



**fondazione banfi**

---

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

V Edizione

# **SUMMER SCHOOL SANGUIS JOVIS**

**I FIGLI DEL SANGIOVESE NEL  
MONDO:  
STORIE, VINI, TERRITORI, MERCATI**

# L'epigenetica del Sangiovese fra climate change e variabilità varietale

**Alessandra Zombardo**

**CREA – Centro di Ricerca Viticoltura e Enologia, Arezzo**

**Montalcino, 12 luglio 2022**



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# ARGOMENTI TRATTATI

- Introduzione all'epigenetica
- Meccanismi di regolazione epigenetica
- Ruolo dell'epigenetica nelle piante
- Ereditabilità delle modifiche epigenetiche
- Vite come pianta modello per l'epigenetica
- Epigenetica e cloni di vite
- Introduzione al progetto «Studio della variabilità intravarietale di cloni di Sangiovese per l'identificazione dei tratti epigenetici»
- Prospettive future e conclusioni



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# EPIGENETICA:

«The living genome»

«Epigenetic revolution»

= Al di sopra della genetica

«Qualsiasi cambiamento, potenzialmente stabile ed ereditabile, nell'espressione genica che si verifica senza un cambiamento nella sequenza del DNA»

(Haig, 2004)



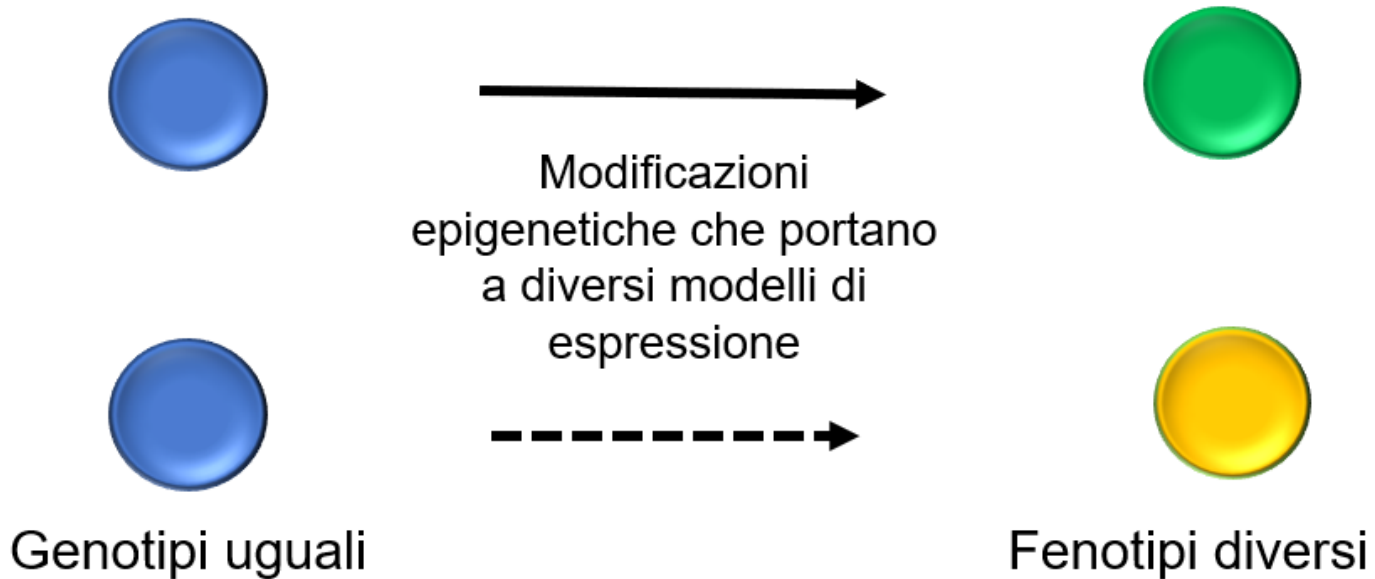
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS



If they ask you anything you don't know, just say it's due to epigenetics.

# «UN CAMBIAMENTO DEL FENOTIPO SENZA UN CAMBIAMENTO DEL GENOTIPO»



**GENOTIPO, EPIGENOTIPO = FENOTIPO**



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# DNA, il codice della vita

- Impronta genetica di ciascun un organismo

Sequenza identica in tutte le cellule somatiche

Diversi pattern di espressione genica nelle singole cellule

(DIFFERENZIAMENTO CELLULARE)

## GENETICS

“Reading the book of life”

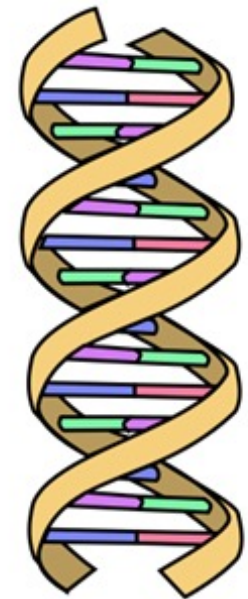
EPIGENETICREGULATIONOFNORMALCELLULARPROCESSESISTYPICALLYDRIVENINACELLTYPEDEPENDENTMANNERTHISREQUIRESANEXQUISITELEVELOFINTERPLAYBETWEENEPIGENETICLAYERSINCLUDINGDNAMETHYLATIONNUCLEOSOMEPOSITIONSANDHISTONEMODIFICATIONSAMONGSTOTHERSTOGETHERREPIGENETICMECHANISMS ESTABLISHTHECORRECTGENEEXPRESSIONPATTERNSANDHIGHERORDERCHROMATINSTRUCTURESTHUSTHEIDENTITYOFEACHCELLOFTHESEDNAMETHYLATIONISTHEBESTSTUDIEDEPIGENETICMODIFICATIONPRECISEDNAMETHYLATIONPATTERNSAREESTABLISHEDDURINGEMBRYONICDEVELOPMENTANDAREMITOTICALLYHERITABLETHROUGHMULTIPLECELLULARDIVISIONS

## EPIGENETICS

“Translating the book of life”

Epigenetic regulation of normal cellular processes is typically driven in a cell type-dependent manner. This requires an exquisite level of interplay between epigenetic layers, including DNA methylation, nucleosome positions and histone modifications, amongst others.

Together, epigenetic mechanisms establish the correct gene-expression patterns and higher-order chromatin structures; thus, the identity of each cell. Of these, DNA methylation is the best-studied epigenetic modification. Precise DNA methylation patterns are established during embryonic development and are mitotically heritable through multiple cellular divisions.



DNA

— = Adenina

— = Timina

— = Citosina

— = Guanina

— = Struttura laterale  
(gruppo fosfato  
e 2-deossiribosio)



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

Genetics → «Hardware»

Epigenetics → «Software»

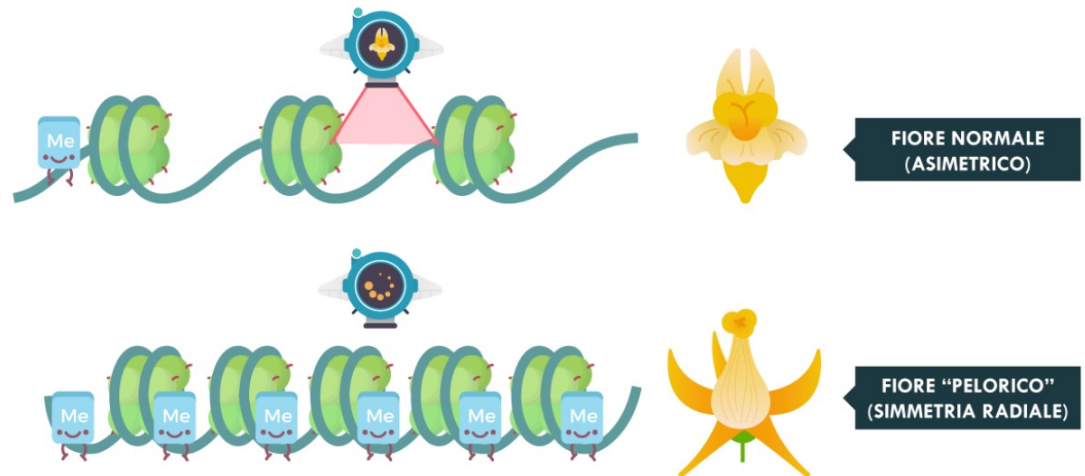
# *Linaria vulgaris* vs *Linaria pelorica*



Fiore: due varianti in natura (una spontanea, scoperta casuale)  
→ classificata come forma «mostruosa» (Carlo Linneo, 1744)

## Mutazione genetica o processo epigenetico?!

Risposta: fine XX secolo!



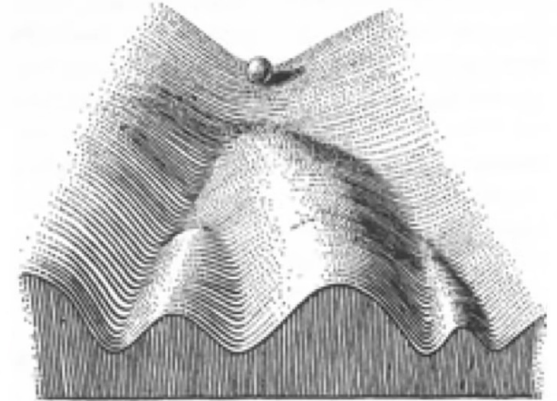
# «EPIGENETIC LANDSCAPE»

Conrad Waddington, 1942  
Metafora per lo sviluppo biologico

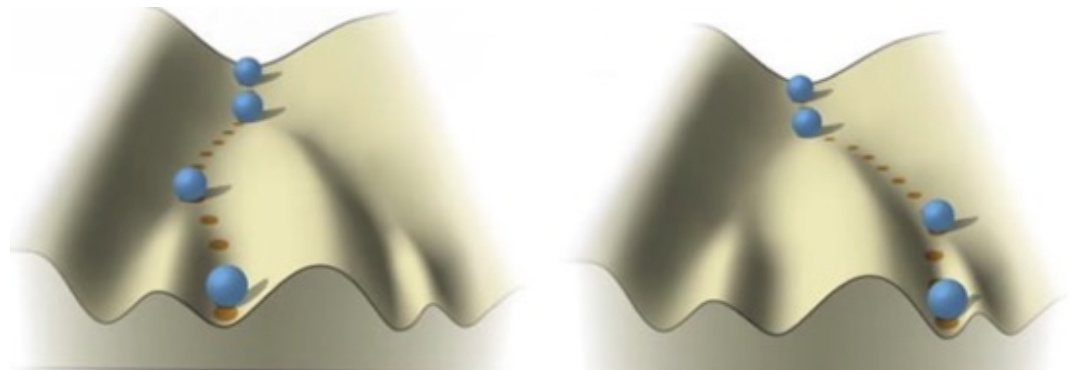
«La branca della biologia che studia le interazioni causali tra i geni e i loro prodotti, che danno origine al fenotipo».

→ Destino cellulare stabilito in fase di sviluppo

→ Le cellule sono come biglie: raggiungono il punto più basso rotolando in maniera casuale nelle valli separate dalle creste



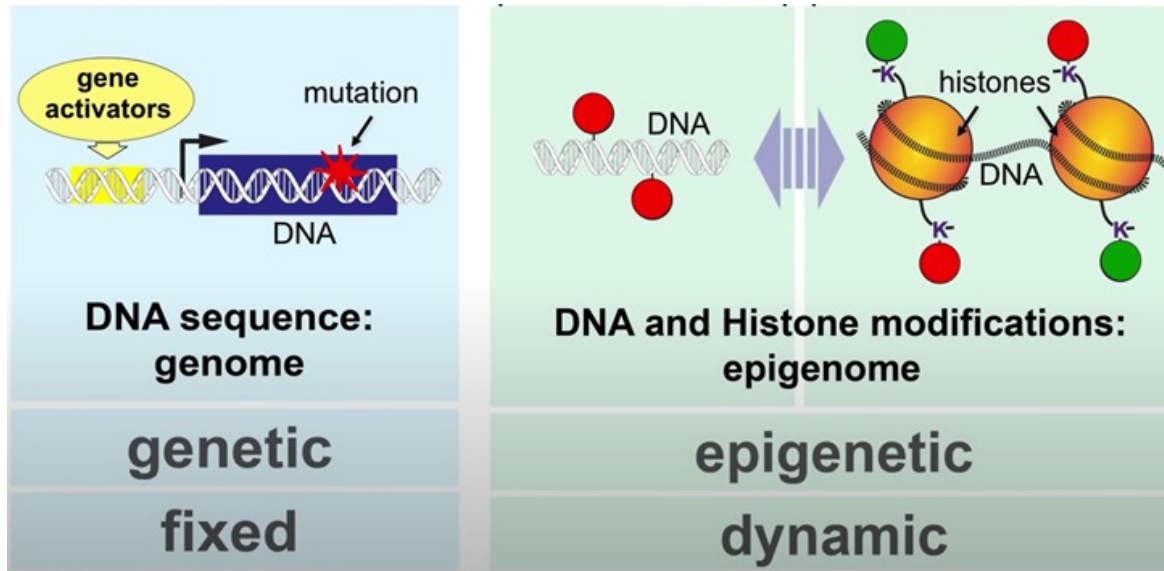
Conrad Waddington, 1942



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS



# Mutazioni ≠ Epimutazioni



## MUTAZIONI:

cambiamenti nelle sequenze di nucleotidi del DNA

→ Permanenti!

## EPIMUTAZIONI:

Modifiche chimiche del filamento di DNA o degli istoni, più frequenti e rapide

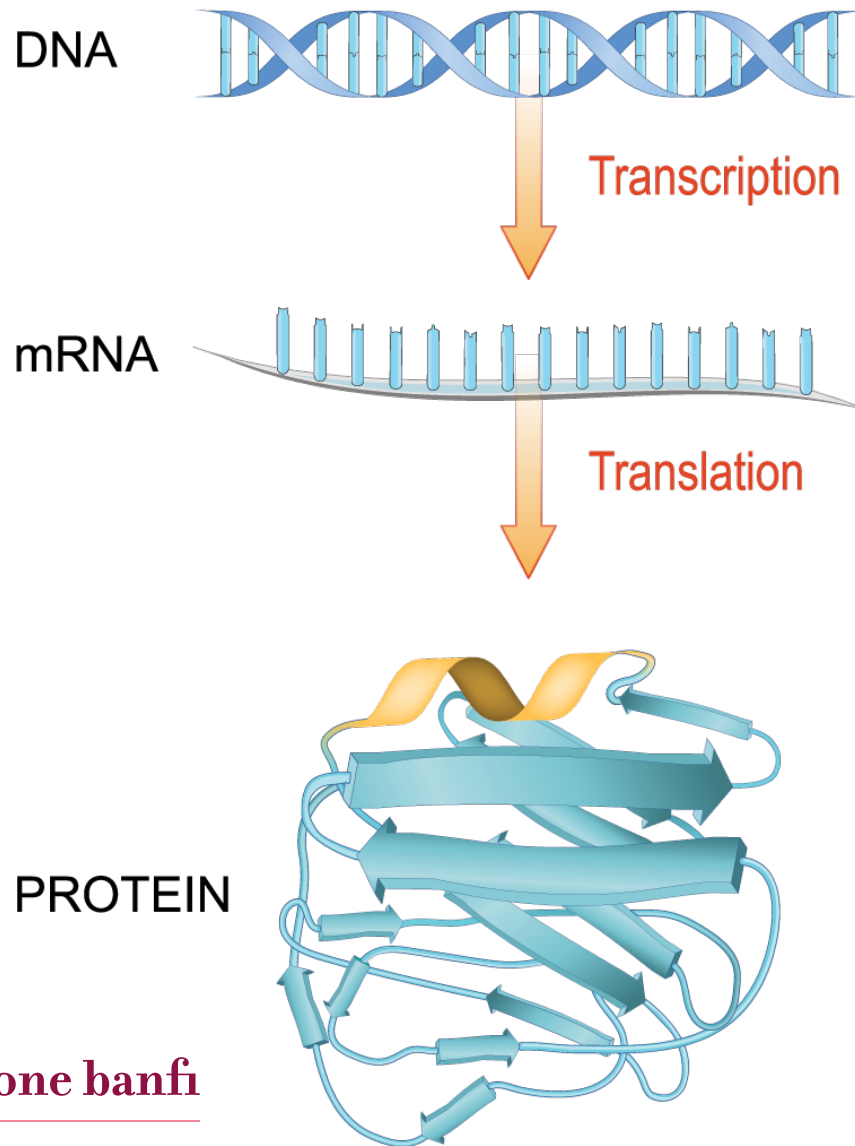
→ Reversibili!



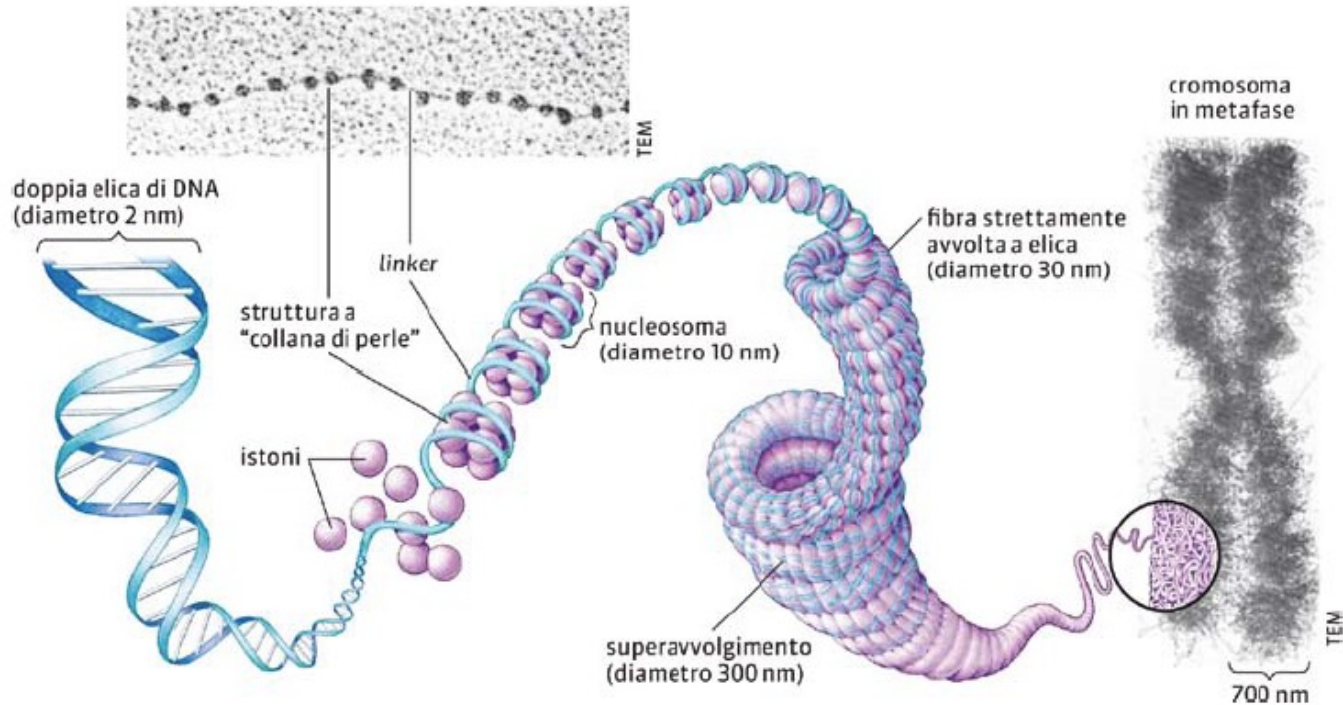
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# ESPRESSIONE GENICA e SINTESI PROTEICA



# LA STRUTTURA DEL DNA



CROMATINA: DNA + istoni

NUCLEOSOMA: unità fondamentale della cromatina, 8 istoni + DNA (147 bp), regola accessibilità TFs

ISTONI: «perle», (H2A, H2B, H3, H4)\*2  
Core istonico, code istoniche



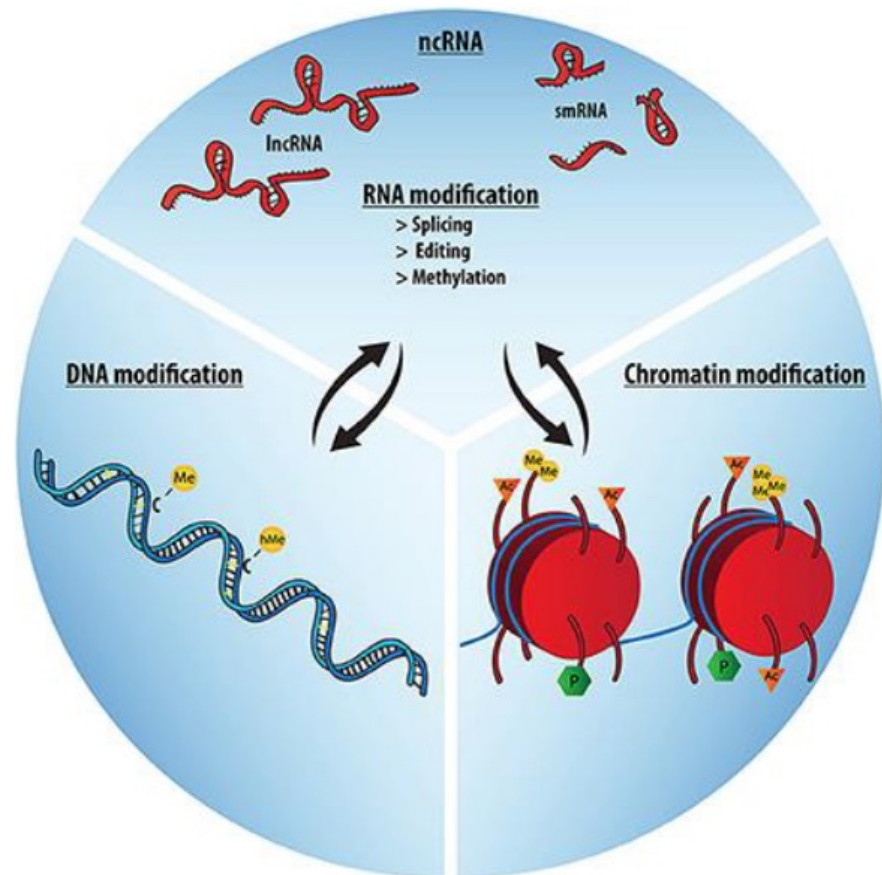
**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# MECCANISMI MOLECOLARI DI REGOLAZIONE EPIGENETICA

→ meccanismi di regolazione trascrizionale che inducono cambiamenti ereditabili nell'espressione genica senza apportare modifiche alla sequenza del DNA

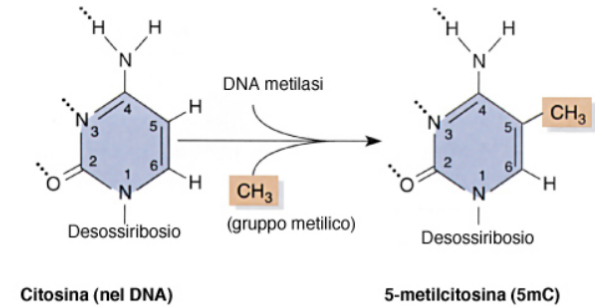
- 1) Metilazione del DNA
- 2) Modificazioni istoniche
- 3) Editing mediato da ncRNA



# 1) METILAZIONE DEL DNA

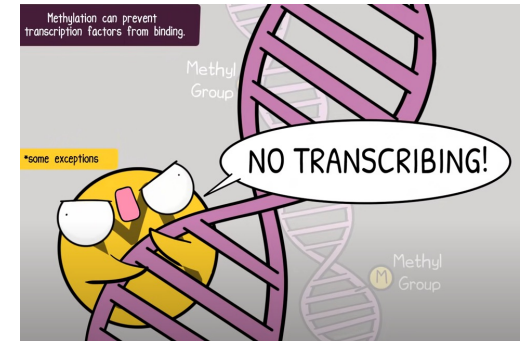
- meccanismo epigenetico più studiato
- induce silenziamento genico
- reversibile
- mediato da diversi enzimi

→ aggiunta di un gruppo (-CH<sub>3</sub>)  
in posizione 5' della CITOSINA = 5-METILCITOSINA  
Legame covalente, donatore: S-adenosil-metionina



Piante: 3 diversi contesti di metilazione

- 1) CG } Sequenze simmetriche
  - 2) CH\*G } Sequenze simmetriche
  - 3) CH\*H\* → Sequenze non simmetriche
- H\* = A, C, or T



# ENZIMI RESPONSABILI DELLA METILAZIONE

- Metiltransferasi 1 (MET1)

Siti 5'-CG-3'

Metiltransferasi di mantenimento, silenziamento trasposoni, imprinted genes...

- Cromometilasi 3 (CMT3)

Siti 5'-CHG-3'

metilazioni *de novo* in siti con determinate modificazioni istoniche

- DOMAINS REARRANGED 1 e 2 (DRM1, DRM2)

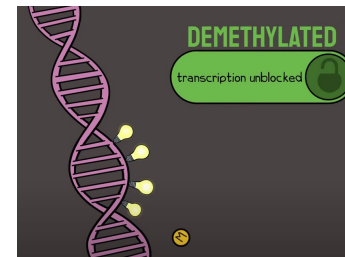
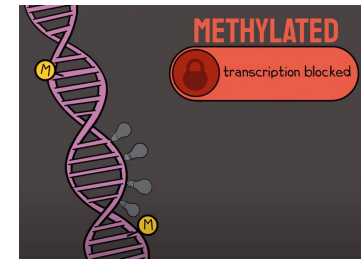
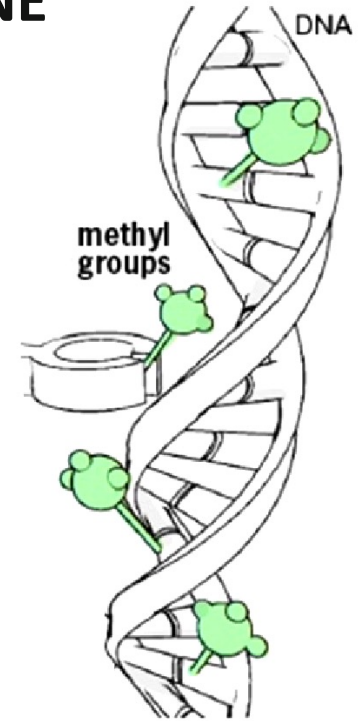
Siti 5'-CHH-3'

metilazioni su elementi ripetuti DNA, metilazioni *de novo* necessitano targeting attivo di siRNAs

## Demetilazione:

ROS1 (repressor of silencing1) e 3 tipi di DEMETER-like proteins tolgono 5-metilcitosina e ri-inseriscono citosina

→ Epigenetic resetting



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

## 2) MODIFICAZIONE POST-TRADUZIONALE DEGLI ISTONI

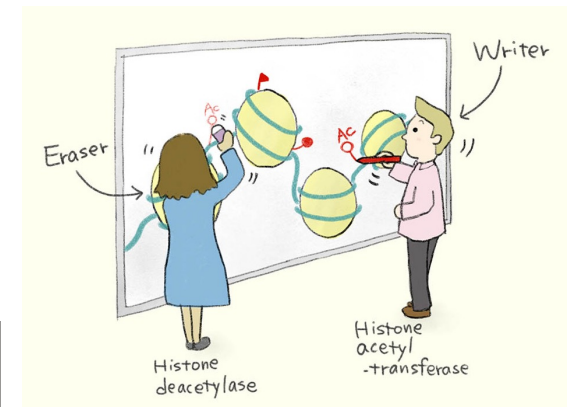
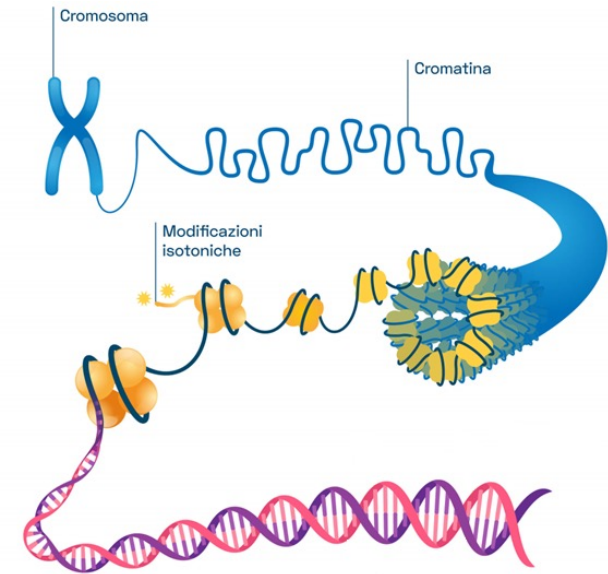
modifiche alla regione N-terminale dei complessi istonici  
legami covalenti, reversibili  
→ acetilazione, metilazione, fosforilazione,  
ubiquitinazione e sumoilazione

Coinvolti ≠ AA presenti nelle code istoniche:

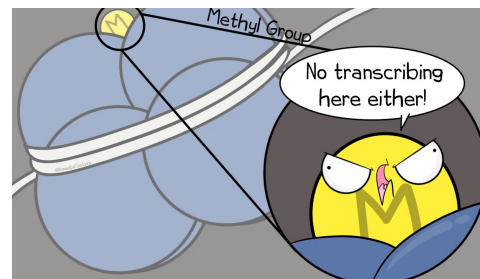
- acetilazione: lisina (K)
- metilazione: lisina (K) e arginina (R)
- fosforilazione: serina (S) e treonina (T)
- ubiquitinazione: lisina (K)
- Sumoilazione: lisina (K)

→ rimodellamento della struttura della cromatina  
condensazione e de-condensazione

→ alterazione (+) o (-) dell'espressione genica



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS



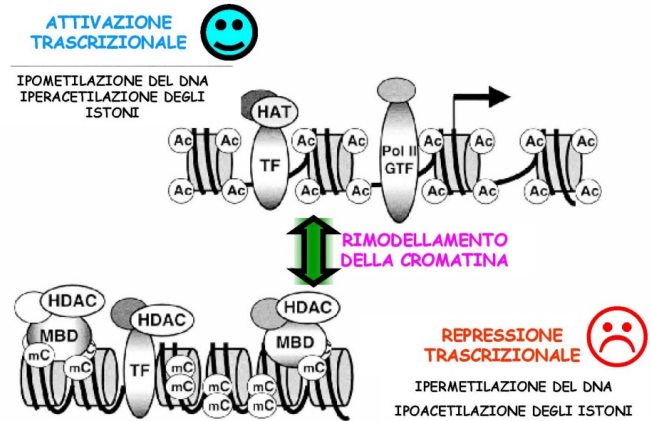
# ACETILAZIONE/DEACETILAZIONE ISTONICA (K)

Enzimi responsabili:

- ISTONE ACETILTRANSFERASI (HAT)
- ISTONE DEACETILASI (HDAC)

→ Acetilazione degli istoni = decondensazione della cromatina → favorito docking TFs

→ ipoacetilazione: repressione trascrizionale per inaccessibilità TFs

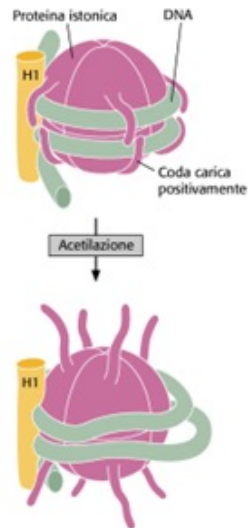


## METILAZIONE ISTONICA (K e R)

Enzimi responsabili:

- ISTONE LISINA METILTRASFERASI (HKMT) mono-, di- e trimetilazione
- ARGININA METILTRASFERASI (PRMT) mono- e dimetilazione
- ISTONE DEMETILASI (HDM)

→ attivazione o repressione trascrizionale, a seconda della posizione del residuo metilato, NO codice istonico preciso!



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

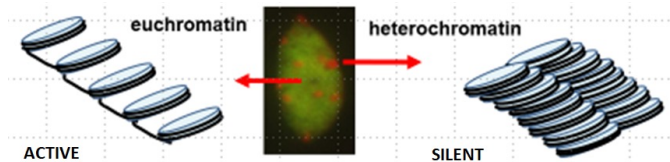
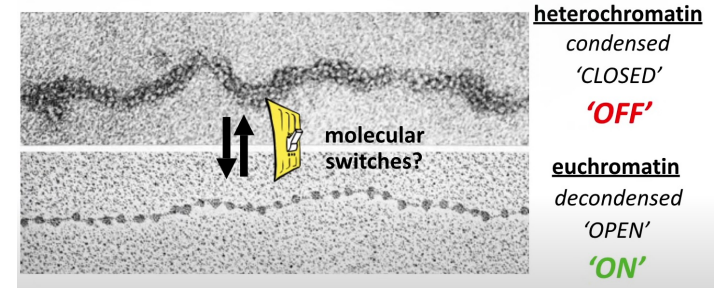
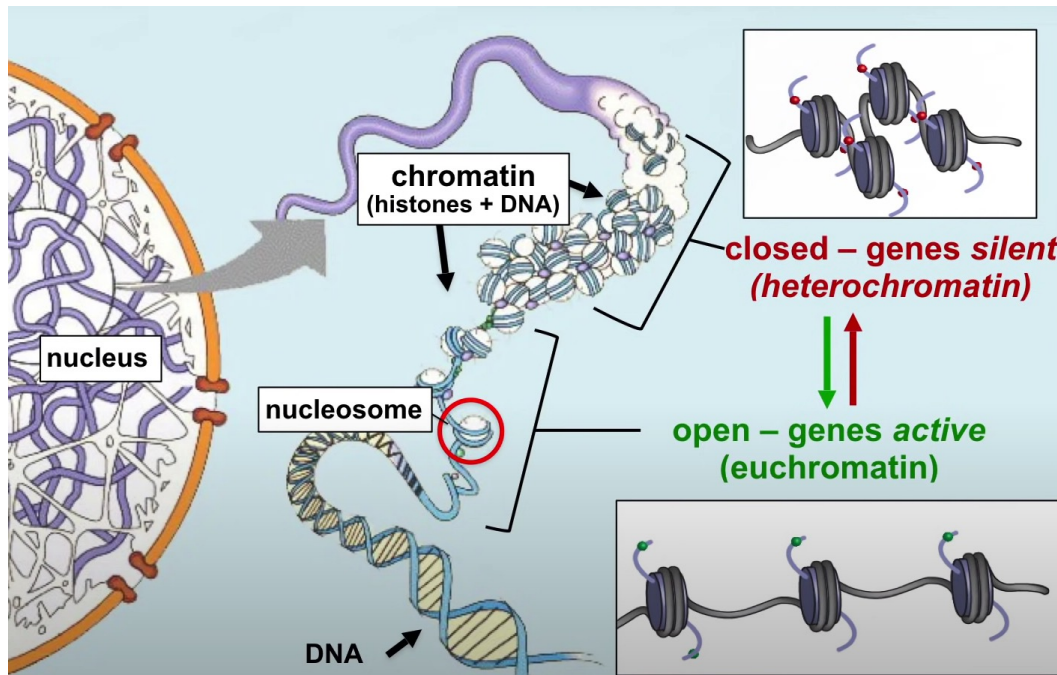


# GLI STATI DELLA CROMATINA

**ETEROCROMATINA:** condensata → NO trascrizione, geni silenziati

**EUCROMATINA:** de-condensata → SI trascrizione, geni attivi

EPIGENETICA è INTERRUTTORE MOLECOLARE!



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

### 3) RNA NON CODIFICANTI:

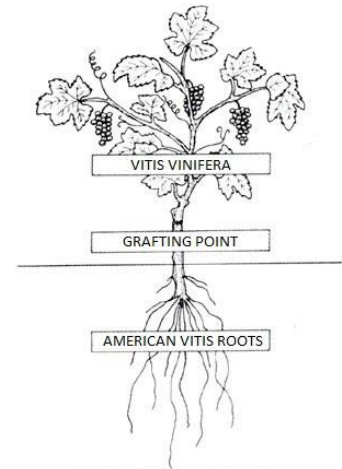
- Trascritti genici che non vanno incontro a traduzione: «Small interfering RNA o siRNAs»
- Si associano alla cromatina per controllare la localizzazione delle modificazioni epigenetiche e la lettura del DNA
- RNA-directed DNA methylation (RdDM), Wassenger 1994 - solo piante - «Piccole molecole di RNA non codificanti dirigono l'aggiunta di gruppi metile su specifiche sequenze di DNA (CG, CHG, CHH)»

IN PIANTA anche **POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING!**

Down-regolazione tramite miRNAs (18-22 nucleotidi)  
di specifici geni target → fine regolazione dell'espressione genica

miRNAs → molecole segnale, movimento a lungo raggio via floema  
**DIMOSTRATO PASSAGGIO PORTINNESTO-NESTO**

Ruolo in molti processi metabolici (sviluppo, risposta a stress, differenziazione tessuti...)



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# RUOLO DELL'EPIGENETICA NELLE PIANTE

PIANTE: ORGANISMI SESSILI

- Rapide risposte adattative all'ambiente
- Plasticità fenotipica

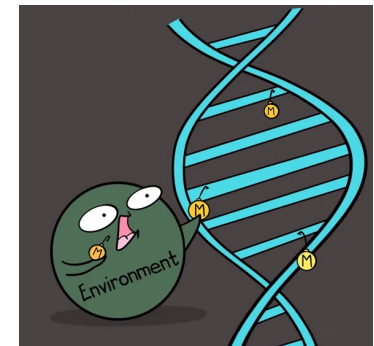
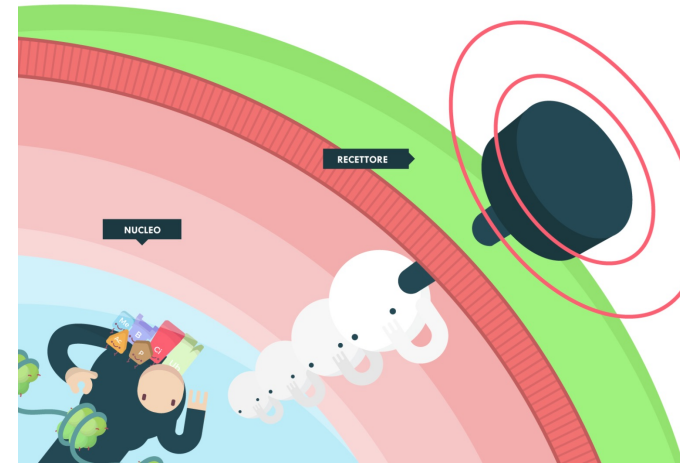
Livello di metilazione nelle piante:

Da 6% in *Arabidopsis thaliana* a 25% in *Zea mays*

Modifiche epigenetiche coinvolte in svariati processi tra cui:

- Crescita e sviluppo delle piante
- Attivazione meccanismi di difesa da stress biotici e abiotici (carenza idrica, tolleranza alla salinità, acclimatazione al freddo...)

Risposta specifica secondo organo, tessuto, età...



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

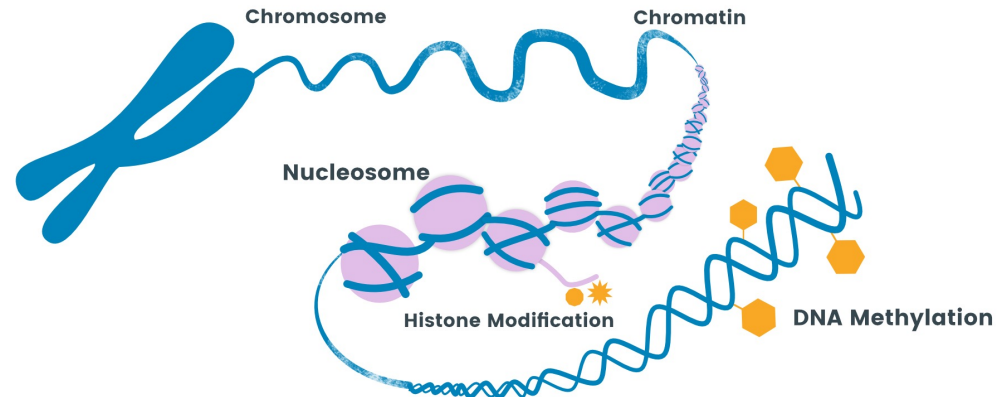
# MODIFICHE EPIGENETICHE: SONO EREDITABILI?

«I cambiamenti epigenetici sono spesso temporanei e le piante possono tornare al fenotipo normale in modo relativamente semplice

**MA**

alcune modifiche possono essere di lunga durata e possono anche essere trasferiti durante la propagazione sessuale»

(Brettell e Dennis, 1991)



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

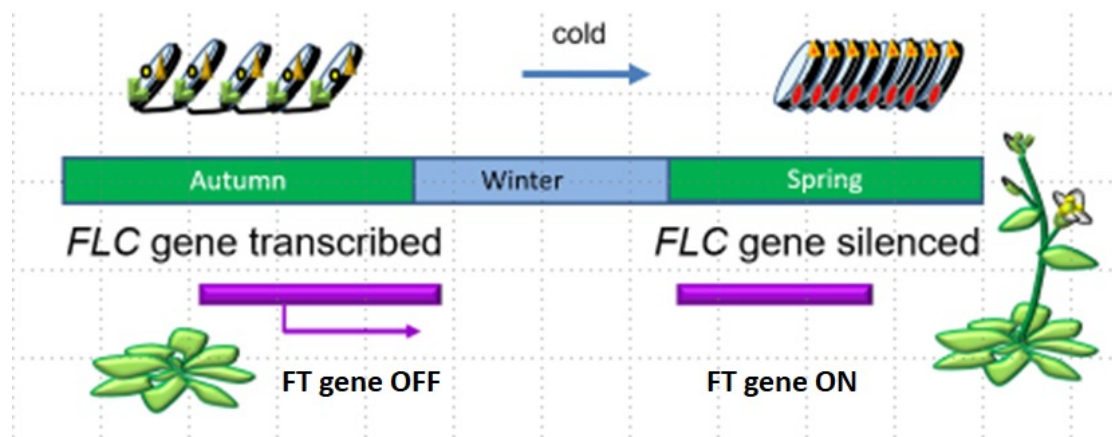
# MODIFICHE EPIGENETICHE: SONO EREDITABILI?

→ NO

gene FLOWERING LOCUS C (FLC) - Regolato tramite modifiche istoniche  
sensibile alla vernalizzazione, regolatore negativo della fioritura

se ON inibisce FT, gene attivatore della fioritura  
se OFF → FT attivo.

FLC viene riportato allo stato ON durante la riproduzione → EPIGENETIC RESETTING



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

# MODIFICHE EPIGENETICHE: SONO EREDITABILI?

→ SI

Modifiche epigenetiche trasmesse alla progenie

Ok per piante propagate in modo asessuato → es. cloni delle varietà di vite

Ricordo delle risposte ad un segnale dell'ambiente → memoria epigenetica (es. *Arabidopsis* «svedese»)

Concetto di «priming», fenotipo (+) conservato nelle generazioni successive  
→ vantaggio selettivo

## ALCUNI RISULTATI IN LETTERATURA:

Profilo di metilazione:

→ effetto vigneto = risposta specifica a ambiente (definizione di «terroir»)

→ omogeneità clonale, bassa variabilità genetica

 frontiers  
in Plant Science

ORIGINAL RESEARCH  
published: 30 October 2017  
doi: 10.3389/fpls.2017.01860



### Global DNA Methylation Patterns Can Play a Role in Defining Terroir in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Shiraz)

Huahan Xie<sup>1,2†</sup>, Moumouni Konate<sup>1,2†</sup>, Na Sai<sup>1,2,3</sup>, Kiflu G. Tesfamichael<sup>1,2</sup>, Timothy Cavagnaro<sup>2</sup>, Matthew Gilliam<sup>2,3</sup>, James Breen<sup>4,5</sup>, Andrew Metcalfe<sup>6</sup>, John R. Stephen<sup>7</sup>, Roberta De Bei<sup>2</sup>, Cassandra Collins<sup>2</sup> and Carlos M. R. Lopez<sup>1,2\*</sup>

Plant Cell Reports (2021) 40:111–125  
<https://doi.org/10.1007/s00299-020-02617-w>

ORIGINAL ARTICLE



### Vineyard environments influence Malbec grapevine phenotypic traits and DNA methylation patterns in a clone-dependent way

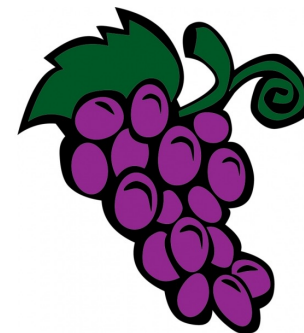
Anabella Varela<sup>1</sup> · Verónica N. Ibañez<sup>1</sup> · Rodrigo Alonso<sup>2</sup> · Diego Zavallo<sup>3</sup> · Sebastián Asurmendi<sup>3</sup> · Sebastián Gomez Talquenca<sup>4</sup> · Carlos F. Marfil<sup>1,5</sup>  · Federico J. Berli<sup>1,5</sup> 



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

# LA VITE: PIANTA MODELLO PER STUDI DI EPIGENETICA ED EPIGENOMICA



- Piante legnose perenni → alta % C-met → alta influenza epigenetica  
No disponibilità mutanti (≠ da *Arabidopsis*/pomodoro...): pochi studi!
- Propagata asessualmente → ereditabilità delle modifiche epigenetiche
- Disponibilità di cloni → variabilità intra-varietale
- Concetto di «Terroir» in viticoltura → condizioni di crescita altamente variabili, differenze macroscopiche a livello mondiale → plasticità fenotipica, adattamento ambientale
- Invaiaitura → epigenetica ha ruolo?
- Utilizzo portinnesti → movimento smallRNAs tra radici e parte aerea!

 **frontiers**  
in Plant Science

PERSPECTIVE  
published: 06 February 2017  
doi: 10.3389/fpls.2017.00082



## Plant Stress Responses and Phenotypic Plasticity in the Epigenomics Era: Perspectives on the Grapevine Scenario, a Model for Perennial Crop Plants

Ana M. Fortes<sup>1\*</sup> and Philippe Gallusci<sup>2\*</sup>



**fondazione banfi**

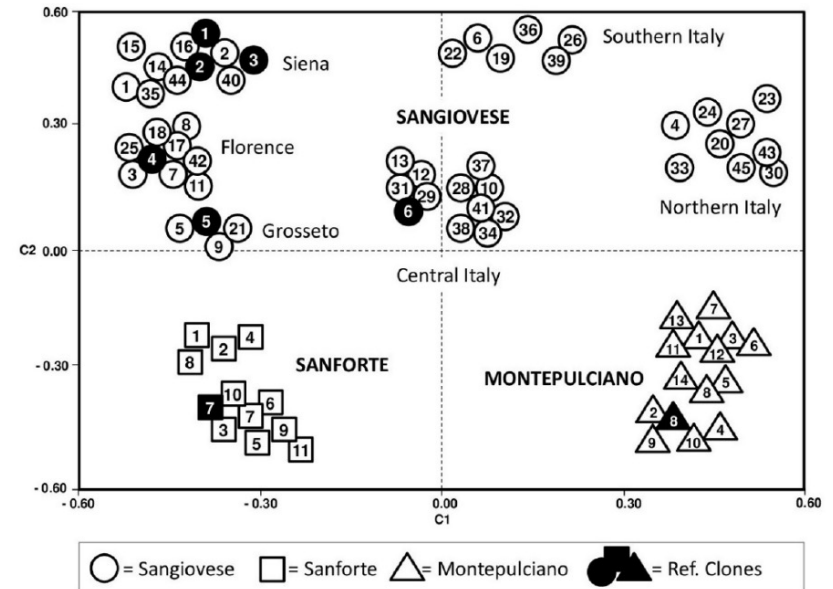
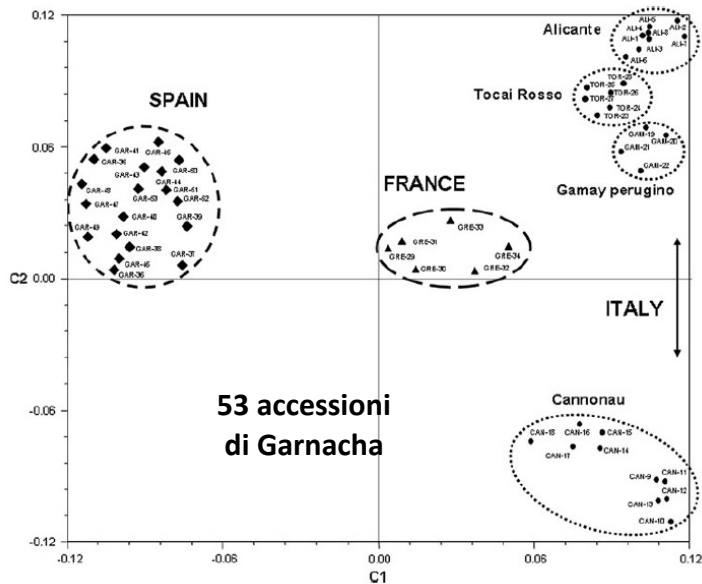
SANGUIS JOVIS

# EPIGENETICA E CLONI DI VITE

Differenze tra cloni e differenze «geografiche» intravarietali già ben individuabili utilizzando combinazioni di marcatori molecolari  
 es. MSAP (methyl-sensitive amplified length polymorphism)

«clone-dependent DNA methylation patterns»

**Fenotipo → Genotipo/Epigenotipo x ambiente**





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

## Schema sperimentale

6 «cloni»: 5 cloni RNVV, 1 biotipo UNIBO

2 ambienti di origine: Montalcino, Romagna

2 stagioni vegetative: annata 2019, annata 2020

3 fasi fenologiche di maturazione: fine invaiatura, metà maturazione, vendemmia

3 repliche biologiche di 100 acini, per analisi epigenetiche e per fenotipizzazione



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



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI MILANO

## Date di campionamento 2019/2020:

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

## Differenze fra le annate:

Stagioni simili a livello termico, simili giorni con ondate di calore (+35° e +40° C)  
MA apporto idrico delle piogge più scarso nel 2020

- ± 15 giorni di differenza tra le date di campionamento di tutte le 3 fasi fenologiche
- intervallo di giorni tra fine invaiatura e raccolta comunque costante (45 giorni)

**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.



**fondazione banfi**

SANGUIS JOVIS

## Dati fenotipici rilevati sulle uve:

Peso medio acino

Analisi tecnologiche (zuccheri, AT, pH)

Analisi fenoliche (metodo Glories)

Quadro polifenolico HPLC

## Differenze evidenziate:

Buona separazione tra zone di origine in entrambe le annate

Differenze tra cloni non evidenti in fase INVAIATURA

→ Buona separazione a METÀ MATURAZIONE e VENDEMMIA

Cloni con comportamento più affine entro zone:

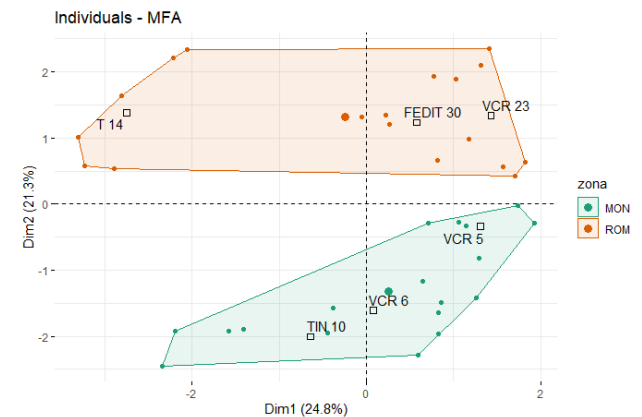
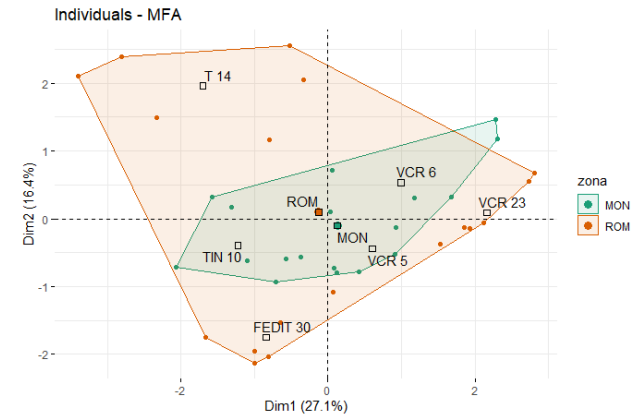
Romagna → FEDIT 30, VCR23

Montalcino → VCR6, TIN10

**ANALISI EPIGENETICHE IN CORSO!!**



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

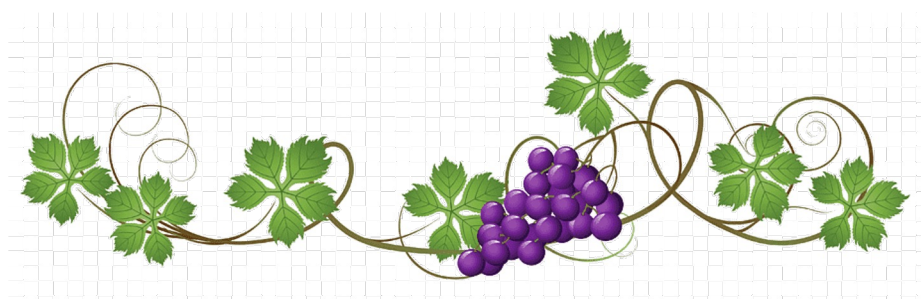


# PROSPETTIVE FUTURE

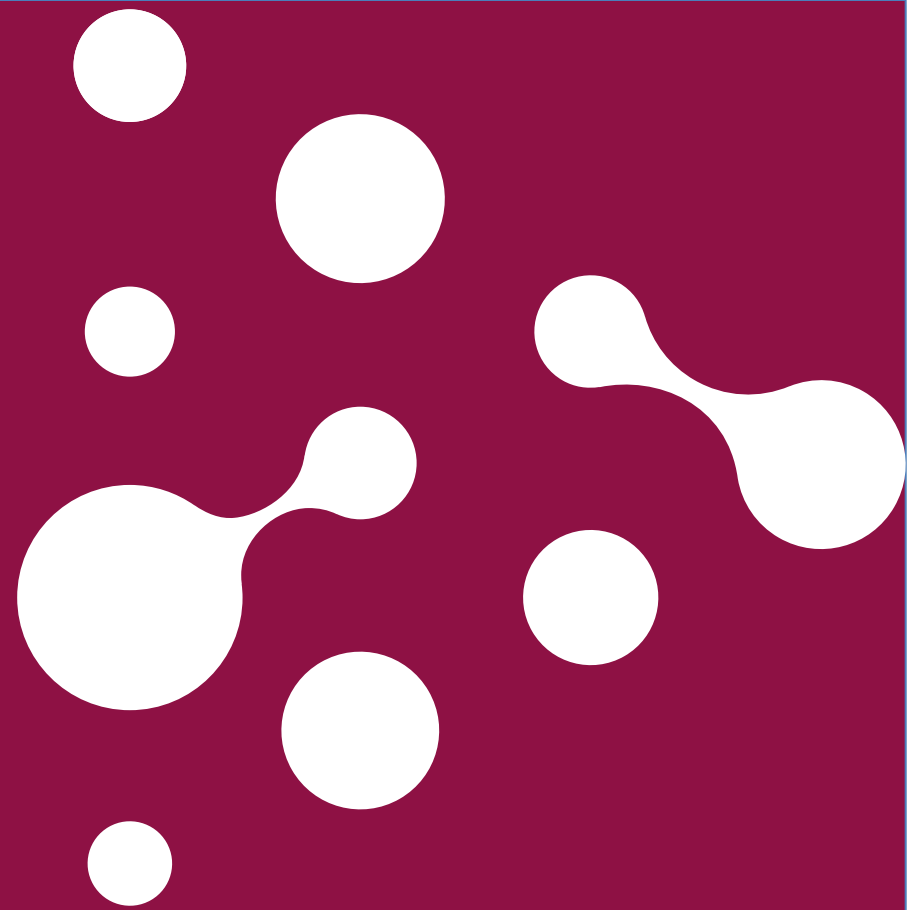
- NUMEROSI STUDI IN CORSO
- Scoprire epigenetic marks
- Es. risposta agli stress (per ora NON NOTI!)



- OBIETTIVI
- Sfruttare epigenetica per modulare l'espressione di un gene, senza modificare la sequenza: Editing epigenetico? Epimutagenesi?
- RNA interference → biopesticidi target-specifici
- Programmi di breeding molecolare per il miglioramento genetico
- Epigenetica clonale (EPICLONI): diversità intravarietale, ricerca cloni resilienti con variabilità «naturale» e tratti fenotipici desiderabili (EPILOCI)



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE!**



**[alessandra.zombardo@crea.gov.it](mailto:alessandra.zombardo@crea.gov.it)**



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

**[fondazionebanfi.it](http://fondazionebanfi.it)**