphics.

3. Risultati

3.1 Andamento meteorologico

Nelle Figure 1 e Figura 2 sono illustrati i grafici relativi alle condizioni meteorologiche nelle due annate (2019 e 2020) comprese nello studio, nel periodo 1 aprile - 31 ottobre.

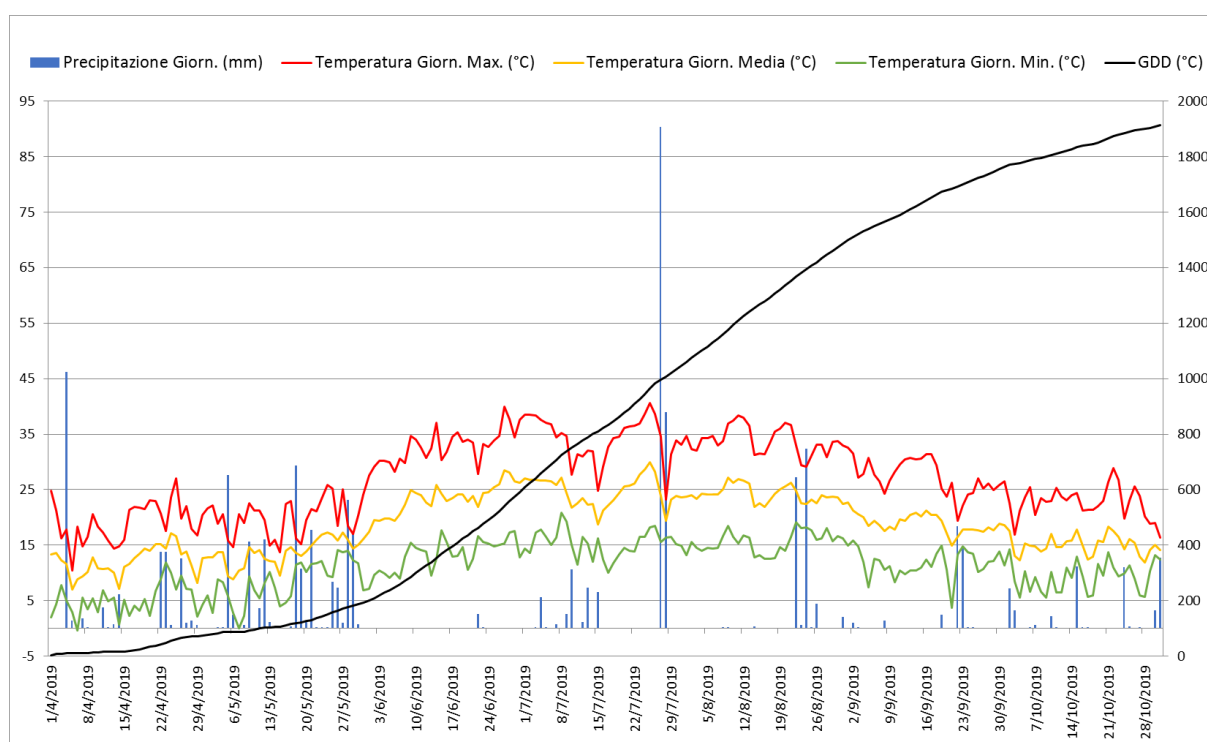


Figura 1. Dati meteorologici nel periodo 1 aprile - 31 ottobre 2019 presso il vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

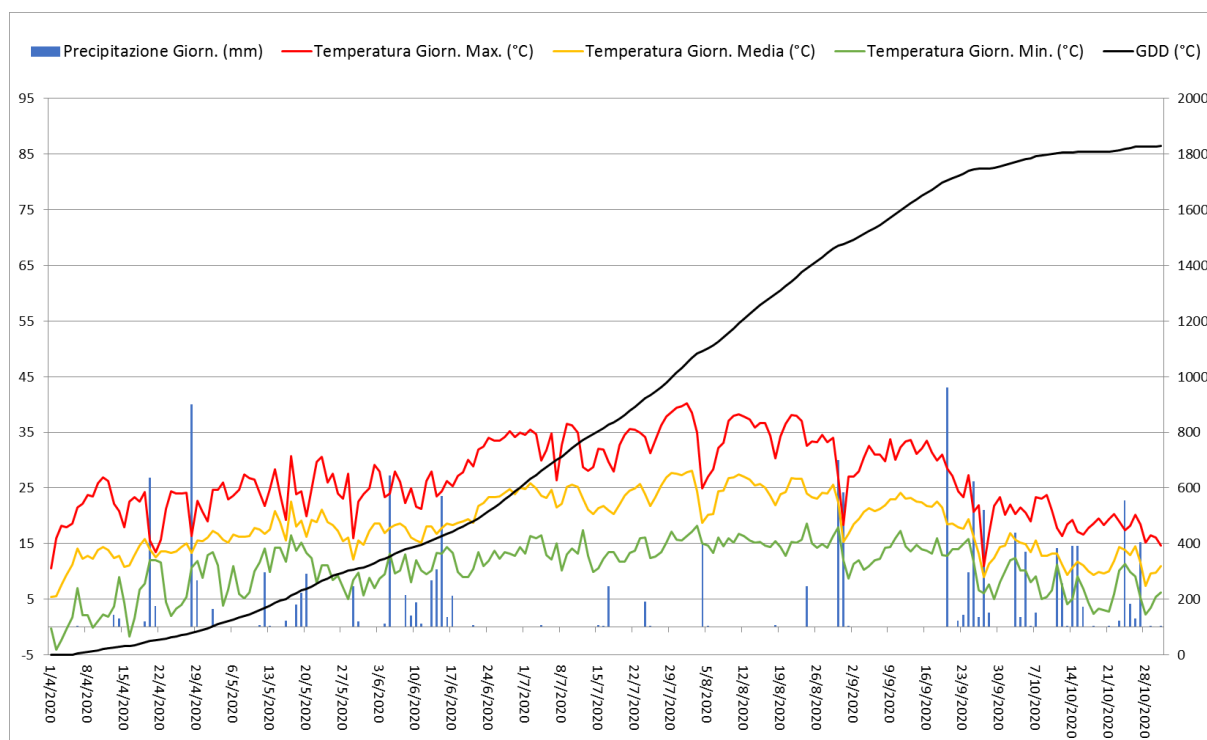


Figura 2. Dati meteorologici nel periodo 1 aprile - 31 ottobre 2020 presso il vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

Nell'intero periodo aprile-ottobre, le somme termiche accumulate sono state di 1914 °C e 1829 °C, rispettivamente nel 2019 e 2020, mentre la sommatoria delle precipitazioni è stata uguale a 616 e 552 mm, rispettivamente nel 2019 e 2020 (Figura 1 e Figura 2).

Nelle Tabelle 3 e 4 sono riportati gli accumuli parziali di GDD e le sommatorie delle precipitazioni, riferiti alle singole date di campionamento nelle due annate (2019 e 2020). I valori sono riportati per le medesime date in entrambe le annate, in modo da avere un confronto diretto dell'andamento termico e pluviometrico tra le due stagioni produttive consecutive.

Tabella 3. Accumuli parziali di GDD riferiti alle singole date di campionamento nelle due annate in studio (2019 e 2020) presso il vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

Data (fase fenologica)	GDD 2019 (°C)	GDD 2020 (°C)
04-ago (fine invaiatura)	1103	1091*
19-ago (fine invaiatura)	1322*	1311
31-ago (metà maturazione)	1487	1477*
10-set (metà maturazione)	1581*	1584
18-set (vendemmia)	1664	1685*
01-ott (vendemmia)	1764*	1760

* in rosso i valori corrispondenti alle date di campionamento nelle due rispettive annate.

Come si può notare dai dati registrati, a livello termico la stagione 2019 è stata simile a quella 2020, con un accumulo di GDD proporzionale nelle medesime date nelle due diverse annate (Figura 1, Figura 2 e Tabella 3). In entrambe le stagioni produttive, durante i mesi estivi, ci sono state delle giornate di estremo calore, con 28 giorni nel 2019 e 25 giorni nel 2020 in cui le temperature massime giornaliere hanno ecceduto i 35 °C e due giorni nel 2019 (27 giugno e 25 luglio) ed un giorno nel 2020 (1 agosto) oltre i 40 °C.

Tabella 4. Sommatorie delle precipitazioni riferite alle singole date di campionamento nelle due annate in studio (2019 e 2020) presso il vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

Data (fase fenologica)	Σ precipitazioni 2019 (mm)	Σ precipitazioni 2020 (mm)
04-ago (fine invaiatura)	457	246*
19-ago (fine invaiatura)	458*	246
31-ago (metà maturazione)	525	308*
10-set (metà maturazione)	527*	308
18-set (vendemmia)	528	308*
01-ott (vendemmia)	564*	416

* in rosso i valori corrispondenti alle date di campionamento nelle due rispettive annate.

L'apporto idrico delle piogge è stato sicuramente più scarso durante la stagione produttiva 2020 (Figura 1, Figura 2 e Tabella 4). La maggiore piovosità e quindi disponibilità di acqua nel mese di luglio 2019 (circa 165 mm) ha favorito l'attività vegetativa delle viti, a discapito della maturazione delle uve, causando un ritardo di circa 15 giorni per raggiungere la piena invaiatura rispetto all'annata successiva (18 agosto 2019 *versus* 4 agosto 2020). Tale discrepanza temporale si è mantenuta pressoché costante anche nelle successive fasi di maturazione (31 agosto *versus* 10 settembre per la fase fenologica di metà maturazione; 18 settembre *versus* 1 ottobre per la fase fenologica della vendemmia). L'intervallo di giorni tra fine invaiatura e raccolta è stato in linea con le aspettative per la varietà in studio, mediamente di 45 giorni, nell'areale di coltivazione toscano.

3.2 Peso medio dell'acino (PMA)

Il PMA è stato valutato per tutte le fasi fenologiche campionate nelle due annate (2019 e 2020). In generale, la tendenza di accrescimento degli acini è stata abbastanza simile nelle due annate ed il peso finale raggiunto dall'acino si può ritenere un parametro stabile e legato al genotipo del clone di appartenenza. Infatti, sui sei cloni osservati fa eccezione solo il clone VCR 5 che a maturazione

presenta valori di PMA tra le due annate statisticamente significativi (valori dell'annata 2020 maggiori dell'annata 2019) (Figura 3 e Figura 4).

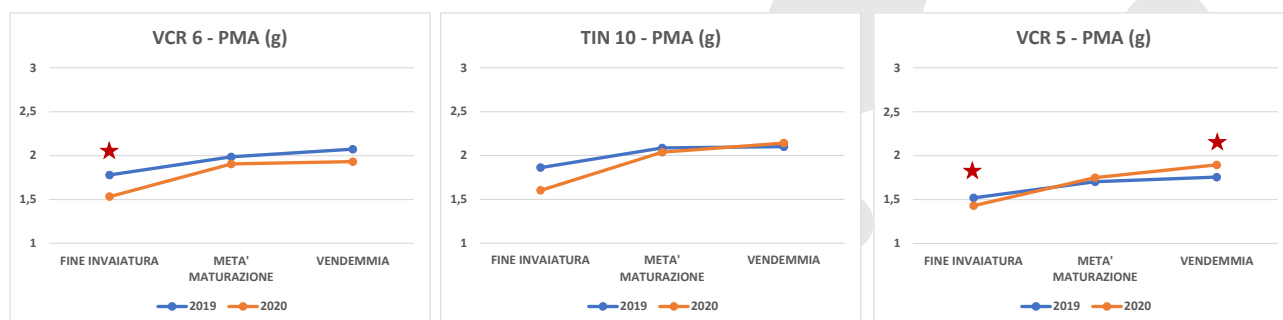


Figura 3. Peso medio dell'acino (PMA) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

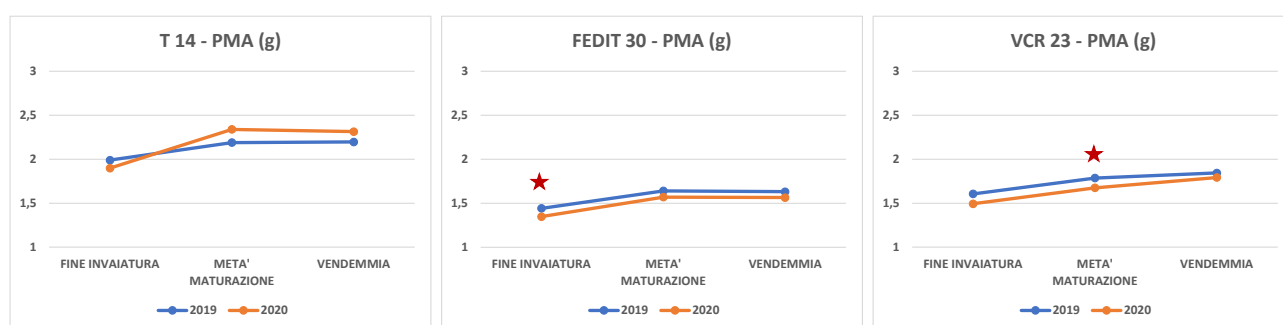


Figura 4. Peso medio dell'acino (PMA) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

I risultati ottenuti a vendemmia sono stati diversi nelle due annate (Figura 5). Nel 2019 i cloni si sono suddivisi in due gruppi principali di peso composti dai cloni VCR 6, TIN 10 e T 14 (che hanno mostrato i valori maggiori) e VCR 5, FEDIT 30 e VCR 23 (che hanno mostrato i valori minori). Mentre l'annata 2020 è stata maggiormente discriminante, con PMA minore rilevato per il clone FEDIT 30 e PMA maggiore per il clone T 14.

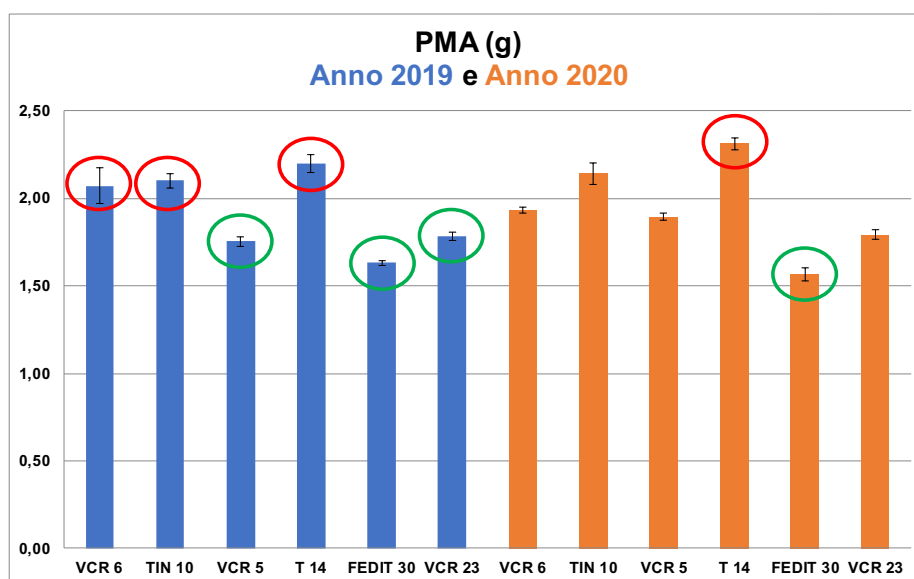


Figura 5. Peso medio dell'acino (PMA) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

3.3 Analisi tecnologiche

Per ciascuna delle tre fasi fenologiche, sono state effettuate le analisi tecnologiche sul mosto: zuccheri, pH e acidità totale.

L'accumulo di zuccheri è avvenuto con un andamento piuttosto lineare nel periodo di maturazione, per tutti i sei cloni in studio in entrambe le annate (Figura 6 e Figura 7). Ad esclusione del clone FEDIT 30, in almeno due dei tre punti di campionamento ci sono state differenze statisticamente significative a livello di zuccheri accumulati tra l'annata 2019 e l'annata 2020. In generale, le uve analizzate partivano da un grado zuccherino a fine invaiatura tra 15.9 e 17.5 °Brix (rispettivamente per i cloni TIN 10 e VCR 23) nell'annata 2019 e tra 15.0 e 16.4 °Brix (per T 14 e VCR 23) nell'annata 2020.

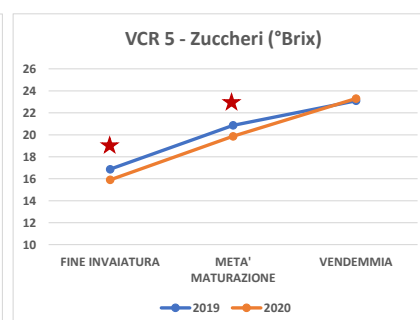
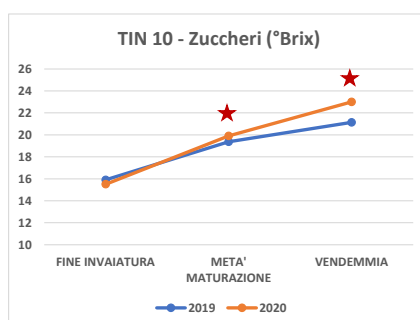
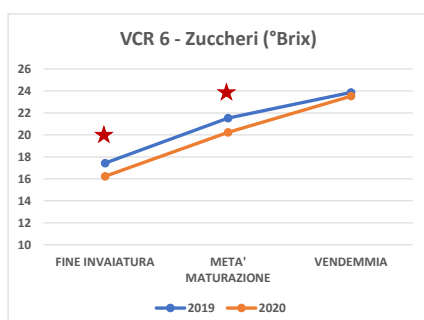


Figura 6. Contenuto in zuccheri (° Brix) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

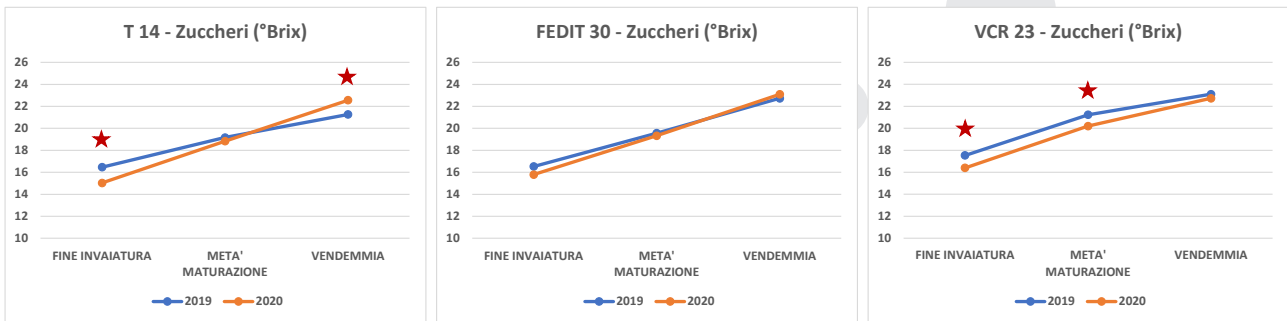


Figura 7. Contenuto in zuccheri (° Brix) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

A vendemmia, i valori più bassi sono stati raggiunti dai cloni TIN 10 e T 14 nell'annata 2019 e dal clone T 14 nell'annata 2020. Mentre i valori più alti (come anche nel resto dei punti di campionamento) sono stati raggiunti dal clone VCR 6, che nell'annata 2019 ha raggiunto il valore massimo di 23.9 °Brix a vendemmia 2019.

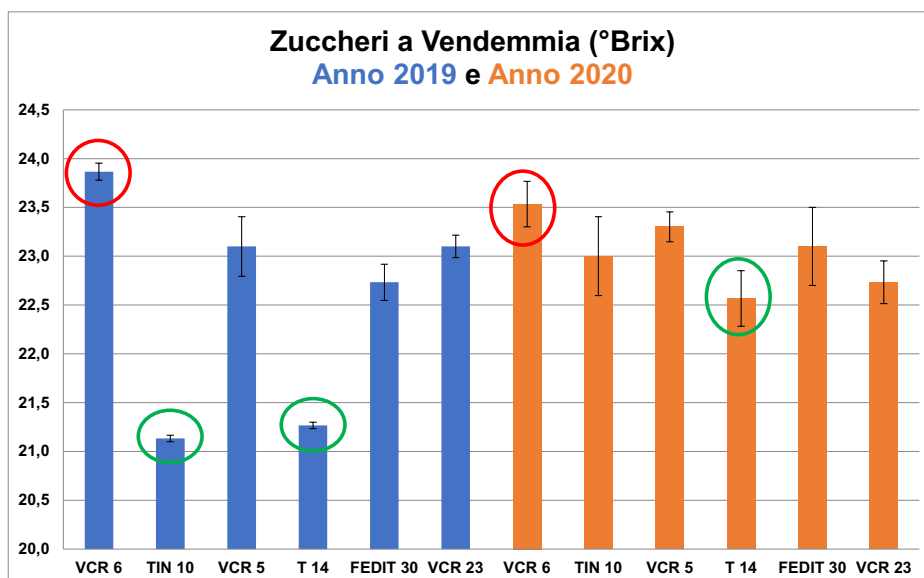


Figura 8. Contenuto in zuccheri (°Brix) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

Per quanto riguarda le misure del pH del mosto, anche per questo parametro i valori ottenuti sono risultati significativamente diversi a livello statistico tra le tesi. Per alcuni cloni i valori sono risultati simili tra le annate 2019 e 2020 (Figura 9 e Figura 10). A vendemmia, i valori di pH più bassi sono stati registrati per i cloni T 14 e FEDIT 30, in tutti i punti di campionamento di entrambe le annate. I valori massimi, invece, sono stati raggiunti dai cloni VCR 6 nel 2019, e da VCR 5, VCR 23 e TIN 10, che avevano il dato più alto a vendemmia 2020 (Figura 11).

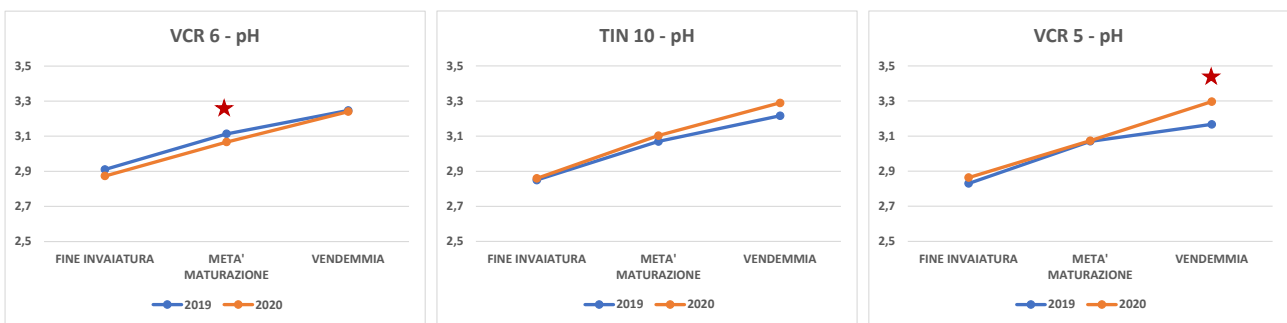


Figura 9. Valori di pH per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

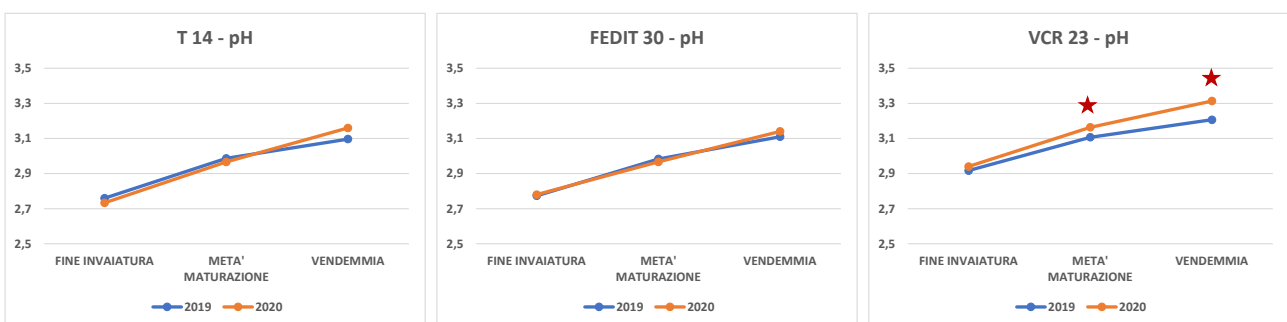


Figura 10. Valori di pH per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

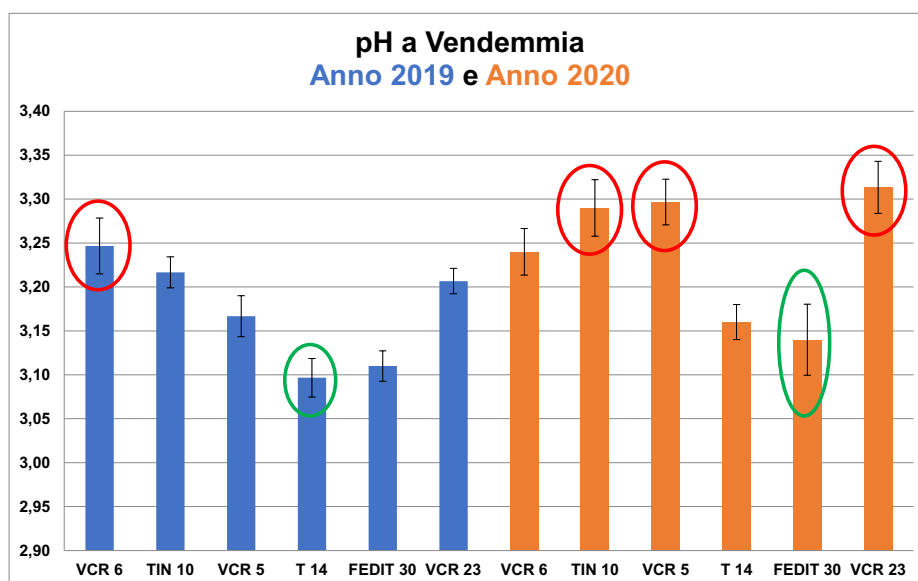


Figura 11. Valori di pH a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

Prendendo in considerazione i dati di entrambe le annate per il fattore zona di origine, il pH è risultato statisticamente diverso tra i cloni provenienti da Montalcino e Romagna, in due fasi fenologiche: metà maturazione e vendemmia. In entrambe le fasi di maturazione, il pH è risultato significativamente più alto nei cloni toscani, rispetto a quelli romagnoli (Figura 12).

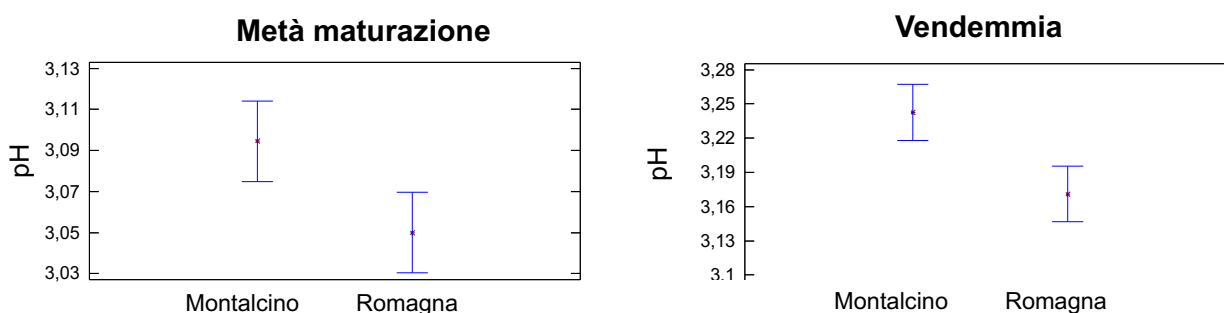


Figura 12. Valori di pH a metà maturazione e vendemmia per i cloni provenienti da Montalcino e Romagna (per le annate 2019 e 2020) e coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

Il decremento dell'acidità totale è stato per alcuni cloni completamente sovrapponibile per entrambe le annate (TIN 10, VCR 5), mentre per altri cloni (T14) è stato simile, ma con valori discordanti tra l'annata 2019 e l'annata 2020. Differenze che si sono ridimensionate verso la vendemmia. Anche in

questo caso le differenze sono risultate significative tra i valori registrati per i diversi cloni (Figura 13 e Figura 14).

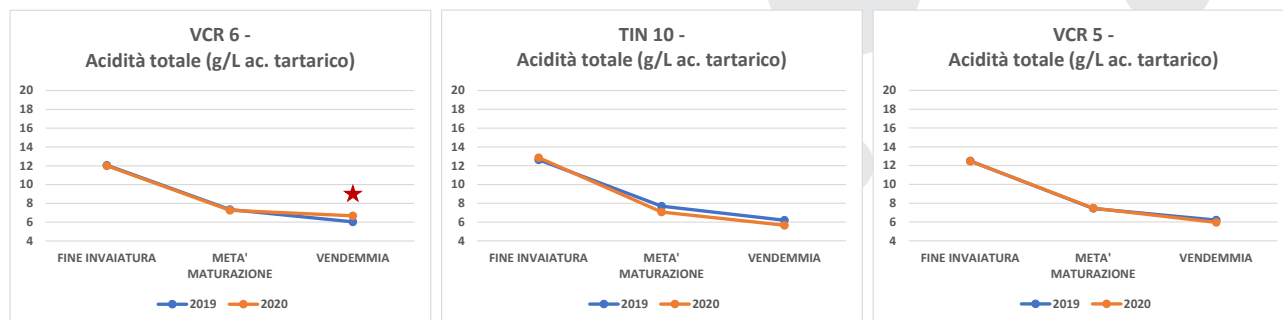


Figura 13. Valori di acidità totale (g/L di acido tartarico) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

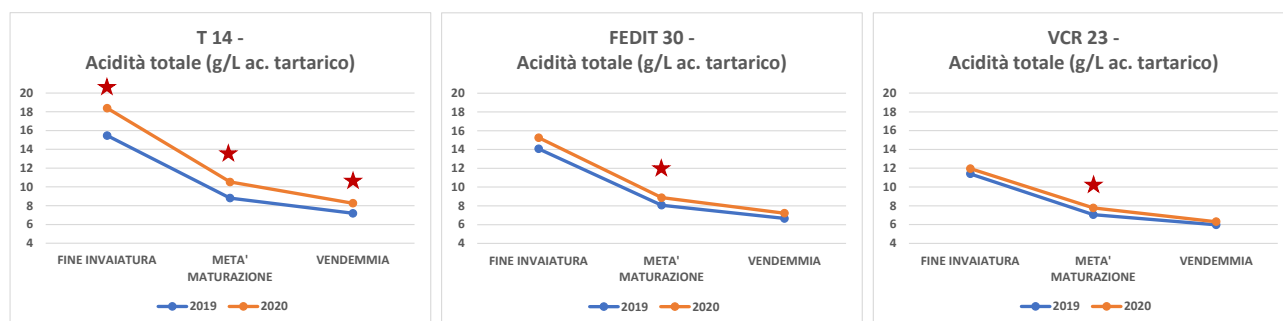


Figura 14. Valori di acidità totale (g/L di acido tartarico) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

A vendemmia, i valori più bassi sono stati raggiunti dai cloni VCR 23, VCR 6, TIN 10, VCR 5 nell'annata 2019 ed unicamente dal clone TIN 10 nell'annata 2020 (Figura 15). I valori massimi, invece, sono stati riscontrati nel clone T 14 in tutti i punti di campionamento di entrambe le annate (Figura 13, Figura 14 e Figura 15).

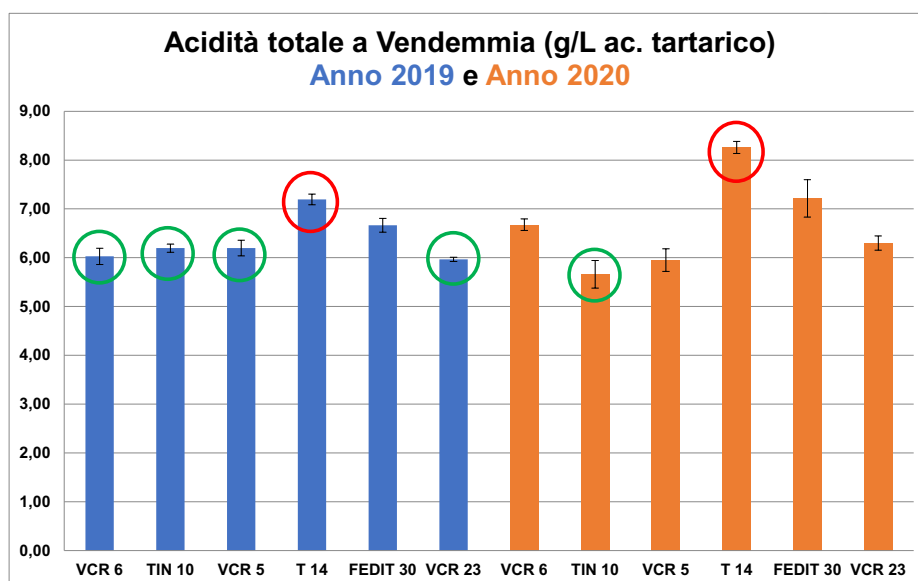


Figura 15. Valori di acidità totale (g/L di acido tartarico) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

Analogamente al pH, anche l'acidità totale è risultata significativamente diversa tra le tesi con origine Montalcino o Romagna. A differenza di quanto osservato per i valori di pH, l'acidità totale ha mostrato differenze tra le zone di origine in tutte le tre fasi fenologiche campionate (Figura 16). Tale parametro ha sempre avuto valori più alti nelle tesi romagnole, e valori più bassi nelle tesi toscane.

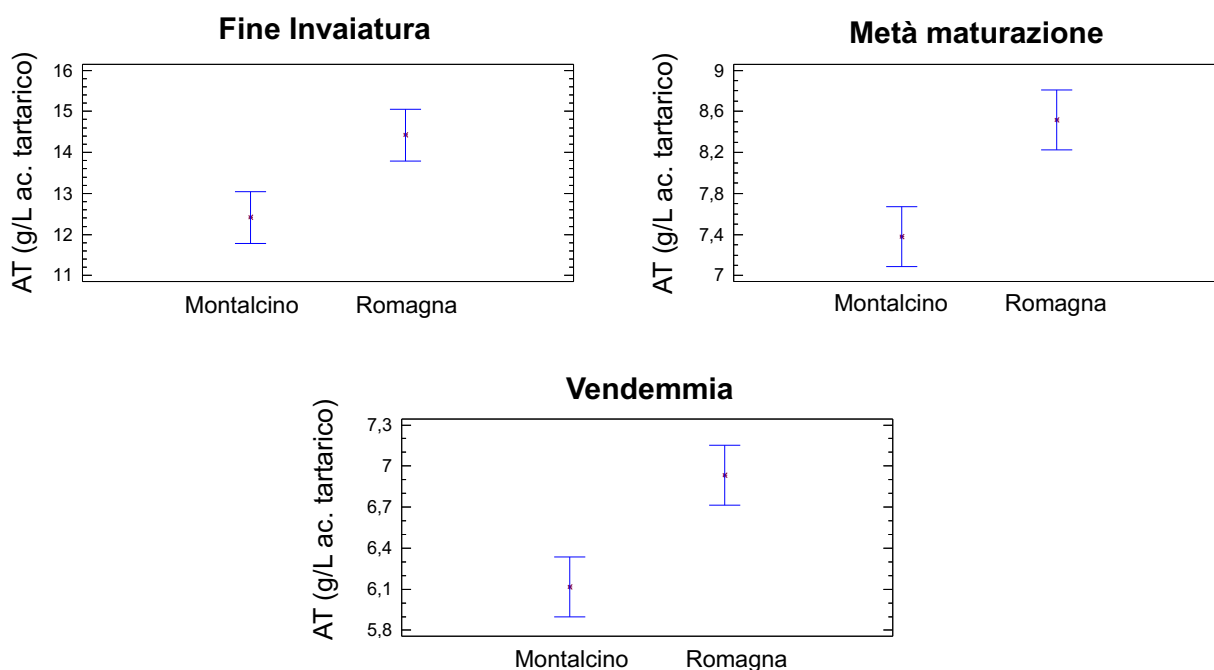


Figura 16. Valori di acidità totale (g/L di acido tartarico) nelle tre fasi fenologiche (fine invaiatura, a metà maturazione e vendemmia) per i cloni provenienti da Montalcino e Romagna (per le annate 2019 e 2020) e coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

3.4 Maturità fenolica delle uve

Per ciascuna delle tre fasi fenologiche, la maturità fenolica è stata valutata misurando gli antociani totali, gli antociani estraibili, la ricchezza fenolica tecnologica, l'estraibilità degli antociani e la maturità dei vinaccioli.

La quantità di antociani totali nelle bucce è stata fortemente influenzata dal fattore annata. Nella maggior parte dei casi, infatti, i valori sono risultati statisticamente significativi tra l'annata 2019 e l'annata 2020, sia per i cloni provenienti da Montalcino, sia per i cloni provenienti dalla Romagna (Figura 17 e Figura 18). L'accumulo di pigmenti coloranti nelle bucce è stato maggiore nel 2020, con differenze più o meno marcate rispetto all'annata precedente, e a seconda del clone considerato.

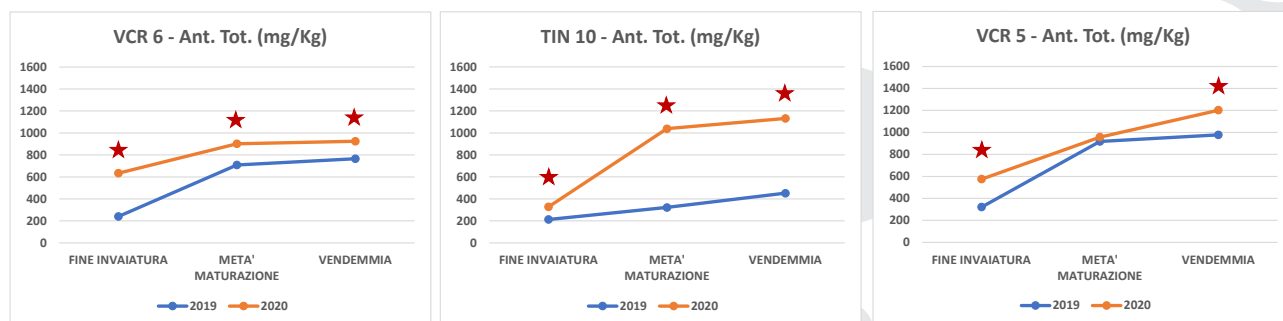


Figura 17. Valori di antociani totali (mg/Kg di uva) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

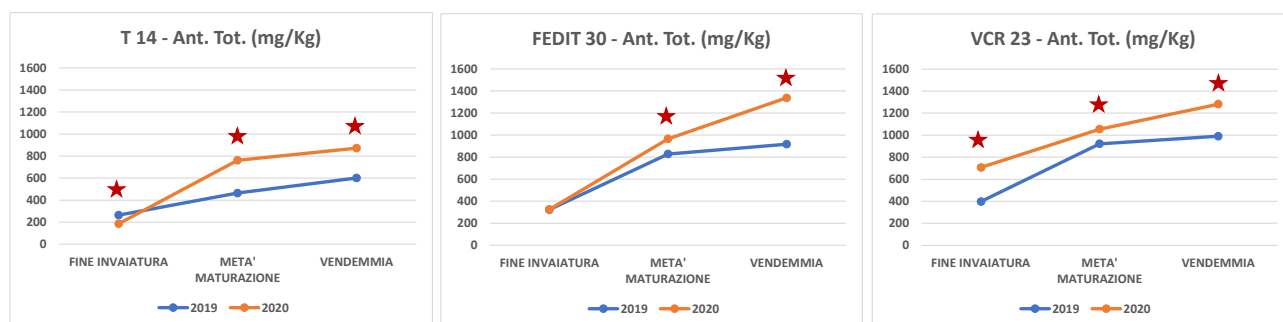


Figura 18. Valori di antociani totali (mg/Kg di uva) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

A vendemmia, il contenuto di antociani totali delle uve è risultato significativamente diverso tra i cloni. L'accumulo minore di antociani totali è stato osservato per il clone TIN 10 nell'annata 2019 e per i cloni T 14 e VCR 6 nell'annata 2020. Le concentrazioni maggiori, invece, sono state registrate per i cloni VCR 5 e VCR 23 nell'annata 2019 e per i cloni VCR 23 e FEDIT 30 nell'annata 2020 (Figura 19). Secondo i risultati statistici, il parametro antociani totali non è stato influenzato dalla zona di origine dei cloni.

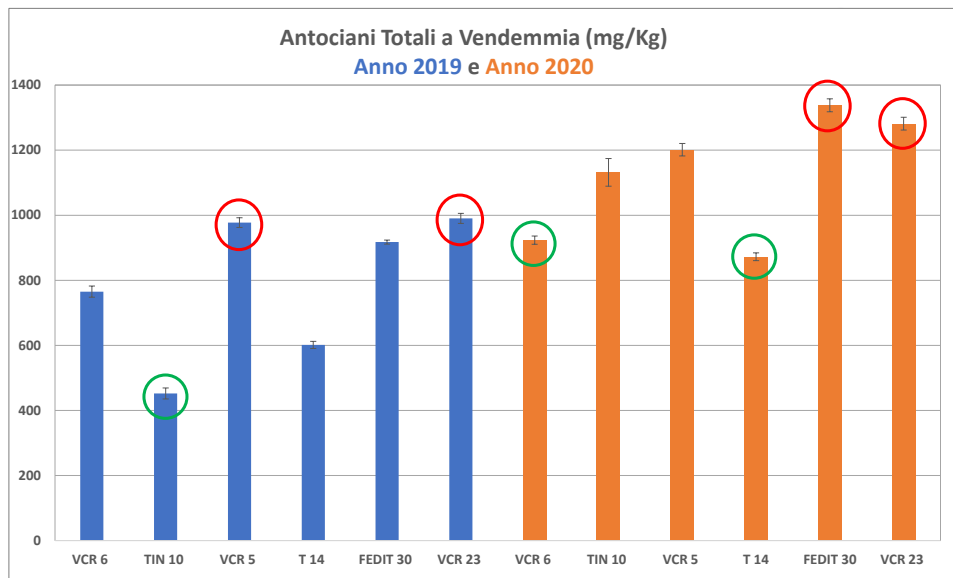


Figura 19. Valori di antociani totali (mg/Kg di uva) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

Come atteso, la quantità di antociani estraibili è risultata inferiore rispetto al contenuto totale di antociani totali nelle bucce. Tale parametro è risultato statisticamente diverso tra le due annate, in quasi tutti i punti di campionamento per i sei cloni (con unica eccezione di TIN 10 a fine invaiatura). Anche in questo caso i valori maggiori sono stati registrati nell'annata 2020 (Figura 20 e Figura 21).

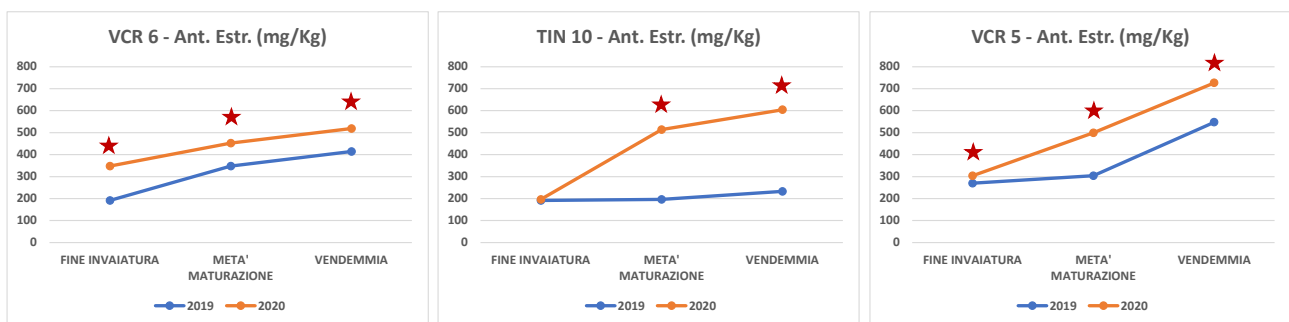


Figura 20. Valori di antociani estraibili (mg/Kg di uva) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

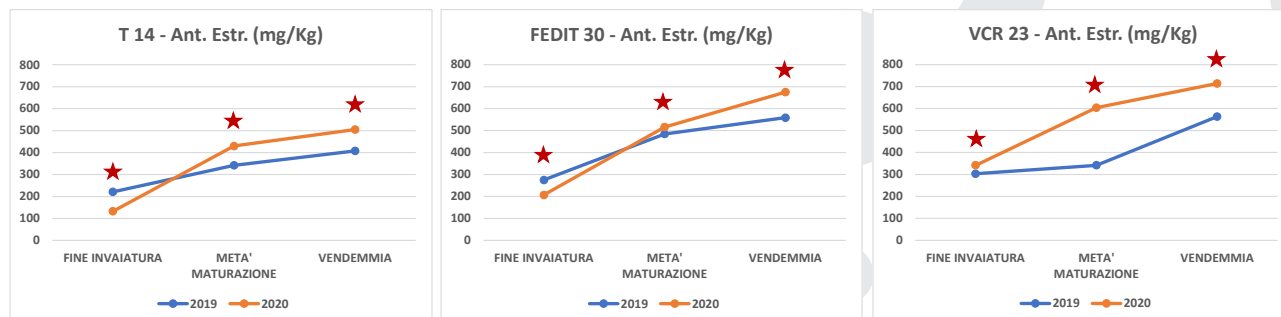


Figura 21. Valori di antociani estraibili (mg/Kg di uva) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

Anche la quantità di antociani estraibili è risultata significativamente diversa tra i cloni osservati. A vendemmia, le concentrazioni minori sono state rilevate per il clone TIN 10 nell'annata 2019 ed i cloni T 14 e VCR 6 nell'annata 2020 (con andamento analogo alle quantità di antociani totali), mentre le concentrazioni maggiori sono state rilevate per i cloni FEDIT 30, VCR 5 e VCR 23 nell'annata 2019 e VCR 5 nell'annata 2020 (Figura 22).

Per il parametro antociani estraibili non è stata rilevata un'influenza significativa imputabile alla zona di origine dei cloni in esame.

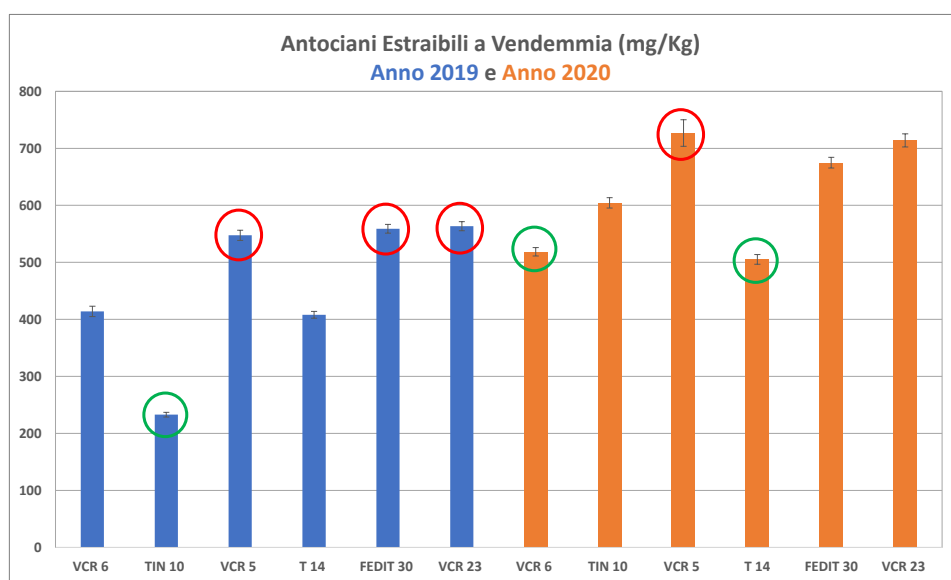


Figura 22. Valori di antociani estraibili (mg/Kg di uva) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel

vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

La ricchezza tecnologica fenolica è un indice del contenuto di polifenoli totali delle uve ed è un parametro che tende a diminuire durante la maturazione. I valori ottenuti sono risultati quasi sempre statisticamente diversi tra le annate nei punti di campionamento (tranne a vendemmia per i cloni VCR 6 e T14). L'andamento decrescente da fine invaiatura a vendemmia è stato più marcato nell'annata 2019, mentre nell'annata 2020 le curve sono risultate molto più piatte (Figura 23 e Figura 24).

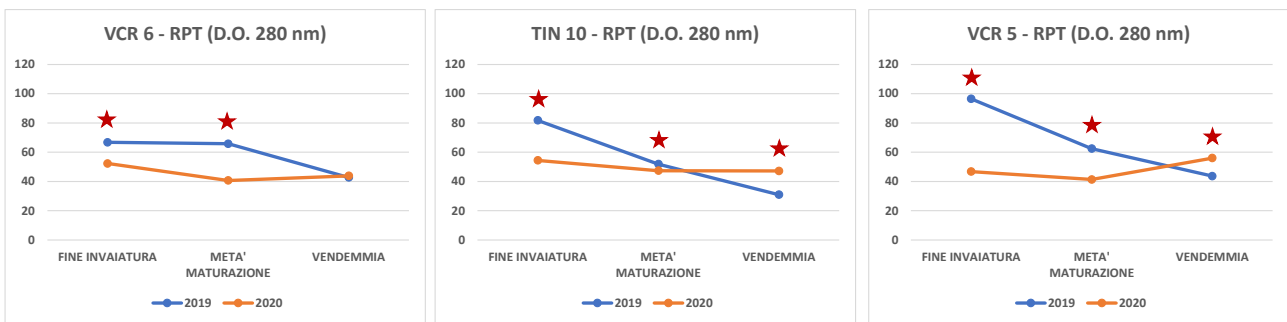


Figura 23. Ricchezza tecnologica fenolica (RPT) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

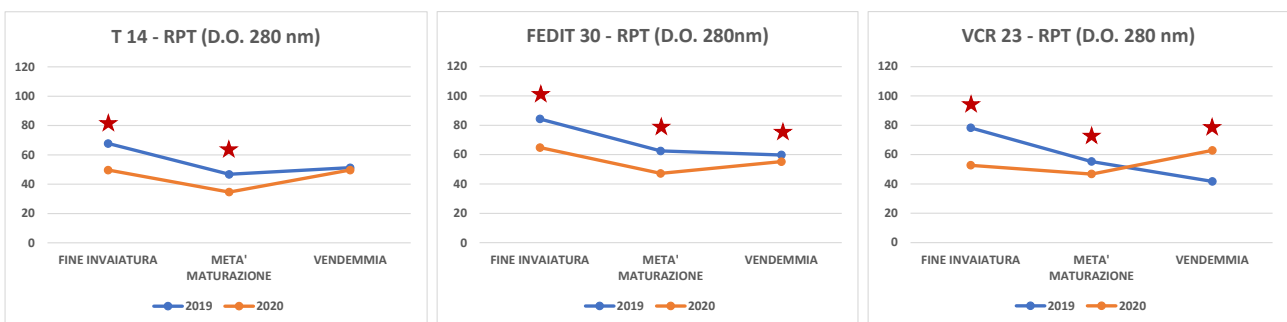


Figura 24. Ricchezza tecnologica fenolica (RPT) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

Anche in questo caso le differenze tra i cloni sono risultate statisticamente significative e a vendemmia l'indice di polifenoli totali è stato individuato nelle uve appartenenti al clone TIN 10



nell'annata 2019 e al clone VCR 6 nell'annata 2020. Mentre i contenuti maggiori sono stati osservati nelle uve del clone FEDIT 30 nell'annata 2019 e del clone VCR 23 nell'annata 2020 (Figura 25).

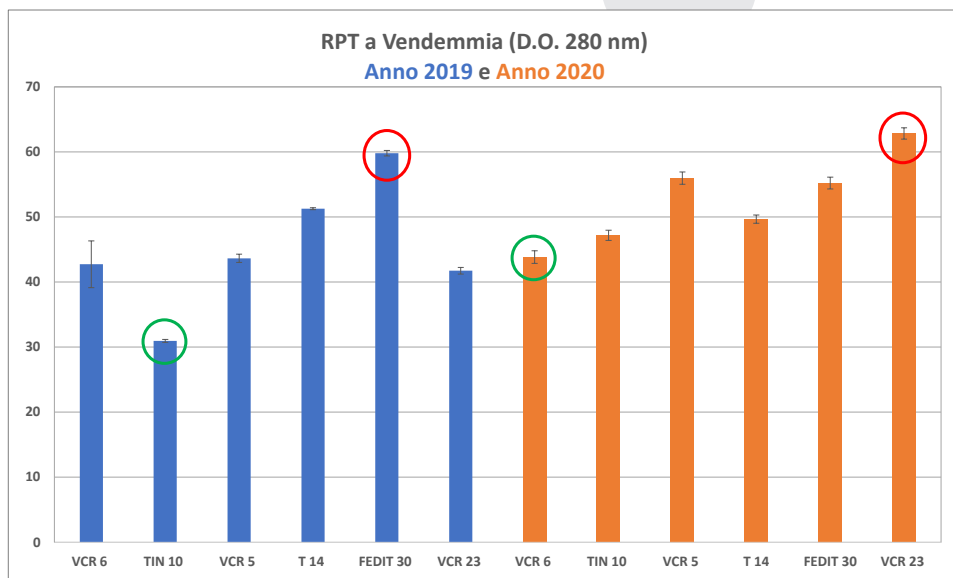


Figura 25. Ricchezza tecnologica fenolica (RPT) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

I valori di RPT sono risultati significativamente diversi secondo la zona di origine dei cloni solo a vendemmia, con valori inferiori per i tre cloni di Montalcino e valori superiori per i tre cloni provenienti dalla Romagna (Figura 26).

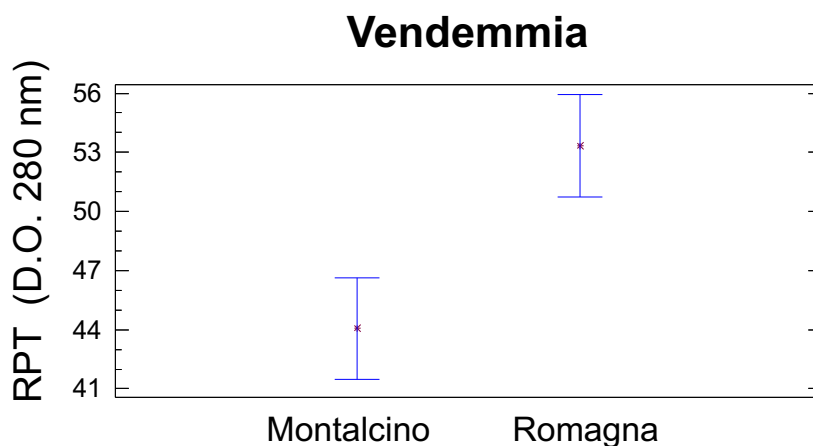


Figura 26. Ricchezza tecnologica fenolica (RPT) a vendemmia per i cloni provenienti da Montalcino e Romagna (per le annate 2019 e 2020) e coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

L'estraibilità percentuale indica la frazione di antociani non estraibili. In generale, più è basso il valore, più è alta l'estraibilità dei pigmenti coloranti. Al contrario, più sono alti i valori, meno è favorita l'estrazione di antociani durante una eventuale vinificazione. Anche in questo caso è molto influente il fattore annata, con differenze significative in numerosi punti di campionamento (Figure 27 e Figure 28).

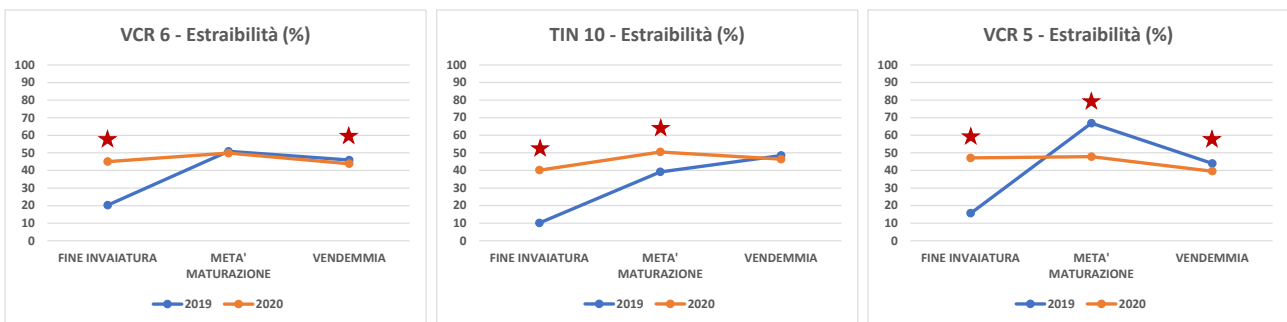


Figura 27. Estraibilità degli antociani (%) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

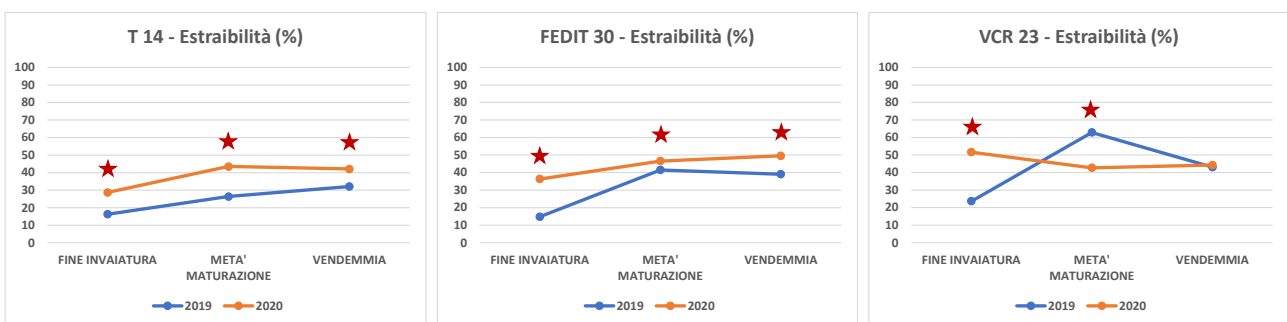


Figura 28. Estraibilità degli antociani (%) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

Le differenze di valore sono risultate statisticamente significative tra i cloni. A vendemmia, i valori più bassi (e quindi migliore estraibilità) sono stati ottenuti per il clone T 14 nell'annata 2019 ed il

clone VCR 5 nell'annata 2020. I valori maggiori (quindi meno facilità nell'estrazione di antociani) sono stati ottenuti per il clone TIN 10 nell'annata 2019 e per il clone FEDIT 30 nell'annata 2020 (Figura 29).

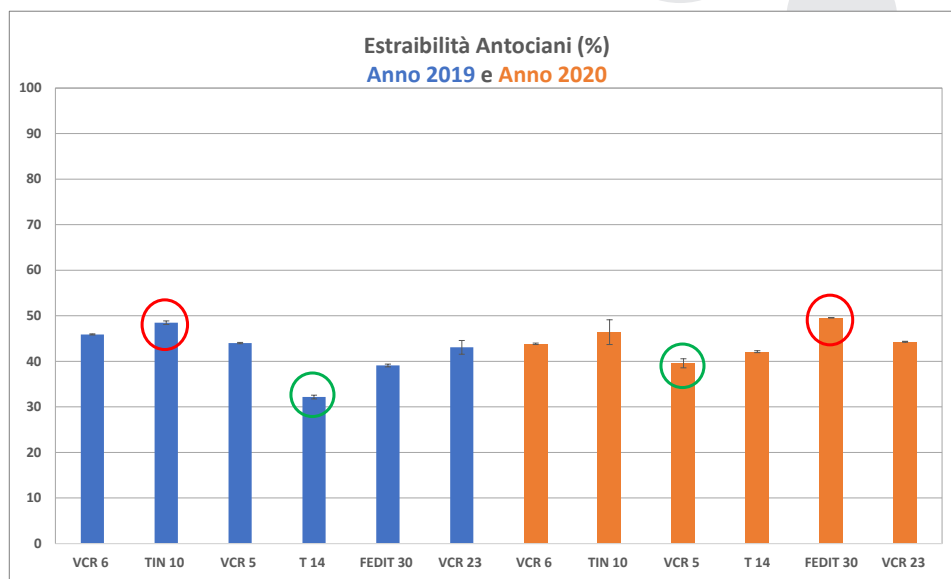


Figura 29. Estraibilità degli antociani (%) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

Dall'analisi statistica è emerso che anche l'estraibilità degli antociani è stata determinata dalla zona di origine dei cloni, ma solo a metà maturazione. I valori più bassi si sono ottenuti nelle uve di cloni provenienti dalla Romagna, i valori più alti nelle uve di cloni provenienti da Montalcino (Figure 30).

Metà maturazione

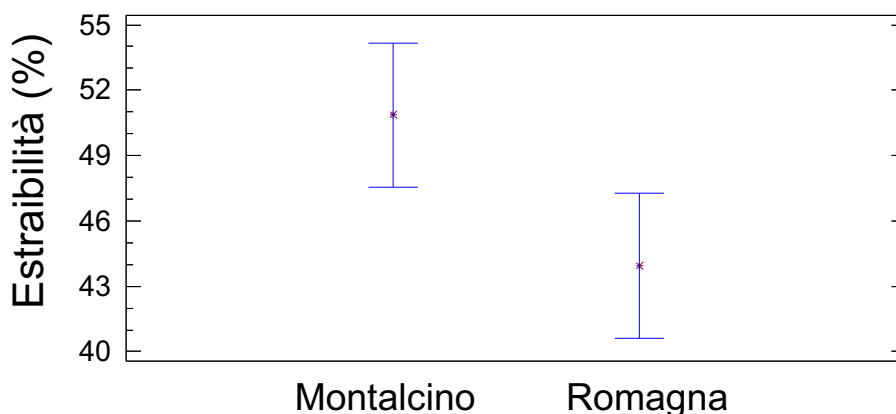


Figura 30. Estraibilità degli antociani (%) a vendemmia per i cloni provenienti da Montalcino e Romagna (per le annate 2019 e 2020) e coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo.

La maturità dei vinaccioli percentuale indica il contributo dei tannini dei vinaccioli al totale dei polifenoli nelle uve. Più è elevato il valore, più i vinaccioli sono ricchi di tannini facilmente estraibili, con un conseguente eccesso di astringenza. Tale parametro tende a diminuire durante la maturazione e varia anche in funzione del numero di semi per acino. Tranne che per i cloni VCR 5 e VCR 6 a vendemmia, l'effetto annata è stato sempre significativamente visibile nei risultati. I valori sono stati generalmente più alti nell'annata 2019 rispetto all'annata 2020 (Figura 31 e Figura 32).

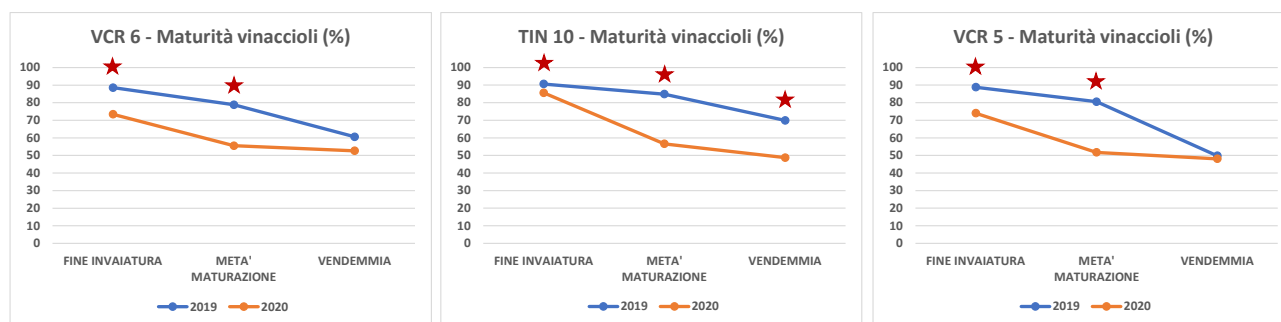


Figura 31. Maturità dei vinaccioli (%) per i tre cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

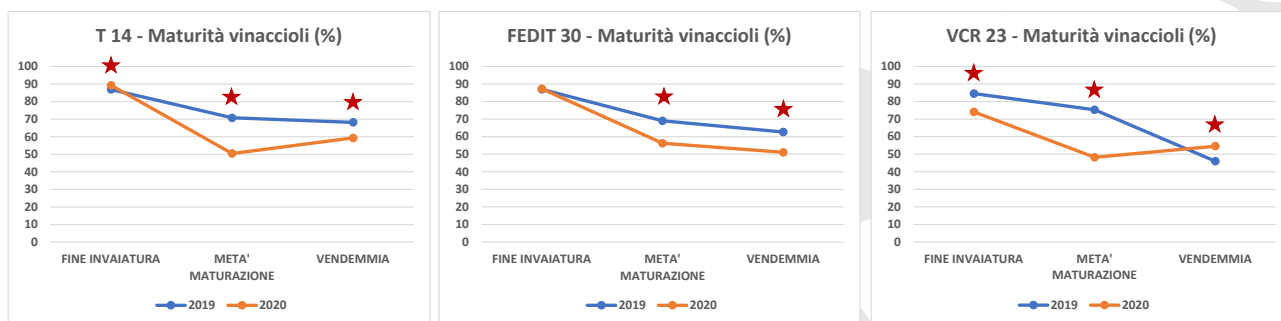


Figura 32. Maturità dei vinaccioli (%) per i tre cloni di Sangiovese provenienti dalla Romagna alle tre fasi fenologiche campionate (fine invaiatura, metà maturazione e vendemmia), nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Entro ciascuna fase fenologica, le stelle in rosso indicano differenze statisticamente significative (LSD, $P < 0,05$).

A vendemmia il valore percentuale più basso è stato ottenuto in entrambe le annate per il clone VCR 5, insieme al clone VCR 23 nell'annata 2019 ed al clone TIN 10 nell'annata 2020, mentre il valore percentuale più alto è stato ottenuto per il clone T 14 in entrambe le annate, insieme al clone TIN 10 per l'annata 2019 (Figura 33).

La provenienza dei cloni non ha avuto influenze sulla maturità dei vinaccioli nelle uve appartenenti ai cloni in studio.

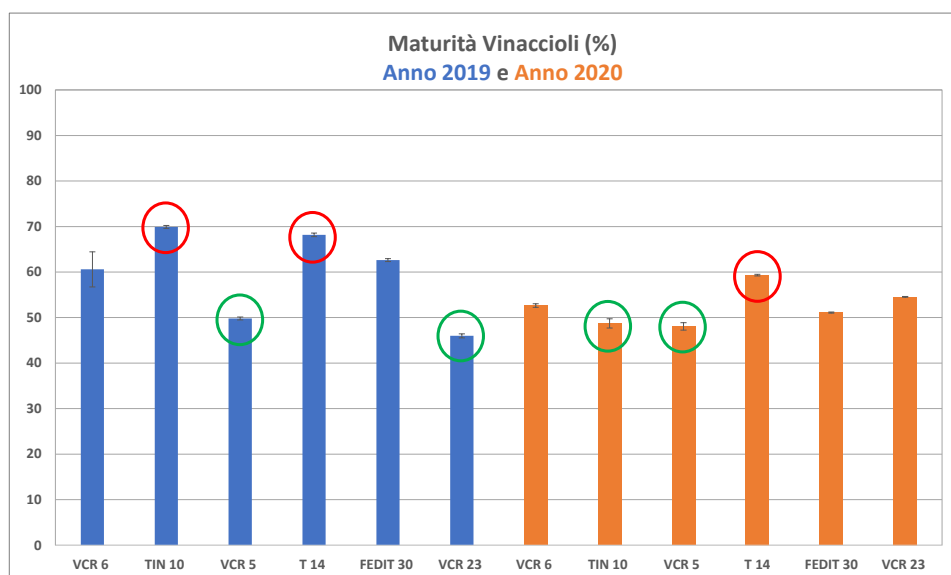


Figura 33. Maturità dei vinaccioli (%) a vendemmia per i sei cloni di Sangiovese provenienti da Montalcino e Romagna, nelle due annate in studio (2019 e 2020), coltivati nel vigneto sperimentale del CREA-VE di Arezzo. Le barre rappresentano l'errore standard dei campioni. Cerchio verde: valore minimo; cerchio rosso: valore massimo.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

Lo studio effettuato ha fornito risultati interessanti, confermando che esistono notevoli differenze nella maturità tecnologica e fenolica delle uve tra i sei cloni di Sangiovese considerati (TIN 10, VCR 5, VCR 23 di origine toscana e T 14, FEDIT 30, VCR 6 di origine romagnola), alcune determinate anche dalla zona di provenienza. Da cosa dipendono queste differenze? Ci sono dei tratti epigenetici in grado di spiegare queste differenze? Queste difformità fenotipiche si confermano presupposti fondamentali per supportare l'approfondimento a livello epigenetico della variabilità intravarietale che contraddistingue la varietà Sangiovese. I dati epigenetici e quelli fenotipi saranno elaborati tramite un approccio olistico al fine di identificare i cambiamenti epigenetici associati ai differenti fenotipi.

5. Bibliografia

- Burin V.M., Lima da Silva A., Malinovski L.I., Rosier J.P., Falcão L.D., BordignonLuiz M.T. 2011. Characterization and multivariate classification of grapes and wines of two Cabernet Sauvignon clones. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46, 474–481.
- Carrier G., Le Cunff L., Dereeper A., Legrand D., Sabot F., Bouchez O., Audeguin L., Boursiquot J.M., This P. 2012. Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L. *PLoS ONE* 7, 1–10.
- De Lorenzis G., Squadrito M., Rossoni M., Simone Di Lorenzo G., Brancadoro L., Scienza A. 2016. Study of intra-varietal diversity in biotypes of Aglianico and Muscat of Alexandria (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, doi: 10.1111/ajgw.12247.
- Duchêne E., Legras J.L., Karst F., Merdinoglu D., Claudel P., Jaegli N., Pelsy F. 2009. Variation of linalool and geraniol content within two pairs of aromatic and non-aromatic grapevine clones. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 120–130.
- Fernandez L., Torregrosa L., Segura V., Bouquet A., Martinez-Zapater, J.M. 2010. Transposon-induced gene activation as a mechanism generating cluster shape somatic variation in grapevine. *Plant Journal* 61, 545–557.
- Ferrandino A., Guidoni S. 2010. Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv 'Barbera' clones. *European Food Research and Technology* 230, 417–427.



- Franks T, Botta R, Thomas MR. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry, and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 192–9.
- Glories Y., Agustin M. 1993. Maturité phénologique du raisin, conséquences technologiques: application aux millésimes 1991 et 1992. Actes du Colloque «Journée technique du CIVB» 21 Janvier 1993, Bordeaux, pag. 56-61.
- Haig D. 2004. The (Dual) Origin of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LXIX.
- Kobayashi S. 2004. Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. *Science* 304, 982.
- Mercati F., De Lorenzis G., Brancadoro L., Lupini, A., Abenavoli, M.A., Barbagallo, M.G., Di Lorenzo, R., Scienza A., Sunseri F. 2016. High-throughput 18K SNP array to assess genetic variability of the main grapevine cultivars from Sicily. *Tree Genetics & Genomes* 12, 59.
- O.I.V. - International Organisation of Vine and Wine. Compendium of international methods of analysis of wines and musts. 2018; <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol>.
- Riaz S., Garrison K.E., Dangl G.S., Boursiquot J.-M., Meredith C.P. 2002. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127, 508–14.
- Richards E.J. 2006. Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7, 395–401.
- Rustioni L., Rossoni M., Failla O., Scienza A. 2013. Anthocyanin esterification in Sangiovese grapes. *Italian Journal of Food Science* 25, 133–141.
- Saint-Criq N., Vivas N., Glories Y. 1998. Maturité phénologique: définition et contrôle. *Rev. Fr. Oenol.* 173, 22-25.
- Steward N, Mikako I, YubeY. 2002. Periodic DNA methylation in Maise Nucleosomes and demethylation by environmental stress. *The Journal of Biological chemistry* 277, 37741-37746.
- Vondras A.M., Minio A., Blanco-Ulate B., Figueroa-Balderas R., Penn M.A., Zhou Y., Seymour D., Ye Z., Liang D., Espinoza L.K., Anderson M.M., Walker M.A., Gaut B., Cantu C. 2019. The genomic diversification of grapevine clones. *BMC Genomics* 20, 972.
- Winkler A.J., Cook J.A., Kliewer W.M., Lider L.A. 1974. *General Viticulture*, 2nd ed.; University of California Press: Berkeley, CA, USA; p. 710.



**fondazione
banfi**

Xie H., Konate M., Sai N., Tesfamicael K.G., Cavagnaro T., Gilliam M., Breen J., Metcalfe A., Stephen J.R., De Bei R., Collins C., Lopez C.M.R. 2017. Global DNA Methylation Patterns Can Play a Role in Defining Terroir in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Shiraz). *Frontier in Plant Science* 8, 1860.

Ringraziamenti

Si ringraziano i colleghi del CREA-VE di Arezzo ed alcune tirocinanti dell'Università di Firenze per la collaborazione nei campionamenti e nell'attività di laboratorio.