

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente
DAFNAE

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**MIGLIORAMENTO GENETICO ASSISTITO PER LA RESISTENZA
ALLE MALATTIE IN VITE**

Relatore: Prof.ssa Margherita Lucchin

Correlatore: Dott.ssa Maria Stella Grandò

Laureando: Alessandro Popoli

Matricola n. 1011058

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

INDICE

| | pag. |
|--|-----------|
| RIASSUNTO | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. INTRODUZIONE | 7 |
| 1.1. LA VITE | 7 |
| 1.1.1. SITEMATICA DELLA VITE | 8 |
| 1.1.2. MORFOLOGIA | 9 |
| 1.2. LA PERONOSPORA | 11 |
| 1.2.1. SINTOMATOLOGIA E DANNI | 11 |
| 1.2.2. CICLO BIOLOGICO | 13 |
| 1.3. L'OIDIO | 14 |
| 1.3.1. SINTOMATOLOGIA E DANNI | 14 |
| 1.3.2. CICLO BIOLOGICO | 15 |
| 1.4. METODI TRADIZIONALI DI DIFESA DA PERONOSPORA E OIDIO | 17 |
| 1.5. IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE | 19 |
| 1.5.1. L'IMPORTANZA DELLA PIRAMIDAZIONE | 22 |
| 1.5.2. MARCATORI MOLECOLARI PER LE RESISTENZE AI PATOGENI IN VITE | 23 |
| 1.5.3. RICONOSCIMENTO E RESISTENZA AI PATOGENI | 25 |
| 1.5.4. RESISTENZA ALLA PERONOSPORA | 28 |
| 1.5.5. RESISTENZA ALL'OIDIO | 29 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | 31 |
| 3. MATERIALI E METODI | 33 |
| 3.1. ORGANIZZAZIONE DEL LAVORO DI PIRAMIDAZIONE. INCROCI E CAMPIONI ANALIZZATI | 33 |
| 3.2. CAMPIONAMENTO | 35 |
| 3.3. ESTRAZIONE DNA | 36 |
| 3.4. PCR | 37 |

| | pag. |
|--|-----------|
| 3.5. LETTURE DEI RISULTATI | 38 |
| 3.5.1. ELETTROFORESI MICROCAPILLARE | 38 |
| 3.5.2. ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO | 39 |
| 3.6. ANALISI FENOTIPICA DELLE RESISTENZE | 39 |
| 3.6.1. INOCULO SU DISCHETTI FOGLIARI PER LA RESISTENZA A PERONOSPORA | 39 |
| 3.6.2. INOCULO SU PIANTA INTERA PER LA RESISTENZA A PERONOSPORA | 41 |
| 3.6.3. VALUTAZIONE RESISTENZA AD OIDIO | 41 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE | 43 |
| 4.1. UTILIZZO DI DIVERSI KIT DI ESTRAZIONE DEL DNA | 43 |
| 4.2. ANALISI MOLECOLARI DEI CAMPIONI | 43 |
| 4.2.1. BRONNER X REGENT | 44 |
| 4.2.2. SOLARIS X REGENT | 45 |
| 4.2.3. BC4 X KISHMISH VATKANA | 45 |
| 4.2.4. MONICA X PETRA | 46 |
| 4.3. ANALISI FENOTIPICHE DEI CAMPIONI | 47 |
| 4.3.1. OSSERVAZIONI SUL CONFRONTO TRA I DUE TEST DI INFEZIONE PER LA RESISTENZA A PERONOSPORA | 51 |
| 4.4. CONFRONTO FRA ANALISI FENOTIPICHE E GENOTIPICHE | 53 |
| 5. CONCLUSIONI | 56 |
| BIBLIOGRAFIA | 58 |

RIASSUNTO

Le gravi patologie della vite arrivate dal nuovo continente nel diciannovesimo secolo, come fillossera, oidio e peronospora, hanno stimolato la ricerca nel genere *Vitis* di fonti di resistenza a queste avversità, per avviare il miglioramento genetico delle varietà coltivate attraverso l'ibridazione, il *backcrossing* e la selezione. Questo processo si è dimostrato col tempo lento e laborioso, in parte a causa della complessa genetica che caratterizza la vite (elevata eterozigosi, tempi lunghi di generazione), in parte per la scarsità di mezzi disponibili che consentissero una valutazione rigorosa dei caratteri di resistenza e di qualità ricercati nella progenie.

Grazie alle nuove tecnologie e, conseguentemente, ad un rapido sviluppo del sapere scientifico, si è assistito negli ultimi anni ad un aumento significativo delle conoscenze sui meccanismi molecolari e genetici che regolano i processi di resistenza nelle piante. I nuovi strumenti hanno così consentito lo sviluppo di un approccio di miglioramento varietale molto più veloce e sicuro, basato sulla possibilità di rilevare e riconoscere direttamente la composizione del genoma, consentendo una selezione basata sulla conoscenza invece che su criteri empirici. Anche i programmi di miglioramento genetico della vite hanno tratto grande beneficio dai nuovi metodi molecolari: dai primi anni del duemila ad oggi, molti sono i QTL di resistenza scoperti, marcati e mappati nel genoma di diverse specie di *Vitis*. Si prospettano quindi oggi le possibilità di mettere a punto un processo di selezione assistita esclusivamente attraverso il riconoscimento di specifici marcatori molecolari.

In quest'ottica si analizzano qui le tappe ed alcuni risultati di un processo di miglioramento genetico della vite, svolto presso la fondazione E. Mach di San Michele all'Adige, che coniuga metodi molecolari ad osservazioni fenotipiche più tradizionali.

ABSTRACT

Since dangerous and undesirable grapevine diseases incoming from North America, during nineteenth century, as phylloxera, powdery mildew and downy mildew, breeders are searching *Vitis* genotypes conferring resistance that could be used for grapevine breeding programs. The principals and problems underlying classical breeding for wine grapes, e. g., a long generation cycle, high heterozygosity and inbreeding depression, as well as the complexity of traits resulted in purely empirical grapevine breeding and caused slow progress for decades.

In recent years, thanks to new technologies and, consequently, to a rapid development of scientific knowledge, comprehension of molecular and genetic mechanisms regulating resistance in plants significantly increased. New tools opened up novel means to depict genetics, leading a shift from empiric to knowledge based breeding. That allowed a breakthrough in grapevine breeding too: in the last 15 years many major resistance QTLs are detected, marked and mapped in the genomes of different species of *Vitis*. The possibility of evolving a breeding process using only Marked-Assisted Selection (MAS) is not far from becoming reality.

In this context we will analyze here the steps and some partial results of a grapevine breeding process, took place at the E. Mach Foundation in San Michele all'Adige (TN), which combines MAS methods with traditional empiric breeding methods.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA VITE

Il genere *Vitis* ha tre grandi centri d'origine: uno nell'America settentrionale (e in parte di quella centrale), il secondo nell'Asia orientale e il terzo euroasiatico, che comprende la vite comune, detta appunto vite eurasiatica (*Vitis vinifera* L.), oggi largamente coltivata in tutto il mondo. Tale specie, tendenzialmente spontanea in Europa, è probabilmente una pianta autoctona, visti gli abbondanti ritrovamenti di resti fossili riconducibili al genere *Vitis* risalenti al Miocene e Pliocene, e poi, dall'era quaternaria, di reperti di *V. vinifera* vera e propria.

Il rapporto tra vite e uomo ha origini molto lontane nel tempo. Fin dai primordi dell'agricoltura viene coltivata per il consumo diretto di uva; ma è probabilmente dalla fine del neolitico, in seguito forse ad una accidentale fermentazione di uva conservata in rudimentali recipienti, che l'uomo ha scoperto la possibilità di produrre il vino. Col passare del tempo questa bevanda ha assunto significati e sfumature che vanno ben oltre l'aspetto agroalimentare, acquisendo importanza dal punto di vista sociale, culturale e religioso.

I primi riferimenti storicamente certi che provano una diffusa coltivazione dell'uva sono imputabili ai Sumeri; anche gli egizi ci tramandano una vasta collezione di rappresentazioni che ne dimostrano l'utilizzo. Furono invece i greci che la importarono in Europa, in particolar modo in Italia, durante il periodo della Magna Grecia, diffondendola attraverso le proprie colonie in Sicilia e in altre zone del meridione. Gli Etruschi e, successivamente, i Romani, perfezionarono la pratica della viticoltura arricchendo contemporaneamente il patrimonio varietale.

Nel XIX secolo comparve in Europa la fillossera della vite (*Daktulosphaira vitifoliae* F.), un afide appartenente alla famiglia delle *Phylloxeridae* proveniente dal Nord America, che si diffuse assai rapidamente in tutte le zone agricole vocate alla viticoltura, dimostrandosi un patogeno micidiale per la vite europea. Infatti le radici di quest'ultima, a differenza di quella

americana, sono estremamente sensibili alla colonizzazione dell'insetto, che durante il suo ciclo vitale passa un periodo dello sviluppo ipogeo; la pianta deperisce velocemente andando incontro ad avvizzimento e morte. La soluzione definitiva al problema, a cui si giunse invero dopo non poco tempo, passando per una serie di misure contenitive che si dimostrarono inefficaci, arrivò con la diffusione generalizzata dell'innesto della cultivar europea su portainnesti americani resistenti. Tale metodo, semplice ed economico quanto efficace, è in vigore tutt'ora e annoverato come una pratica agricola di base.

Ma, a parte il caso particolare della fillossera, altre patologie della vite importate dal nuovo continente flagellano ancora le coltivazioni di tutto il mondo, sebbene nel corso dell'ultimo secolo l'uomo abbia messo in atto molte strategie di contrasto più o meno efficaci. Sempre verso la metà dell'ottocento abbiamo le prime testimonianze di diffusione dell'oidio (*Uncinula necator* S., detto anche mal bianco della vite), un fungo che attacca l'apparato fogliare della pianta. Nel 1878 arriva invece la Peronospora (*Plasmopara viticola* B.), un oomicete che colonizza tutte le parti verdi della vite.

La portata e la diffusione di queste due epidemie, che insieme rappresentano la principale causa di perdita di produzione in vite, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, è tale da giustificare l'ingente spiegamento di mezzi, energia e manodopera che oggi vengono utilizzati per il contrasto, sia esso chimico o di altra natura. Considerando l'elevato costo economico che la lotta di questi parassiti comporta, e alla luce della recente consapevolezza riguardo la necessità di tutelare l'ecosistema naturale, fortemente influenzato dallo stato dell'ecosistema agrario, che negli ultimi cinquant'anni ha subito gravi danni a causa dell'abbondante utilizzo di prodotti chimici, sembra fondamentale oggi una ricerca che porti alla selezione di varietà resistenti senza intaccare la qualità o la capacità produttiva.

1.1.1 SISTEMATICA DELLA VITE

Quando si parla in maniera generica di vite si intende solitamente la vite europea, l'unica specie che cresce spontaneamente in Europa e nel bacino del Mediterraneo, sua zona di naturalizzazione. Secondo la classificazione botanica si tratta della specie *Vitis vinifera* L., appartenente all'ordine delle *Rhamnales*, famiglia delle *Vitaceae* (o *Ampelidaceae*), sottofamiglia delle *Ampelideae* (o *Vitoideae*), genere *Vitis*. Questo genere è stato a sua volta

suddiviso in due sottogeneri, ossia *Muscadinia* ed *Euvitis* (Planchon 1887), poiché l'interfertilità tra i membri di sottogeneri diversi è assai scarsa: infatti i membri del sottogenere *Muscadinia* hanno un numero cromosomico $n=20$, mentre quelli appartenenti al sottogenere *Euvitis* $n=19$ (Eynard 2005). Al primo gruppo appartengono solo tre specie di origine americana (*V. munsoniana*, *V. rotundifolia*, *V. popenoei*), distinguibili dalle *Euvitis* per i tralci sprovvisti di lenticelle, i viticci semplici e per l'assenza di diaframma in corrispondenza dei nodi. Il secondo comprende 62 specie di origine americana ed eurasiatica tutte interfertili tra loro, raggruppate in base all'origine geografica e alla morfologia in *Lambruscae*, *Lambruscoideae americanae*, *Aestivales*, *Cinerascentes*, *Rupestres*, *Ripariae*, *Lambruscoideae asiaticae* e *Viniferae*. La specie *Vitis vinifera* comprende due sottospecie: *V. vinifera silvestris* D. C., o vite selvatica, e *V. vinifera sativa* D.C. che comprende tutte le varietà coltivate, denominate vitigni. A loro volta le viti coltivate possono essere suddivise in viti orientali (viti caspiche e antasiatiche) e viti mediterranee (viti pontiche ed occidentali).

1.1.2 MORFOLOGIA

La vite è una pianta legnosa, arbustiva di tipo rampicante, coltivata con portamenti diversi nei vari territori, seguendo le differenti tradizioni locali. Le radici si distinguono tra fittonanti e avventizie, a seconda se discendenti dal meristema radicale embrionale, quindi dal seme, o da meristemi avventizi sui tralci. Poiché nella pratica viticola si utilizzano portainnesti moltiplicati per via vegetativa, le piante in coltura hanno solo radici avventizie, che si originano dai nodi (raramente dagli internodi) dei tralci. La direzione delle radici nel terreno, sebbene vari da specie a specie, è prevalentemente orizzontale, e lo strato di suolo interessato dalla colonizzazione radicale si trova di solito tra i 25-30 cm e i 60-80 cm.

Il fusto della vite coltivata generalmente non raggiunge grandi dimensioni e la sua lunghezza e forma variano in base al tipo di allevamento. La parte basale, di pochi decimetri di lunghezza, detta ceppo (o tronco) si divide in due o più branche. Questi elementi costituiscono il legno vecchio, ricoperto dalla corteccia chiamata ritidoma, che si sfalda longitudinalmente. Le branche portano rami di uno o due anni detti tralci, di natura erbacea e dal colore verde (rossastro in alcune specie americane), divisi in segmenti di varia lunghezza detti internodi (o meritalli), separati da nodi. Sui nodi si inseriscono le foglie, alla

base delle quali si trovano le gemme. Dal secondo o dal terzo nodo, sul lato opposto rispetto alla foglia, si ha la formazione di cirri (detti anche viticci) o dei meristemi sessuali che portano alla formazione dei grappoli. Anche le gemme possono essere differenziate in due tipologie: le gemme che si sviluppano nella stessa stagione in cui si sono formate, definite gemme pronte, formano germogli definiti femminelle (o rami anticipati), generalmente non fertili. Le gemme ibernanti invece, ossia quelle che si sviluppano la stagione successiva la loro formazione, danno origine a nuovi tralci. Sul finire della stagione estiva i tralci erbacei vanno incontro a lignificazione, un fenomeno definito maturazione o agostamento, incamerando sostanze di riserva al loro interno e rafforzando la parete esterna, in previsione del periodo di riposo invernale.

Le foglie della vite sono semplici, costituite da un lembo (o lamina) palminervio, sostenuto da un picciolo, definite alterne distiche in quanto disposte in due serie longitudinali diametralmente opposte. La forma e il colore della foglia sono un importante carattere tassonomico, anche se nella vite è presente una forte eterofillia, ossia la presenza di foglie di forma diversa sullo stesso tralcio. Il lembo è tipicamente pentagonale, suddiviso in 3 o 5 lobi (raramente 7 o 9) separati da seni più o meno profondi, ma si distinguono anche forme di tipo orbicolare (o tondeggianti), cuneiforme, cordiforme (a forma di cuore) e reniforme. Generalmente l'epidermide superiore è cutinizzata e priva di stomi, mentre la pagina inferiore risulta essere ricca di aperture stomatiche e generalmente tomentosa, in alcuni casi addirittura cotonosa.

I fiori sono raggruppati in un'infiorescenza detta racemo o grappolo composto, il cui asse principale, il rachide, si ramifica in racimoli e pedicelli, che portano i singoli fiori. Nelle varietà coltivate i fiori sono tipicamente ermafroditi, portati da un pedicello che si allarga fino al talamo fiorale. Su di esso troviamo, dall'esterno all'interno, un calice, di solito costituito da 5 sepali, la corolla, costituita da 5 petali tipicamente verdi, l'androceo, costituito da 5 stami alternati a 5 nettarii ed al centro il gineceo, caratterizzato da un ovario bicarpellare contenente normalmente 4 ovuli. Inoltre è riscontrabile, anche in alcune varietà di vite europee, la presenza di fiori unisessuali maschili, diffusi soprattutto nelle viti americane, e femminili, che devono essere fecondati con polline di viti differenti.

Il frutto, comunemente chiamato uva, è costituito da una infruttescenza derivata dalla fecondazione dell'infiorescenza precedentemente descritta, dove il raspo, ossia il complesso di ramificazioni, sostiene l'insieme dei singoli frutti, definiti acini. A livello botanico l'acino è una bacca, costituito da una buccia (o epicarpo) ricoperta da uno strato ceroso, nella quale sono contenute sostanze coloranti ed aromatiche e sulla quale attecchiscono i lieviti fondamentali per la vinificazione. Più internamente troviamo il mesocarpo, costituito da più di venti strati di cellule contenenti un succo particolarmente ricco di zuccheri ed acidi, il mosto. Infine nella porzione più interna, delimitato da uno strato di cellule, troviamo l'endocarpo, contenente i due semi chiamati vinaccioli.

1.2 LA PERONOSPORA

1.2.1 SINTOMATOLOGIA E DANNI

La peronospora è una delle principali patologie della vite ed è causata dall'oomicete biotrofico obbligato *Plasmopara viticola*, della famiglia delle *Peronosporaceae*. Questo patogeno penetra l'epidermide dell'ospite attraverso gli stomi e si diffonde nel sottostante tessuto parenchimatico infettando tutti gli organi erbacei. Un grappolo attaccato da peronospora non è più utilizzabile per il raccolto, poiché non termina lo sviluppo e marcisce. I danni fogliari invece influenzano la qualità degli acini, poiché portano ad una consistente riduzione dell'area fotosintetizzante a disposizione della pianta, diminuendo l'accumulo di zuccheri e aromi nei frutti.



Figura 1.1: rami sporangiofori di *P. viticola*
(da Sabine Wiedemann-Merdinoglu et al., 2013, *Development of a phenotyping platform to assess grapevine resistance to downy and powdery mildews*)

La peronospora riesce a penetrare nell'ospite solo quando gli stomi sono completamente sviluppati, quindi non prima che le foglie raggiungano un diametro minimo di 2 cm. I primi sintomi di colonizzazione del micelio nei tessuti sono caratterizzati da macchie color giallastro sulla pagina superiore della foglia, che, mano a mano che l'infezione progredisce, assumono un aspetto traslucido definito "a macchia d'olio". Quando l'umidità dell'aria

raggiunge valori sufficientemente elevati, in corrispondenza delle superfici infette (macchie d'olio) sulla pagina inferiore della foglia, avviene la sporulazione in seguito allo sviluppo di rami sporangiofori che fuoriescono dagli stomi. Nella fase finale la macchia d'olio necrotizza, causando disseccamenti che, nei casi di attacchi più acuti, possono portare alla perdita prematura dell'intera foglia.

L'infezione sui grappoli porta a conseguenze diverse a seconda del periodo. Se l'attacco avviene prima dell'allegagione, compaiono macchie livide e ipertrofie che deformano il peduncolo, il raspo e i racimoli, causando i tipici ripiegamenti ad uncino o a "S". Se le condizioni di umidità sono favorevoli, i grappoli si ricoprono in seguito di fruttificazioni del patogeno e seccano.

Dopo l'allegagione si possono manifestare due diverse sindromi, a seconda dello stadio di sviluppo del grappolo. Il marciume grigio si manifesta sui grappoli giovani, ancora tendenzialmente erbacei, con piccoli acini. Inizialmente si osserva una colorazione plumbea, poi, quando i rami sporangiofori cominciano a uscire dagli stomi e a colonizzare la superficie, l'acino assume la colorazione grigia da cui il nome.

Sui grappoli vecchi gli stomi dei frutti degenerano, impedendo di fatto l'accesso del patogeno, che penetra dal pedicello (su cui è possibile osservare sporulazione e necrosi prima della comparsa di sintomi sull'acino). Da qui l'oomicete si sviluppa nell'acino, ma non può sporulare senza la presenza di stomi funzionali. Sebbene l'acino viri verso una colorazione bruna e marcescente, non appaiono mai le fruttificazioni bianche del fungo all'esterno, per questo motivo il fenomeno è detto "peronospora larvata". Questa sindrome è definita "marciume bruno". Quest'ultimo caso avviene con minor frequenza del precedente, poiché la peronospora, che richiede forte umidità per proliferare, riesce ad attaccare i grappoli a stadio così avanzato solo in estati fresche e piovose.

Ogni organo verde con stomi differenziati e attivi è un potenziale bersaglio della peronospora. In caso di infezioni precoci sui germogli, la parte terminale del tralcio o del viticcio presenta un portamento contorto, legato a fenomeni di ipertrofia cellulare.

Nel complesso, i danni da peronospora dipendono, come si è visto, dalla fase fenologica e dal momento dell'infezione. Le epidemie di peronospora riducono le riserve nutritive della pianta, determinando una potenziale perdita di produzione anche nelle annate successive, oltre che uno stato di generale deperimento che rende le colture più suscettibili ad altre malattie.

1.2.2 CICLO BIOLOGICO

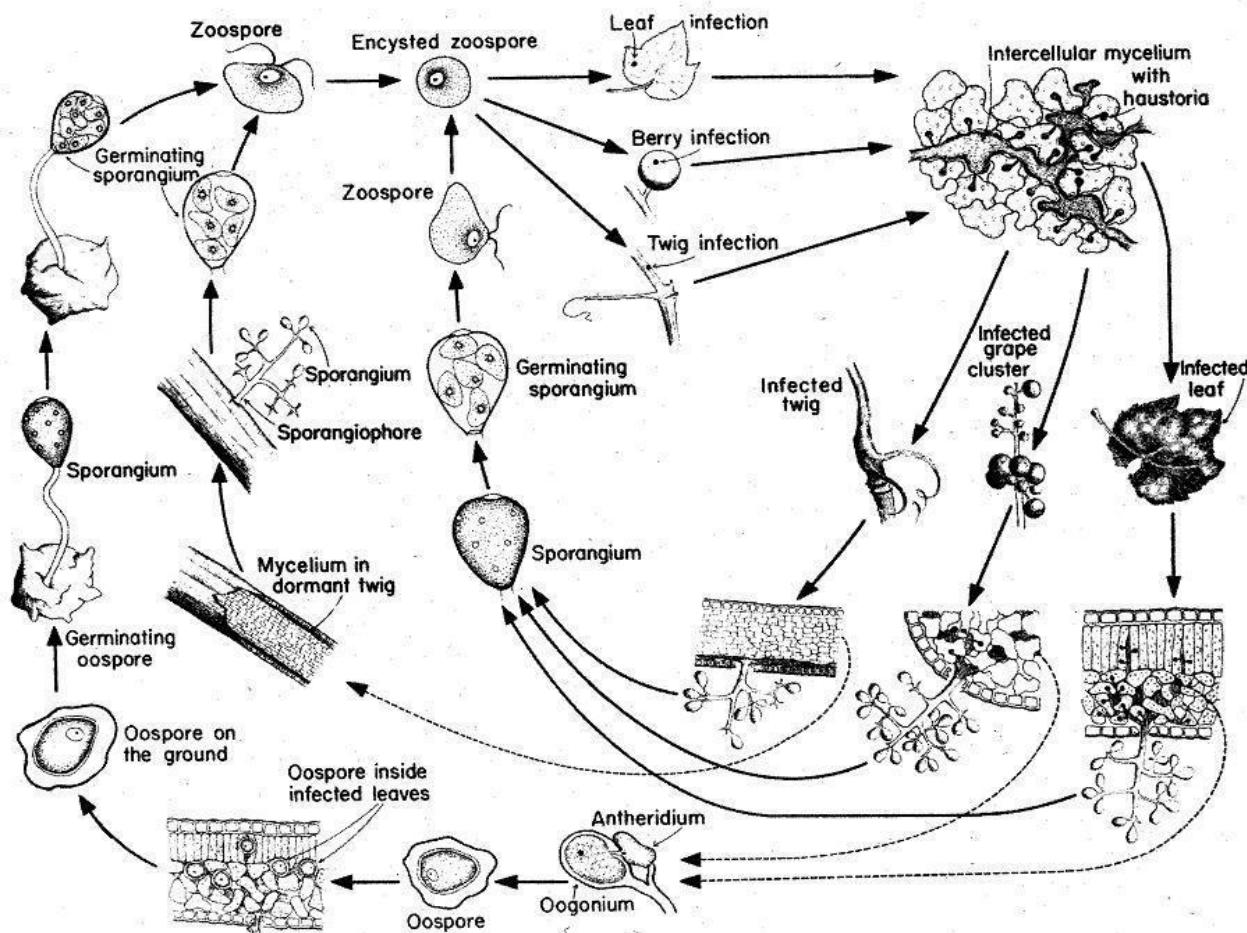


Figura 1.2: Ciclo Biologico di *P. viticola*
(Compendium of grape diseases, 1988)

P. viticola supera l'inverno grazie alle oospore (spore di conservazione sessuale, resistenti a condizioni avverse) che rimangono sul terreno, insieme alle foglie cadute, finché le condizioni non sono favorevoli alla germinazione (temperatura media giornaliera = 10°C; 10 mm di pioggia caduta in 24 h; lunghezza minima dei tralci non inferiore ai 10 cm). La germinazione dà luogo a un macrosporangio che libera zoospore flagellate, che passano dal terreno alla superficie verde della pianta grazie a schizzi d'acqua e a movimenti dell'aria. In

presenza di bagnatura si ha a questo punto l'infezione primaria: la zoospora emette un tubo micelico che penetra attraverso gli stomi e comincia la colonizzazione dei tessuti.

Dopo un periodo di incubazione variabile, a seconda delle condizioni, abbiamo la comparsa dei primi sintomi, dopo dei quali, se accompagnati da prolungate bagnature notturne, inizia il ciclo secondario: i rami conidiofori fuoriescono dagli stomi e producono conidi asessuati, che possono portare a numerose e dannose infezioni secondarie, anche con piogge di lieve entità.

1.3 L'OIDIO

1.3.1 SINTOMATOLOGIA E DANNI

L'agente patogeno specifico responsabile dell'oidio è il fungo ascomicete *Erysiphe necator*, della famiglia delle *Erysiphaceae*. Questo fungo ascomicete è un parassita obbligato delle *Vitaceae* e, al pari della peronospora, è da considerare una malattia che ha gravi ripercussioni sulle potenzialità produttive della vite.

I sintomi sulle foglie si manifestano con la comparsa di aree più chiare sulle quali inizialmente si crea una patina biancastra evanescente ed in seguito un'efflorescenza polverulenta. Con l'evolvere della malattia, e in caso di forti attacchi, compaiono imbrunimenti in corrispondenza delle nervature e punteggiature necrotiche. Le foglie possono presentare margini increspatis (ripiegamenti della lamina fogliare in una tipica conformazione "a coppa") e bollosità a causa dell'accrescimento differenziato tra tessuti sani e malati e possono cadere prematuramente.

L'oidio può colpire anche i tessuti giovani dei tralci che, in seguito alla necrosi delle cellule superficiali, dovuta all'azione del patogeno, presentano delle aree brune reticolate. Normalmente i sintomi sui tralci compaiono in caso di forti attacchi. Sui germogli il danno è causato dalla rapida colonizzazione dei tessuti da parte del micelio svernante, protetto dalle perule all'interno delle gemme: in primavera i germogli infetti sono precocemente ricoperti da un'abbondante muffa biancastra e polverulenta e, poiché lo sviluppo della lamina fogliare è modificato dall'attività del patogeno, assumono un aspetto particolare definito "germogli a bandiera".

I sintomi più gravi della malattia si hanno sulle infiorescenze. Gli attacchi precoci spesso causano aborto florale, mentre inibiscono la crescita dei grappolini che riescono ad allegare. In seguito ad infezioni post-fiorali, invece, le cellule dell'epidermide degli acini colpiti necrotizzano, non assecondando più la crescita in volume della polpa. Questo può portare a fessurazioni dell'acino, aprendo la strada ad altre



*Figura 1.3: efflorescenza biancastra di E. necator su grappolo in via di sviluppo
(image from Wikipedia, author: Maccheek. Used under the terms of the GNU Free Documentation License)*

infezioni, tipicamente di muffa grigia. Se gli attacchi sono più deboli o tardivi, invece, l'acino non viene totalmente compromesso, ma si ha la formazione di punteggiature e imbrunimenti, accompagnati dalla classica efflorescenza biancastra.

I danni diretti e indiretti sono molteplici: l'oidio, come la peronospora, è in grado di colpire tutti i tessuti verdi della vite. In genere gli attacchi del fungo, anche se molto gravi, non portano mai direttamente alla morte della pianta. Ne riducono però fortemente la produttività e lo sviluppo vegetativo, favorendo altri patogeni e rendendola più sensibile agli stress ambientali.

I germogli ed i tralci infetti non si sviluppano adeguatamente e sono più deboli, mentre le foglie hanno minore capacità fotosintetica e ridotto accumulo di fotosintati. I fiori si deformano, producono poco polline e danno origine a grappoli con pochi acini; in casi estremi si può avere la perdita totale della produzione in seguito al disseccamento dell'intero grappolo. La riduzione dell'accumulo di zuccheri danneggia la qualità dell'uva alla raccolta e ne ritarda la maturazione; questo fenomeno è accentuato se è presente filloptosi anticipata causata da attacchi precoci e violenti.

1.3.2 CICLO BIOLOGICO

L'oidio compare nei vigneti in due forme: un ascomicete produce corpi fruttiferi contenenti gli aschi con le ascospore nella fase gamica, mentre forma i conidi nella fase agamica.

Il patogeno è un ectoparassita obbligato: lo sviluppo del micelio avviene esclusivamente sulla superficie vegetale e mai all'interno, in cui penetra limitatamente per la produzione di austori atti all'assorbimento nutritivo.

L'oidio può trascorrere l'inverno in due differenti forme: come micelio all'interno delle gemme ibernanti (forma asessuata) o come cleistoteci (forma sessuata).

Lo svernamento come micelio indifferenziato nelle gemme è più comune ma è ostacolato da temperature invernali troppo basse; i cleistoteci vengono prodotti a fine estate un po' su tutta la superficie verde della pianta e si conservano sino alla primavera successiva quando, in condizioni favorevoli (temperatura di circa 10°C e presenza di leggera pioggia) si aprono, consentendo agli aschi in essi contenuti di liberare le ascospore, responsabili delle infezioni primarie. Le ascospore germinano producendo il micelio che, dopo aver aderito alla superficie delle cellule mediante gli appressori, invia gli austori nelle cellule iniziando il processo parassitario. Dopo un periodo di incubazione l'infezione diventa visibile sotto forma di micelio biancastro, dal quale si differenziano conidiofori e conidi che danno il via alle infezioni secondarie asessuate.

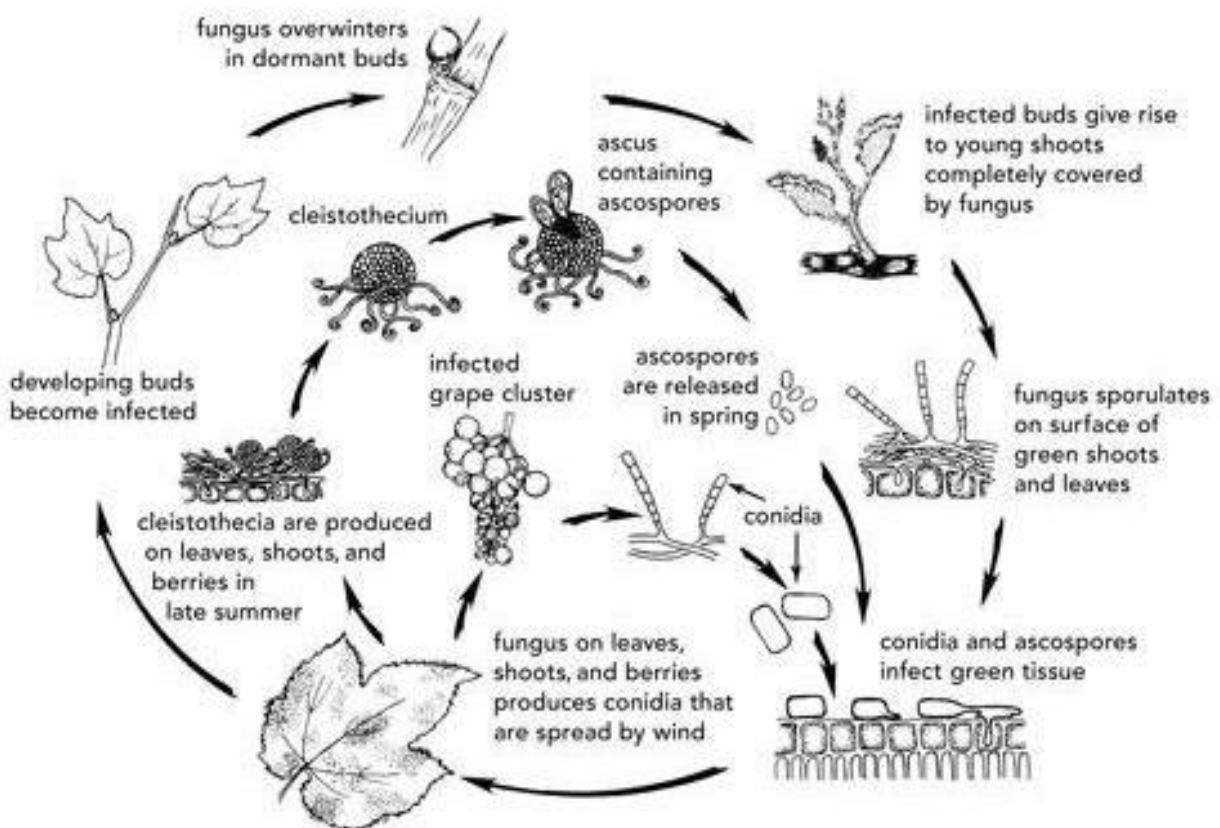


Figura 1.4: ciclo biologico di *E. necator*
(www.metos.at, 2013)

1.4 METODI TRADIZIONALI DI DIFESA DA PERONOSPORA E OIDIO

Vitis vinifera, come detto, non possiede resistenze genetiche a peronospora e oidio. Si è cercato quindi, fin dalla comparsa delle due malattie, di selezionare delle tecniche agronomiche che non favorissero la diffusione dei patogeni (irrigazione goccia a goccia per evitare di bagnare il fogliame, diradamento delle massa vegetale troppo fitta, ecc.). In contemporanea si è cercato di mettere a punto dei trattamenti chimici che consentissero un contrasto efficace delle infezioni senza pregiudicare allo stesso tempo la produzione e la qualità.

Il controllo della peronospora viene pianificato sulla base delle conoscenze biologiche ed epidemiologiche del patogeno: secondo la cosiddetta regola “dei tre dieci” (temperatura media giornaliera = 10°C; 10 mm di pioggia caduta in 24 h; lunghezza minima dei tralci non inferiore ai 10 cm) si può prevedere con sufficiente accuratezza l’aprossimarsi delle infezioni ed effettuare dei modelli previsionali, in relazione anche alla stima e all’andamento delle precipitazioni, in modo da prevenire eventuali infezioni secondarie, che frequentemente si manifestano dopo i nuovi piovvaschi. Il controllo si basa essenzialmente su ripetuti trattamenti fungicidi durante l’anno (utilizzando soprattutto prodotti a base rameica e vari principi attivi in continua evoluzione), effettuati a partire dallo stato di recettività al patogeno fino all’invaiaitura, in funzione della persistenza del fungicida e delle condizioni climatiche. Sebbene tale metodo di difesa sia ormai consolidato, esso comporta non pochi svantaggi come l’onere economico elevato da sostenere per i frequenti trattamenti, spesso necessari, che rappresentano il 50% del costo complessivo per la difesa del vigneto e l’utilizzo di alcuni prodotti, soprattutto quelli a base rameica, che possono causare fitotossicità e provocare la presenza, nel prodotto finito, di livelli di rame ben superiori alla media, spesso anche più di quanto consentito dalle norme vigenti (Cozzolino, 2004); in agricoltura biologica i limiti più circoscritti a cui i viticoltori devono sottostare rende ancora più difficile preservare i vigneti dal patogeno.

Le strategie contro l’oidio sono rese difficoltose dal complesso ciclo biologico ed epidemiologico del patogeno, in particolare dalla sua duplice modalità di svernamento. Il punto di partenza consiste nella valutazione del livello di rischio di una determinata zona,

che dipende meno, rispetto alla peronospora, dall'andamento climatico e più dalla stima del potenziale inoculo presente, in funzione dell'intensità delle infezioni verificatesi nelle annate precedenti. Nelle zone ad alto rischio, si procede di solito con un trattamento preventivo con prodotti di contatto (es. zolfo), da quando i germogli sono lunghi 3-5 cm fino alla formazione dei grappolini; in seguito si utilizzano prodotti sistemici fino alla prechiusura del grappolo. Nelle zone a basso rischio si tende ad intervenire cautelativamente in prefioritura per poi tenere conto dell'andamento climatico e dell'evolversi delle infezioni. In agricoltura biologica, nella stagione autunnale, si distribuiscono preparati a base di *Ampelomyces quisqualis*, un antagonista dell'oidio, con lo scopo di ridurre il potenziale di inoculo primaverile.

Un discorso a sé va fatto riguardo al pericolo derivante dall'uso di fungicidi chimici (e tutti i prodotti fitosanitari) per l'ambiente, la salute degli operatori e dello stesso consumatore finale. L'utilizzo ripetuto di questi composti, a dosaggi elevati e con trattamenti a volte più frequenti del necessario, provoca un riversamento di tali sostanze nelle falde acquifere e negli ecosistemi naturali alterandoli, riducendo le popolazioni di un certo numero di specie e spesso modificando il comportamento, la crescita e la capacità riproduttiva di organismi non target: un esempio sono gli effetti dannosi di alcuni fungicidi verso insetti utili come coccinellidi e acari fitoseidi (ma anche pesci, mammiferi, uccelli e invertebrati). Oltre alla riduzione della variabilità genetica, altri effetti ambientali dell'utilizzo sempre crescente di prodotti chimici in agricoltura sono i processi di eutrofizzazione delle acque e di alterazione fisica, chimica e biologica dei terreni, che ne compromettono stabilità e fertilità, spesso aprendo la strada a incontrollabili processi erosivi.

Per quanto riguarda l'uomo, le categorie sociali più esposte a questi prodotti (operatori, contadini, abitanti limitrofi) possono riscontrare un incremento di patologie, soprattutto epatiche, e neoplasie tumorali; ma anche il consumatore del prodotto finito rischia di venire a contatto e accumulare nel tempo residui di fungicidi e antiparassitari. È evidente, inoltre, che l'inquinamento delle falde acquifere e il deterioramento dell'ecosistema non può che portare, nel tempo, a un deterioramento progressivo e inesorabile della salute e della qualità della vita umana.

Per queste ragioni è oggi auspicabile un incremento nella ricerca e nella selezione di varietà che siano in grado di sopperire autonomamente alla necessità dei trattamenti fitosanitari, nel tentativo di ristabilire un equilibrio con l'ambiente circostante. La sfida è quella di sviluppare i caratteri genetici in grado di consentire alla pianta di resistere agli attacchi dei patogeni senza intaccarne la qualità e la capacità produttiva.

1.5 IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE

Sin dalla domesticazione della vite l'uomo ha compiuto vari tentativi per renderla via via più adatta alle sue esigenze. I primi passi in questa direzione, messi a punto in modo empirico e spesso accidentale, si fondarono sulla selezione e il discernimento delle piante i cui frutti meglio si adattavano alle sue percezioni e necessità pratiche (come la piacevolezza, la dolcezza, la facilità di coltivazione, una buona fermentescibilità delle uve, la regolarità produttiva).

Nel corso del tempo, mentre queste tecniche si affinavano e le varietà si perfezionavano e si differenziavano, si resero necessari nuovi criteri nella scelta delle viti migliori, specialmente in seguito all'aggravarsi dei danni causati dai fitofagi e dalle malattie crittogamiche. Come detto, questa necessità divenne emblematica con l'insorgenza delle nuove malattie d'oltreoceano, di fronte alle quali la vite europea non ha alcuna capacità difensiva o di tolleranza. Nel caso della fillossera, l'innesto si dimostrò una soluzione efficace e di facile impiego. Contemporaneamente iniziarono svariati percorsi di miglioramento genetico per cercare di aumentare la tolleranza ad altri stress biotici meno facilmente superabili, attraverso la selezione di ibridi che portassero le resistenze delle viti americane, proteggendo la produzione (qualitativamente e quantitativamente elevata) della vite europea senza contaminarla con aromi indesiderati tipici delle viti americane, come l'aroma *foxy* (Antranilato di metile e probabilmente alcuni composti solforati).

Agli inizi del ventesimo secolo, quando la genetica mendeliana poté essere applicata per la prima volta, si diede inizio a numerosi tentativi di *breeding* per elucidare sistematicamente l'ereditarietà di alcuni caratteri. Hedrick e Anthony (1915) riconobbero la depressione dovuta all'*inbreeding* come un problema nella selezione della vite e descrissero come alcune *cultivar* fossero risultate essere genitori piuttosto scadenti, al fine di ottenere piante vitali e

resistenti, essendo prive degli aromi necessari e di una buona resa nella qualità del vino. Con lenti progressi, negli anni successivi vennero portate a termine ulteriori analisi, e numerosi scienziati contribuirono alla conoscenza attuale dell'ereditarietà dei caratteri nel genere *Vitis*, come citato da De Lattin (1957). Husfeld (1962) spiegò che i molteplici fallimenti dei primi programmi di miglioramento genetico per le resistenze e la dissezione genetica dei caratteri complessi erano largamente dovuti alla grande complessità e alla conoscenza insufficiente del materiale vegetale usato. Oltre alla complessità dei caratteri, una spiegazione delle difficoltà avute nel dipanare la genetica di vite potrebbe essere legata anche al problema delle autofecondazioni che, verificandosi erroneamente al posto degli incroci desiderati, davano luogo a pattern di segregazione distorti e risultati ingannevoli. Molti caratteri in vite sono poligenici e fortemente soggetti alle caratteristiche ambientali, rendendo difficile lavorare con i classici approcci di *breeding*. L'alta depressione da *inbreeding*, la crescita vegetativa lenta e la prima fioritura tre anni dopo la germinazione erano ulteriori fattori di ritardo nella risoluzione del controllo genetico dei caratteri in vite. Per questi motivi, è da molto tempo che i *breeder* della vite sono alla ricerca di metodi che permettano una selezione precoce.

Negli anni novanta emersero finalmente molti nuovi strumenti che potevano facilitare la comprensione della genetica della vite. Molte tecniche basate sui marcatori molecolari vennero messe a punto. Mentre altre colture riscontrarono già alcuni benefici nei processi di *breeding* grazie all'utilizzo di tecniche molecolari come l'analisi degli isoenzimi o di marcatori come gli RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), il vero passo in avanti per la vite arrivò quando divennero disponibili le analisi dei marcatori molecolari basati sulla Polymerase Chain Reaction (PCR). I primi studi di mappaggio genetico effettuati utilizzando marcatori molecolari RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) sono stati descritti da Weeden *et al.* (1994), e la prima mappa genetica completa seguì a breve. I metodi tanto desiderati per la selezione precoce, basati su tecniche di *fingerprinting* molecolare, si stavano finalmente concretizzando grazie ai nuovi traguardi tecnologici. Conseguentemente, l'inizio del ventunesimo secolo rappresenta una svolta paradigmatica nella selezione della vite: da un *breeding* empirico ad un *breeding* basato sulla conoscenza

dei caratterizzanti genetici. In futuro, il *breeding* molecolare (SMART BREEDING = *selection with markers and advanced reproductive technologies*) consentirà un processo di selezione della vite più efficiente e più mirato.

La caratterizzazione delle risorse genetiche in vite a livello genotipico è diventata più efficace da quando è disponibile l'analisi dei microsatelliti del DNA attraverso i marcatori SSR (*simple sequence repeat*). I microsatelliti sono stati utilizzati innanzitutto per gli studi di *genotyping*, risultando estremamente utili per identificare gli errori negli incroci e risolvere le parentele tra le *cultivar*.

Molte mappe genetiche sono state finora sviluppate usando gli SSR, fornendo le basi per la mappatura dei QTL (*Quantitative Trait Loci*) e quindi combinare le informazioni genotipiche e fenotipiche. Questa sofisticata analisi permette la dissezione genetica di caratteri complessi e l'integrazione di caratteri monogenici o QTL dentro alle mappe genetiche. Inoltre, a causa della totale sintonia del genoma di vite è stato possibile integrare la mappa di riferimento con le mappe di molti genotipi differenti. Le mappe genetiche di altre specie di *Vitis* sono state quindi collegate a queste mappe di riferimento impiegando marcatori comuni, cosicché per la prima volta è diventato possibile orientarsi nel genoma di vite e suddividere completamente i caratteri nei singoli *loci*. Inoltre, i marcatori molecolari e le mappe genetiche complete del genoma di *Vitis* permettono l'utilizzo della *marker-assisted selection* (MAS) e l'introggressione e la piramidazione dei loci di resistenza durante tutto il processo di *breeding*.

I principi della MAS sono ampiamente descritti in letteratura. La MAS è applicata per:

- ottimizzare la selezione dei parentali,
- inserire un singolo gene all'interno di una linea d'élite,
- piramidare differenti *loci* in un genotipo attraverso un unico incrocio,
- selezionare la progenie con la proporzione più alta del genoma parentale ricorrente.

Il prerequisito maggiore è la disponibilità di marcatori co-segreganti associati molto strettamente ai *loci* del carattere. Altri prerequisiti sono un appropriato equipaggiamento tecnico e un metodo di *screening* genetico ad alta processività affidabile e conveniente. Ci

sono due vantaggi maggiori del *breeding* di vite accelerato grazie alla MAS. Primo, la MAS può sostituire la fenotipizzazione; secondo, può essere effettuata precocemente nello stadio di sviluppo della pianta. Le tempistiche si riducono particolarmente se il carattere in questione è espresso tardivamente nello sviluppo (esempio: colore, aroma del frutto).

1.5.1 L'IMPORTANZA DELLA PIRAMIDAZIONE

I programmi di miglioramento genetico si pongono come obiettivo la creazione di varietà resistenti alla malattia. La difficoltà di questo lavoro sta nella creazione di un genotipo che porti una resistenza duratura nel tempo, poiché la maggior parte delle varietà con resistenze monogeniche vengono di solito velocemente eluse dal patogeno attraverso una rapida evoluzione e superamento del singolo meccanismo molecolare di contrasto (Delmotte *et al.*, 2013). Per ovviare a questo problema si cerca di unire, all'interno di uno stesso genoma, molteplici resistenze diverse per lo stesso microrganismo, attraverso la piramidazione genetica.

Un altro fattore importante da non trascurare che rende fondamentale la piramidazione (e l'utilizzo di tratti multigenici) è il grandissimo numero di ceppi che caratterizza la stessa

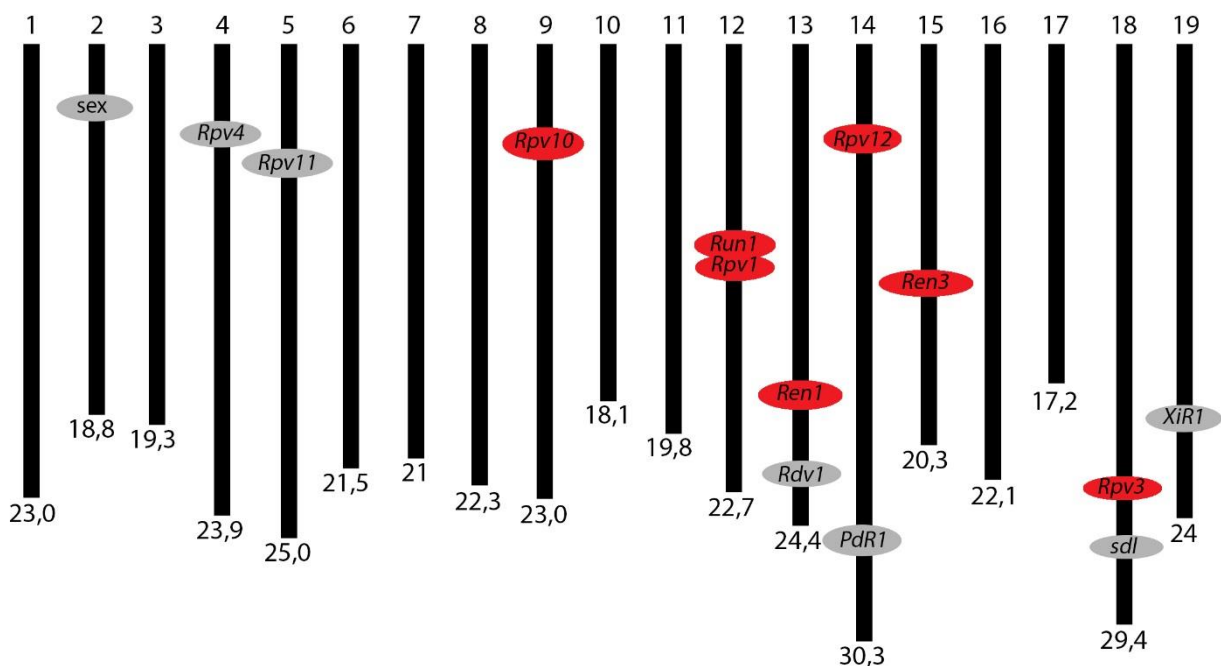


Figura 1.5: rappresentazione schematica del set cromosomico di *Vitis*. Il numero sotto ai cromosomi indica la lunghezza in megabasi (<http://www.genoscope.cns.fr/vitis>). Il locus sex sul cromosoma 2 è stato trovato in numerose specie di *Vitis*. Sono indicati vari loci di resistenza, derivanti da fonti differenti. Tutte le resistenze derivano da differenti specie di *Vitis* liberamente incrociabili e interfertili. L'unica eccezione è Run1/Rpv1 sul cromosoma 12 che è stato introgresso da *Muscadinia rotundifolia*. I marcatori riportati in rosso sono presenti negli incroci presi in esame in questa tesi. Un singolo genotipo portatore di tutti i loci di resistenza come raffigurato al momento non esiste.

(riadattato da Genetics, Genomics and Breeding of Grapes, cap. 7, Molecular Breeding, Reinhard Töpfer et al., 2011)

specie di un patogeno (*patovar*), distribuiti in maniera complessa sul territorio. Ogni *patovar* presenta diversi gradi di virulenza e spesso, addirittura, diversi meccanismi molecolari di attacco. Un esempio è quello presentato da Gómez-Zeledón *et al.* (2013), che illustra quanto possa essere differenziata la capacità di indurre patogenesi nei vari ceppi di *P. viticola*, mettendo in luce quanto le attuali conoscenze riguardo la natura e la dislocazione dei *patovar* di peronospora nel mondo siano scarse, e la necessità di approfondire gli studi in questa direzione al fine di sviluppare varietà resistenti di lunga durata e ben adattabili al territorio di insediamento.

1.5.2 MARCATORI MOLECOLARI PER LE RESISTENZE AI PATOGENI IN VITE

Negli ultimi anni le prime mappe genetiche di marcatori strettamente associati a *loci* di importanti caratteri (per la maggior parte geni di resistenza) sono diventate il punto di partenza per l'applicazione della MAS nella selezione della vite. Analizzando la genetica della *cultivar* Regent, è stato possibile identificare i due QTL maggiori per la resistenza a peronospora, *Rpv3* e *Rpv4* sui cromosomi 18 e 4 rispettivamente (Fischer *et al.* 2004 e Welter *et al.* 2007). In seguito venne caratterizzato il *locus* di *Run1* per la resistenza ad oidio, localizzato sul cromosoma 12 di *Muscadinia rotundifolia* (Bouquet *et al.* 2000 e Paquet *et al.* 2001). Marcatori ad esso strettamente associati sono stati successivamente identificati e resi disponibili per la MAS. È stato trovato inoltre, in forte associazione con il *locus* di *Run1*, un *locus* di resistenza verso *P. viticola*, chiamato *Rpv1*. Sempre nel 2001 è stato caratterizzato *Ren2* attraverso l'incrocio Horizon x Illinois 547-1, e la resistenza è dovuta al vitigno Illinois 547-1 (Dalbo *et al.* 2001). Nel 2007, attraverso l'incrocio Regent x Lemberger, è stato individuato il marcatore molecolare *Ren3*, dove il tratto resistente è dato ancora da Regent (Welter *et al.*, 2007). Un altro *locus* per la resistenza verso oidio, *Ren1*, è stato identificato sul cromosoma 13 della *cultivar* Kishmish vatkana (Hoffmann *et al.*, 2008) e la *cultivar* Dzhandzhal kara (Coleman *et al.*, 2009).

Nel 2006, è stato trovato *Rpv2* nell'incrocio Cabernet Sauvignon x 8624 (Wiedemann *et al.*, 2006). Il genitore portatore del tratto resistente a *P. viticola* è 8624 della specie *M. rotundifolia*.

Nel 2009, incrociando Chardonnay con Bianca, vennero individuati sia *Rpv3* che *Rpv7* (Bellin *et al.*, 2009). I tratti resistenti derivano dal vitigno Bianca, che a sua volta proviene da un incrocio selezionato nel 1960 tra una *V. vinifera* e Villard Blanc. Villard Blanc, conosciuto anche come Seyve Blanc 12-375, ha trasmesso alla progenie un'elevata resistenza alla peronospora.

Nel 2011, sono stati scoperti il locus *Rpv8*, dall'incrocio *V. amurensis* "Ruprecht" x *V. amurensis* "Ruprecht" e i marcatori molecolari dei loci *Rpv9* e *Rpv13*, dall'incrocio Moscato bianco x *V. riparia* (Blasi *et al.* 2011 e Moreira *et al.* 2011). Il tratto resistente deriva da Wr63 della specie *V. riparia*. Sempre nel 2011, da Gf.Ga-52-42 x Solaris, è stato individuato *Rpv10* (Schwander *et al.* 2011). In questo caso il tratto resistente deriva da Solaris. Nel 2013 è stato invece caratterizzato *Rpv12* nel cromosoma 14 della vite asiatica *V. amurensis* (Venuti *et al.*, 2013).

Conseguentemente i *loci* scoperti sono stati utilizzati per mettere a punto le prime esperienze di validazione di marcatori utilizzabili per la MAS nel *breeding* per caratteri di resistenza. Ulteriori aspetti devono essere considerati, come la praticabilità, i costi e la sostenibilità economica della MAS. Come descritto in Molnar *et al.* (2007), per esempio: sono stati analizzati tre marcatori correlati a *Run1* in una popolazione derivata dall'incrocio (*[M. rotundifolia* x *V. vinifera*] x BC4) x *V. vinifera*. Questi studi si sono focalizzati su un semplice metodo per il rilevamento dei marker e sono state utilizzate corse elettroforetiche su gel di agarosio per il conteggio degli alleli. I gel di agarosio sono comodi da maneggiare e non richiedono un equipaggiamento molto costoso. Questo metodo può essere messo a punto in un breve lasso di tempo e da personale non necessariamente qualificato o specializzato. Inoltre può essere facilmente affiancato a strategie di *breeding* classico. Comunque sia, se la dimensione della popolazione è molto grande o devono essere analizzati molti marcatori diversi, si raccomanda l'utilizzo di un sistema di rilevamento degli alleli automatico.

Un esempio di piramidazione di quattro *loci* di resistenza, due per *E. necator* (*Run1*, *Ren3*) e due per *P. viticola* (*Rpv1*, *Rpv3*), ci è fornito da Eibach *et al.* (2007). I genotipi selezionati mostrano tutte le resistenze maggiori fornite da "Regent" (*Ren3*, *Rpv3*) e VRH3082-1-42

(*Run1*, *Rpv1*). Per quanto riguarda la peronospora, le resistenze si sono dimostrate additive: se combinate nello stesso genotipo i test di infezione non mettono in evidenza alcun sintomo. Pure la resistenza ad oidio risulta essere completa, anche in condizioni di forte pressione patogenica. Considerando che anche i caratteri per la qualità della vinificazione sono buoni, i genotipi selezionati si affermano come linee di grande interesse.

In questo caso è stato applicato uno schema combinato di selezione genetica e fenotipica. Il primo passaggio, allo stadio di plantule, è stato la valutazione della resistenza a peronospora dell'intera popolazione attraverso inoculo artificiale. Successivamente, la sub-popolazione rimanente resistente a peronospora è stata valutata per la resistenza ad oidio. Questo tipo di fenotipizzazione convenzionale è risultata molto efficace ed economica, riducendo di circa un sesto la dimensione della popolazione iniziale. Fino a questo passaggio non sembrano sussistere motivazioni ragionevoli che suggeriscano l'utilizzo della MAS. Gli individui rimanenti sono stati quindi sottoposti ad uno *screening* molecolare per riscontrare la presenza dei quattro *loci* di resistenza, che ha consentito di ridurre ulteriormente la popolazione di un quinto. Questo mostra chiaramente che senza l'utilizzo di un processo di MAS il *breeder* non sarebbe stato in grado di selezionare le piantine effettivamente portatrici di tutti gli alleli di resistenza. Si può quindi ipotizzare che in un processo di selezione tradizionale la probabilità di selezionare i genotipi corretti è di circa uno a cinque.

Questo esempio mostra come la MAS sia agli esordi all'interno dei programmi di miglioramento genetico, nei quali attualmente si procede ancora nella maggior parte dei casi in modo empirico. Molti altri marcatori sono stati messi a punto per caratteri non legati alla resistenza, come l'apirenia (=assenza di semi nei frutti). Ad esempio, l'apirenia può essere facilmente evidenziata attraverso i marcatori SCAR (*sequence-characterized amplified region*) messi a punto da Adam-Blondon *et al.* (2001), o attraverso i marcatori SSR identificati da Cabezas *et al.* (2006).

1.5.3 RICONOSCIMENTO E RESISTENZA AI PATOGENI

La resistenza genetica è dovuta a uno o più geni che determinano la presenza di barriere strutturali o di sostanze chimiche che contrastano l'attacco del patogeno (difese passive)

oppure l'attivazione di una serie di meccanismi di difesa inducibili dall'infezione (difese attive, necessitano di un meccanismo di riconoscimento del patogeno).

La resistenza dovuta a pochi geni, definita resistenza verticale, conferisce alla pianta la capacità di resistere a una o a poche razze del patogeno. L'ospite reagisce generalmente all'infezione con una risposta ipersensibile: il gene di resistenza è solitamente coinvolto nel processo di riconoscimento ospite-patogeno, determinando una sostanziale incompatibilità tra la pianta e l'agente eziologico della malattia. Resistenze monogeniche vengono utilizzate per la difesa nei confronti di molti patogeni biotrofici come virus, peronospora e oidio.

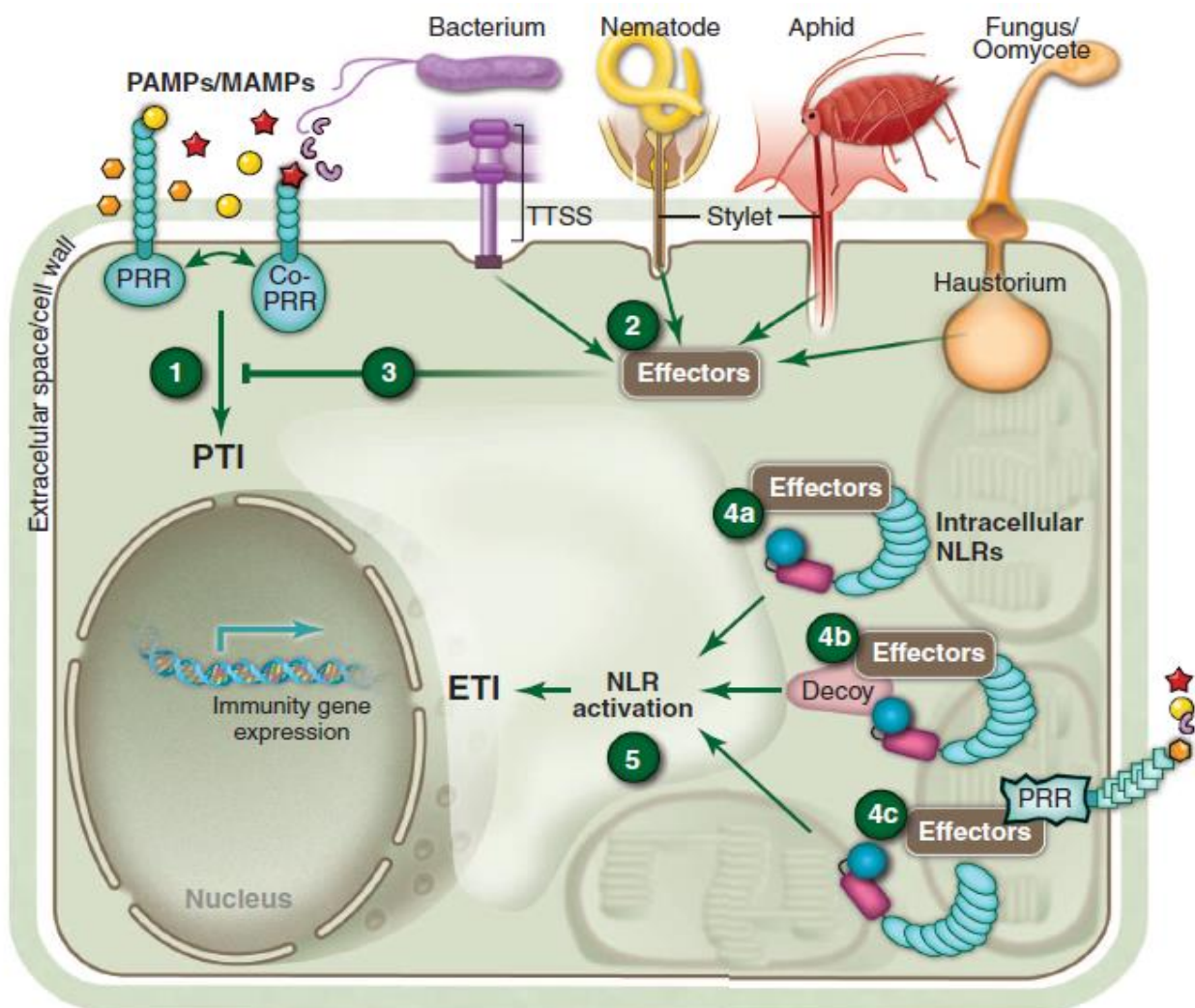


Figura 1.6
(Dangl et al., 2013. Modified by Sarah R. Grant from P. N. Dodds, J. P. Rathjen, Nat. Rev. Genet., 2010).

Più comuni sono le resistenze poligeniche, in cui un *cluster* multigenico, definito QRL (*Qualitative Resistance Locus*) possiede diversi livelli di resistenza. Spesso il funzionamento è lo stesso delle resistenze monogeniche, quindi legato ad una interazione gene (dell'ospite)

per gene (del patogeno) ma, la possibilità di attingere ad un repertorio genetico molto più grande permette alla pianta una resistenza contro numerose razze del patogeno, e la possibilità di evolvere una risposta più rapida al suo eventuale adattamento.

Volendo rapidamente schematizzare le ipotesi oggi più accreditate riguardo ai meccanismi molecolari generali di riconoscimento dell'infezione:

- Tutti i tipi di patogeni producono, nel momento della colonizzazione, PAMP e MAMP (*pathogen [microbial]-associated molecular Pattern*, molecole prodotte dal patogeno nella fase iniziale dell'infezione, che la pianta riconosce come sintomo di attacco in corso. Esempio: pezzi di parete cellulare vegetale idrolizzata dagli enzimi del microbo). La pianta li percepisce attraverso apposite proteine PRR (*pattern-recognition receptors*) extracellulari e dà il via al processo difensivo (PTI, *PRR-mediated immunity*) (Fig1.6, punto 1).
- Il patogeno produce effettori di virulenza sia nell'apoplasto per bloccare il riconoscimento di PAMP/MAMP (non illustrato) che nel citoplasma (Fig1.6, punto 2).
- Questi effettori sono indirizzati verso specifici target cellulari dove sopprimono la PTI e facilitano la virulenza (Fig1.6, punto 3).
- Dei recettori NLR (*nucleotide-binding leucine-rich repeat*) intracellulari della pianta possono percepire gli effettori in tre modi principali:
 - Attraverso un'interazione diretta tra recettore e ligando (Fig1.6, punto 4a);
 - Attraverso la percezione dell'alterazione, causata dall'effettore, di una proteina esca che mima strutturalmente il target dell'effettore, ma non ha nessun'altra funzione nella cellula vegetale (Fig1.6, punto 4b);
 - Attraverso la percezione dell'alterazione di un target di virulenza effettivo del patogeno nell'ospite, come il dominio citosolico di una PRR (Fig1.6, punto 4c).

Non è ancora chiaro se ciascuna di queste modalità di attivazione procede attraverso lo stesso meccanismo molecolare, né è chiaro come, o dove, ognuna di esse dia luogo al processo di immunità dipendente dal riconoscimento degli effettori da parte delle NLR (ETI, *effector-triggered immunity*)(Dangl *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda la maggior parte dei *loci* di resistenza citati, non è stato ancora delineato nel dettaglio la tipologia di geni a cui fanno parte (anche se molti sembrano appartenere per omologia alla classe NB-LRR), né il processo molecolare di resistenza che governano, a causa soprattutto della grande difficoltà nell'osservare eventi di ricombinazione all'interno dei QTL per le resistenze in vite. Il fenomeno è probabilmente imputabile alla difficoltà di appaiamento in sede di meiosi delle linee selezionate, che a volte derivano da incroci tra piante molto lontane geneticamente le una dalle altre (Barker *et al.*, 2005).

Ciononostante una pubblicazione molto recentemente (Feechan *et al.*, 2013) rivela la natura dei geni contenuti nel QRT di *M. rotundifolia* contenente i loci *Rpv1* e *Run1* sul cromosoma 12. A causa della distanza filogenetica tra *M. rotundifolia* e *Vitis*, la ricombinazione all'interno del locus negli ibridi di *Vitis* con la resistenza introgressa è fortemente inibita. Il tratto conterrebbe una famiglia di 7 geni assimilabili alle classi dei geni TIR-NB-LRR (*toll-interleukin receptors - nucleotide-binding - leucine-rich repeat*), derivanti probabilmente da un unico gene originario, di cui due collegati ai relativi marcatori per le resistenze e di esse responsabili. I TIR-NB-LRR sono geni di resistenza implicati nel riconoscimento dei prodotti dei cosiddetti geni di avirulenza (*Avr*) del patogeno. Il dominio TIR presenta analogie con la proteina Toll di *Drosophila* e la proteina IR dei mammiferi (van der Biezen *et al.*, 2001).

1.5.4 RESISTENZA ALLA PERONOSPORA

La resistenza genetica a *Plasmopara viticola* si riscontra in numerose specie di *Vitis*. Diversi autori classificano come molto resistenti alla peronospora *V. candidans*, *V. cinerea*, *V. cordifolia*, *V. monticola*, *V. riparia*, *V. rotundifolia* e *V. titania*; come parzialmente resistenti *V. lincedumii* e *V. vulpina*; come parzialmente suscettibili *V. aestivalis*, *V. arizonica*, *V. berlandieri*, *V. doniana*, *V. palmate* e *V. rupestris*; mentre le cultivar europee di *V. vinifera* sono generalmente classificate come molto suscettibili.

Muscadinia Rotundifolia è stata classificata come parzialmente o totalmente resistente a *P. viticola*. Alcune specie del genere *Muscadinia* sono più efficienti nell'arrestare la crescita delle ife durante la colonizzazione del mesofillo e non si manifestano i sintomi visibili al di fuori della foglia (sporulazione), mentre alcuni vitigni asiatici sostengono la crescita ifale solo

sul lato esterno della lamina fogliare, impedendo la penetrazione attraverso gli stomi e il rilascio di sporangiofori vitali per la sopravvivenza del patogeno.

Boso e Kassemeyer nel 2008 hanno compiuto uno studio per caratterizzare i livelli di suscettibilità a *P. viticola* di alcuni genotipi di vite europea. Tutte le viti appartenenti alla specie *V. vinifera* sono risultate molto suscettibili, a parte l'eccezione del Cabernet Sauvignon, che si evidenzia per una maggiore resistenza. All'opposto il Müller Thurgau risulta essere il più vulnerabile agli attacchi. Un'analisi più approfondita del processo di infezione ha permesso di riconoscere nella parziale resistenza del Cabernet Sauvignon un meccanismo di risposta ipersensibile all'infezione, che blocca il processo tramite una rapida morte cellulare puntiforme localizzata nel punto di attacco, riuscendo ad impedire l'accesso del patogeno nel mesofillo.

Due processi biochimici sono stati riscontrati nella pianta ospite resistente a peronospora:

- Sintesi di callosio negli stomi. Il callosio viene sintetizzato dalla pianta nel momento dell'attacco per rinforzare le pareti cellulari e ridurre la possibilità di penetrazione. Il callosio sintetizzato viene depositato negli stomi e ha un ruolo decisivo nella resistenza fogliare agli attacchi da *P. viticola*. Si è dimostrato che la sintesi di callosio avviene solo nelle varietà resistenti alla peronospora e costituisce il metodo principale che queste specie utilizzano per difendersi.
- Sintesi di resveratrolo e ossidazione successiva in ϵ - e δ -viniferina. La ϵ - e δ -viniferina sono sostanze tossiche per *P. viticola* (l'analisi qualitativa e quantitativa di questi stilbeni nelle foglie è indicatore dei livelli di resistenza a peronospora).
- Incrementi di biosintesi di fitoalessine. Le fitoalessine vengono prodotte dalla pianta in risposta all'attacco del fungo.

1.5.5 RESISTENZA ALL'OIDIO

La resistenza all'oidio nei generi di vite *Vitis*, *Muscadinia*, *Ampelopsis*, *Cissus* e *Parthenocissus* presenta quattro differenti livelli di tolleranza agli attacchi di *E. necator*.

Sia *V. vinifera* che *A. brevipedunculata* sono classificate come suscettibili. Nel lavoro di Feechan *et al.* (2011) la maggioranza delle piante testate (circa 75 %) presentano uno

sviluppo dell'austorio all'interno delle cellule dell'epidermide e la formazione successiva di un'ifa secondaria. Nel restante dei casi (circa 25%) i conidi sono germinati ma non sono stati in grado di penetrare nelle cellule dell'epidermide. L'alto livello di suscettibilità di queste piante è dato dall'incapacità di attivare una risposta ipersensibile tramite la PCD (*programmed cell death*) nel momento della penetrazione del patogeno. *A. aconitifolia*, *V. riparia* e *V. rupestris* presentano una resistenza parziale, dovuta ad un incremento del livello di PCD osservato al momento della penetrazione di *E. necator* che non permette al fungo di espandersi. *M. rotundifolia*, *C. antartica* e *C. oblonga* presentano resistenza totale, grazie alla repentina risposta ipersensibile. *C. rhombifolia*, *C. sterculiifolia*, *P. tricuspido* e *P. henryana* sono considerate completamente resistenti alla penetrazione, infatti quasi tutte le spore germinate non riescono ad attraversare le cellule epidermiche.

La resistenza all'oidio è stata ricercata per anni nelle cultivar di *V. vinifera* attraverso un intenso screening del germoplasma della vite, con scarsi successi.

2. SCOPO DELLA TESI

Peronospora e oidio insieme causano più danni alla viticoltura che tutti i rimanenti patogeni della vite: ogni anno determinano gravi perdite di raccolto in tutto il mondo.

Queste malattie inoltre influiscono negativamente sulla capacità della pianta di traslocare i fotosintati negli acini, riducendone la qualità organolettica. Le attuali strategie di lotta si basano principalmente sul contrasto chimico, che ogni anno rappresenta una cospicua fetta delle spese di gestione del vigneto. Inoltre i prodotti antifungini, soprattutto se usati assiduamente, come in certi casi risulta necessario (es. estati piovose e fresche per la peronospora), rappresentano un pericolo per la salute dell'operatore, del consumatore e dell'ambiente. Uno studio sull'uso di fungicidi negli stati membri dell'Unione Europea ha infatti concluso che nonostante la viticoltura occupi solo l'8% delle aree coltivate essa è responsabile di circa il 70% di tutti i fungicidi usati (Phytowelt GmbH for the European Commission, 2003).

Ecco perché oggi, che si possiedono (o si stanno mettendo a punto) tecnologie e procedimenti adeguati, sembra fondamentale ampliare i processi di selezione e portare alla selezione di varietà resistenti in modo efficace e durevole nel tempo, che mantengano nel contempo capacità produttive e qualitative concorrenziali. È all'interno di quest'ottica che si colloca il progetto di miglioramento genetico in cui si è inserito il mio lavoro di tesi presso la Fondazione E. Mach di San Michele all'Adige (Trento). Successivamente all'acquisizione di alcune delle accessioni portatrici di resistenza note in letteratura, è stato intrapreso un processo di piramidazione delle resistenze e di validazione dell'effettiva efficacia di quest'ultime, tutt'ora in corso. Si sta inoltre cercando di capire come abbinare al meglio la selezione tradizionale con la MAS, con l'obiettivo di mettere a punto un sistema efficace, facilmente gestibile nel corso del tempo ed economico. A causa dei costi, ancora troppo elevati, dei metodi di estrazione del DNA, un processo di selezione validato esclusivamente da metodi genetici non è ancora proponibile. Inoltre, come suggerisce l'esempio già

riportato in Eibach *et al.* (2007), l'analisi fenotipica attraverso i test d'infezione risulta essere un'opzione valida, veloce ed economica per una prima scrematura della popolazione. Sulla base di questi presupposti è stato posto in essere un processo di validazione, attraverso un confronto con i risultati genetici di tutti gli individui, dei metodi di infezione attualmente in vigore, per verificarne l'efficacia al di fuori delle condizioni standard ideali, riproducibili solo all'interno di un laboratorio. Una delle necessità del lavoro dei *breeders* che lavorano con molte popolazioni, infatti, è quello di poter utilizzare tecniche affidabili in un ampio spettro di condizioni, dalla serra al pieno campo, in modo da evitare di dilatare ulteriormente le tempistiche.

Lo scopo ultimo di questo lavoro è stato, quindi, quello di rilevare e confrontare i dati genotipici e fenotipici di quattro gruppi di piante appartenenti a quattro popolazioni segreganti derivanti da incroci realizzati nel 2012, scelte all'interno del processo di miglioramento genetico attualmente in corso presso il centro di ricerca, e di analizzarne in seguito i risultati. Il numero relativamente esiguo di individui osservati (24 per popolazione) non consente certo di fare rilevamenti statistici né di confermare la predittività dei metodi confrontati; ciononostante questi risultati possono essere utili per delineare le modalità e le potenzialità del metodo. Al termine di questo lavoro di tesi è stata intrapresa inoltre, partendo dall'analisi delle procedure e dei risultati, una valutazione critica del processo, che potesse suggerire una riflessione sui vantaggi e i limiti della procedura, e sulle migliorie apportabili.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COMBINAZIONI D'INCROCIO E PROGENIE CONSIDERATE.

ORGANIZZAZIONE DEL LAVORO DI PIRAMIDAZIONE

Le piantine prese in considerazione sono popolazioni F1 germinate nel 2013, e derivano da incroci eseguiti nel 2012. Per agevolare il parallelo lavoro di analisi molecolari, che utilizzano piastre multipozzetto da 96 pozzetti per tutte le fasi di lavoro (campionamento, estrazione del DNA, corse PCR ecc.), le popolazioni sono state disposte in plateau da 96 semenzali ciascuno, organizzati in 4 cassette da 24 individui, secondo lo schema della figura 3.1:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|-------------|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | α I | | | | | | α II | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | β I | | | | | | β II | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Figura 3.1: Piastre di semenzali.

I semenzali, posti in vasi da 1 litro e substrato formato da un miscuglio di sabbia:torba:vermiculite in rapporto 1:3:3, suddivisi in cassette da 24 vasi ognuna, sono stati posti in serra alla temperatura di 25°C giornalieri e 20°C notturni, un fotoperiodo di 16 ore e umidità relativa compresa tra il 30 e il 60%. Il campionamento per le analisi genetiche è stato effettuato prelevando le prime due foglioline apicali dei semenzali. Quando le piantine presentavano circa una decina di foglie distese si è proceduto con le analisi fenotipiche.

I 96 campioni presi in considerazione derivano dai seguenti 4 incroci:

- BRONNER X REGENT
- SOLARIS X REGENT
- VRH3082-1-42 (BC4) X KISHMISH VATKANA
- MONICA X PETRA

Il genotipo Bronner possiede il locus *Rpv10* per la resistenza a peronospora; Regent possiede il locus *Rpv3* per la resistenza a peronospora e *Ren3* a oidio; Solaris presenta, come Bronner, *Rpv10*; VRH3082-1-42 (che d'ora in poi verrà chiamato per comodità BC4) i loci associati di *M. rotundifolia* *Rpv1* (peronospora) e *Run1* (oidio); Kishmish vatkana ha *Ren1* per la resistenza ad oidio; Monica possiede sempre *Run1* per la resistenza ad oidio e *Rpv1* e *Rpv12* a peronospora; Petra ha *Rpv12* per peronospora.

| Varietà | Parent 1 x Parent 2 |
|--------------------|-----------------------------|
| VRH3082-1-42 (BC4) | VRH28-82 (BC3) x Aubun N. |
| Kishmish Vatkana | Sultanina x ?? |
| Petra | Kunbarat x Pinot Noir |
| Regent | Diana x Chambourcin |
| Solaris | Merzling x Geienheim 6493 |
| Monica | BC4 (VRH3082-1-42) x Petra |
| Bronner | Merzling x Geisenheim 6494 |

Tabella 3.1

Per ogni incrocio sono stati scelti, all'interno delle popolazioni, 24 individui (una cassetta).

I 24 individui della popolazione F1 di Bronner x Regent derivano dal quadrante α I della piastra 2:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|------|------|-------|-------|-------|-------|
| A | bxr1 | bxr5 | bxr9 | bxr13 | bxr17 | bxr21 |
| B | bxr2 | bxr6 | bxr10 | bxr14 | bxr18 | bxr22 |
| C | bxr3 | bxr7 | bxr11 | bxr15 | bxr19 | bxr23 |
| D | bxr4 | bxr8 | bxr12 | bxr16 | bxr20 | bxr24 |

Tabella 3.2

I 24 individui della popolazione F1 di Solaris x Regent sono disposti nel quadrante α II della piastra 4:

| | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|------|-------|-------|-------|-------|
| E | sxr1 | sxr5 | sxr9 | sxr13 | sxr17 | sxr21 |
| F | sxr2 | sxr6 | sxr10 | sxr14 | sxr18 | sxr22 |
| G | sxr3 | sxr7 | sxr11 | sxr15 | sxr19 | sxr23 |
| H | sxr4 | sxr8 | sxr12 | sxr16 | sxr20 | sxr24 |

Tabella 3.3

I 24 individui della popolazione F1 di BC4 x Kishmish vatkana sono disposti nel quadrante β II della piastra 8:

| | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|------|-------|-------|-------|-------|
| A | bzk1 | bzk5 | bzk9 | bzk13 | bzk17 | bzk21 |
| B | bzk2 | bzk6 | bzk10 | bzk14 | bzk18 | bzk22 |
| C | bzk3 | bzk7 | bzk11 | bzk15 | bzk19 | bzk23 |
| D | bzk4 | bzk8 | bzk12 | bzk16 | bzk20 | bzk24 |

Tabella 3.4

I 24 individui della popolazione F1 di Monica x Petra sono disposti nel quadrante α I della piastra 9:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|------|------|-------|-------|-------|-------|
| A | mzp1 | mzp5 | mzp9 | mzp13 | mzp17 | mzp21 |
| B | mzp2 | mzp6 | mzp10 | mzp14 | mzp18 | mzp22 |
| C | mzp3 | mzp7 | mzp11 | mzp15 | mzp19 | mzp23 |
| D | mzp4 | mzp8 | mzp12 | mzp16 | mzp20 | mzp24 |

Tabella 3.5

3.2 CAMPIONAMENTO

Il campionamento del materiale destinato all'estrazione del DNA è stato effettuato direttamente in serra. Con l'ausilio di una pinzetta si sono prelevate dai semenzali 1-2 foglioline per individuo. Successivamente i campioni raccolti sono stati inseriti in una piastra da 96 pozzetti per campionamento fornita da DNeasy 96 Plant Kit Qiagen secondo questo schema:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------------|-------|-------|----------------|-------|-------|--------------|-------|-------|----------------|-------|-------|
| A | bzk1 | bzk9 | bzk17 | bkr1 | bkr9 | bkr17 | mxp1 | mxp9 | mxp17 | sxr1 | sxr9 | sxr17 |
| B | bzk2 | bzk10 | bzk18 | bkr2 | bkr10 | bkr18 | mxp2 | mxp10 | mxp18 | sxr2 | sxr10 | sxr18 |
| C | bzk3 | bzk11 | bzk19 | bkr3 | bkr11 | bkr19 | mxp3 | mxp11 | mxp19 | sxr3 | sxr11 | sxr19 |
| D | bzk4 | bzk12 | bzk20 | bkr4 | bkr12 | bkr20 | mxp4 | mxp12 | mxp20 | sxr4 | sxr12 | sxr20 |
| E | bzk5 | bzk13 | bzk21 | bkr5 | bkr13 | bkr21 | mxp5 | mxp13 | mxp21 | sxr5 | sxr13 | sxr21 |
| F | bzk6 | bzk14 | bzk22 | bkr6 | bkr14 | bkr22 | mxp6 | mxp14 | mxp22 | sxr6 | sxr14 | sxr22 |
| G | bzk7 | bzk15 | bzk23 | bkr7 | bkr15 | bkr23 | mxp7 | mxp15 | mxp23 | sxr7 | sxr15 | sxr23 |
| H | bzk8 | bzk16 | bzk24 | bkr8 | bkr16 | bkr24 | mxp8 | mxp16 | mxp24 | sxr8 | sxr16 | sxr24 |
| | BC4XKISMISH V. | | | BRONNERXREGENT | | | MONICAXPETRA | | | SOLARISXREGENT | | |

Tabella 3.6

Il campionamento è stato eseguito in doppio in modo da garantire una seconda piastra di controllo.

3.3 ESTRAZIONE DNA

I campioni freschi sono stati quindi liofilizzati e polverizzati con MM 300 Mixer Mill system (Retsch, Germany).

È stata quindi eseguita l'estrazione del DNA utilizzando DNAeasy 96 Plant Kit (QIAGEN, Germany) (La piastra in doppio è stata invece successivamente utilizzata per testare la qualità di estrazione del kit NucleoSpin® Plant II MN). Il DNA genomico totale è stato portato in sospensione nel buffer TE. La purezza e la concentrazione di DNA delle soluzioni ottenute è stata verificata tramite NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometers, uno spettrofotometro di nuova generazione prodotto da Thermo scientific che consente di quantificare campioni di diversa natura immersi in micro volumi di soluzione (1 µl). Lo strumento rivela i picchi di assorbimento a 260 nm per gli acidi nucleici, a 280 nm per le proteine e a 230 nm per i polisaccaridi e i polifenoli. Il rapporto 260/270 stima la contaminazione da proteine. Un rapporto ideale deve mantenersi tra 1,8 e 2.

Valutata la concentrazione media, si è eseguita una opportuna diluizione per portare il DNA ad una concentrazione approssimativamente intorno ai 4 ng/μl (per consentire l'uso del DNA nelle dosi standardizzate delle PCR).

La piastra è stata conservata successivamente a -20° C.

3.4 PCR

Le amplificazioni PCR sono state eseguite in un volume finale di 12,5 μl contenenti 10 ng di DNA genomico, 0,25 mM di ogni dNTP, 2 mM di MgCl₂ e 1,5 U Taq DNA polimerasi (Gold Taq®; in alcuni casi HotStarTaq® DNA Polymerase). A seconda del *locus*, la concentrazione dei primer variava tra 0,2 e 0,6 μM. Le reazioni sono state eseguite su GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A seconda della tipologia di primer, i programmi PCR utilizzati sono stati: “goldmultiplex 30”, “gold56-40”, “hot 55-35”, “touch down 50-35”:

| goldmultiplex 30 | |
|------------------|----------------|
| 95° C | 7 min |
| 95° C | 1 min |
| 54° C | 1 min |
| 72° C | 1 min 30 s |
| 72° C | 30 min |
| 14° C | raffreddamento |

x 35 cicli

| gold 56-40 | |
|------------|----------------|
| 95° C | 5 min |
| 94° C | 1 min |
| 56° C | 1 min |
| 72° C | 2 min |
| 72° C | 10 min |
| 14° C | raffreddamento |

x 40 cicli

| touch down 50-35 | |
|-----------------------|----------------|
| 95° C | 10 min |
| 94° C | 20 s |
| 55°-0.5° C ogni ciclo | 20 s |
| 65° C | 40 s |
| 94° C | 20 s |
| 50° C | 20 s |
| 65° C | 40 s |
| 65° C | 30 min |
| 14° C | raffreddamento |

x 10 cicli

x 25 cicli

| hot 55-35 | |
|-----------|----------------|
| 95° C | 10 min |
| 94° C | 1 min |
| 56° C | 1 min |
| 72° C | 2 min |
| 72° C | 20 min |
| 14° C | raffreddamento |

x 35 cicli

Tabelle 3.7

I marcatori utilizzati erano tutti microsatelliti (SSR), tranne in un caso, per *Ren3*, in cui si è utilizzato uno SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region Marker, derivante da un RAPD). Per il locus contenente, in stretta associazione, *Rpv1* e *Run1*, i marcatori sono stati

VMC1g3.2 (Barker *et al.*, 2005) e VVIM11 (Kiss *et al.*, 2010) per *Rpv1*, VMC8g9 per *Run1* (Barker *et al.*, 2005); per *Rpv3* sono stati utilizzati i marcatori VMC7F2, UDV305 (Bellin *et al.*, 2009) e UDV737 (Di Gaspero *et al.*, 2012).; per *Ren1* UDV-020 (Hoffmann *et al.*, 2007); per *Rpv10* GF09-46 e GF09-47 (Schwander *et al.*, 2011); per *Rpv12* UDV350 e UDV370 (Venuti *et al.*, 2013); per *Ren3*, unico RFLP, ScOR A 760 (Welter *et al.*, 2007).

Sono stati utilizzati, inoltre, altri marcatori SSR, universali per il genere *Vitis*, per verificare la corretta discendenza dei semenzali dagli individui parentali già caratterizzati in laboratorio. I marcatori in questione sono VVMD25, VVMD28 e VVS2 (This *et al.*, 2004).

I frammenti di amplificazione sono stati resi fluorescenti, grazie all'incorporazione di fosforamiditi nel primer *forward*, per il riconoscimento durante la corsa elettrocapillare. Nelle PCR multiple in cui si amplificavano contemporaneamente più marcatori (fino a tre) i primer erano marcati con fosforamiditi che rispondevano in spettri luminosi diversi in modo tale da distinguere l'origine delle varie taglie alleliche.

3.5 LETTURE DEI RISULTATI

3.5.1 ELETTROFORESI MICROCAPILLARE

0,5 µl dei prodotti di PCR sono stati mixati con 9,3 µl di formammide (che evita l'appaiamento delle catene di DNA) e 0,2 µl di GeneScan™ 500 ROX® Size Standard (Applied Biosystems), uno standard di pesi molecolari già marcati. I frammenti di DNA sono quindi

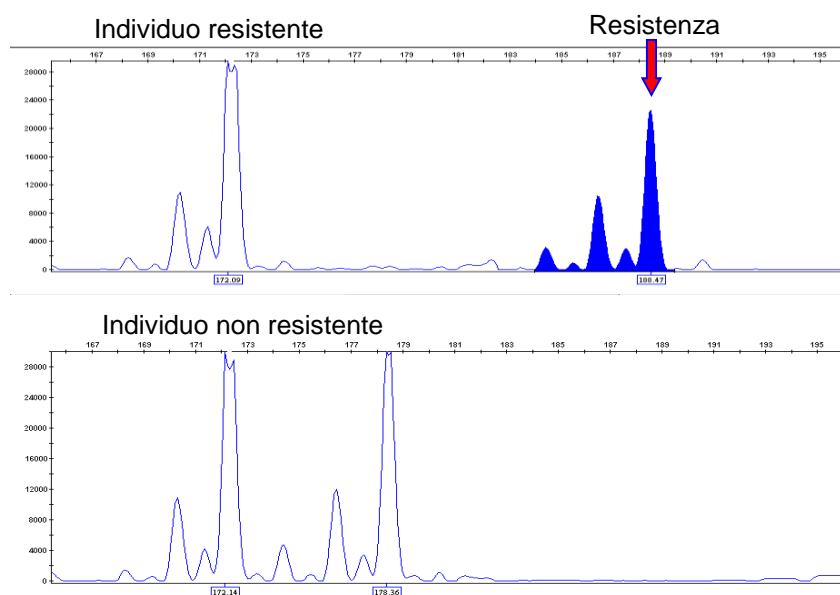


Figura 3.2: picchi rilevati da ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) che indicano la presenza degli alleli e la loro dimensione

stati denaturati (2 min a 95° C) e fatti correre tramite elettroforesi capillare su ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La stima delle taglie alleliche è stata fatta leggendo i risultati attraverso il software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

3.5.2 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Per l'analisi del marcatore ScOR A 760 si è utilizzata una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% e bromuro di etidio come intercalante. 0.5 µl di prodotto di PCR, uniti a 0,1 µl di colorante 6X DNA Loading Dye fermentas, sono stati fatti correre insieme allo standard di corsa GeneRuler DNA Ladder Mix per 60 min all'intensità di corrente di 90 volt. Conseguentemente è stata effettuata la lettura dei risultati con BioDoc-It® Imaging System UVP.

3.6 ANALISI FENOTIPICA DELLE RESISTENZE

3.6.1 INOCULO SU DISCHETTI FOGLIARI PER LA RESISTENZA A PERONOSPORA

Sono state prelevate la terza e la quarta foglia di ogni pianta e di quattro controlli (Muscat Ottonel, suscettibile, Pinot grigio, suscettibile, *V. rupestris* du Lot, medio-resistente, e *V. riparia* G. De Montpellier, resistente). Da ognuna di esse sono stati preparati, mediante apposito strumento, 8 dischetti fogliari per individuo. I dischetti fogliari sono stati posti su carta assorbente bagnata in piastre Petri, con la pagina inferiore rivolta verso l'alto. L'inoculo è stato preparato raccogliendo in campo non trattato foglie di *V. vinifera* cv. Pinot

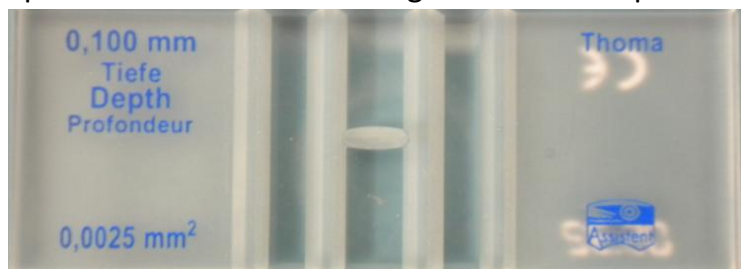


Figura 3.3: Cella contaglobuli Thoma

grigio che presentavano sporulazione di *P. viticola*. Sono state quindi messe a bagno in acqua distillata fredda (T= 4°C) e agitate. L'inoculo è stato filtrato e la sua concentrazione è stata determinata mediante conteggio su cella contaglobuli Thoma (Fig. 3.3). L'ordine di grandezza della concentrazione è sempre stato mantenuto attorno a 10⁵ – 10⁶ spore per ml. La soluzione acquosa così ottenuta è stata quindi nebulizzata sui dischetti fogliari che sono stati posti per 6 giorni al buio, in termostato, alla temperatura di 21° C e umidità relativa superiore all'80%.

La lettura dei risultati è stata eseguita stimando la percentuale di superficie di dischetto che presentava sporulazione secondo le schede EOPP/EPPO (EOPP/EPPO, 1997). I dati sono quindi stati raccolti in una tabella così predisposta (esempio):

Plate 2: Bronner X Regent (A1- A6 / D1 - D6)

| α I | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------|--------------|-----------------|-------|--------------|-------|------|
| A | pianta morta | dischetti marci | 20 | pianta morta | 20 | 0 |
| | | | 20 | | 10 | 1 |
| | | | 15 | | 10 | 2 |
| | | | 15 | | 10 | 2 |
| | | | 10 | | 20 | 4 |
| | | | 10 | | 10 | 2 |
| | | | | | | 2 |
| GRAV | #DIV/0! | #DIV/0! | 15,0 | #DIV/0! | 13,3 | 1,9 |
| INC | #DIV/0! | #DIV/0! | 100,0 | #DIV/0! | 100,0 | 85,7 |
| OIV | | | 5 | | 5 | 7 |

Tabella 3.7

Dai valori di infezione dei dischetti fogliari sono state calcolate l'incidenza e la gravità della malattia, mediante le seguenti formule:

- **gravità (GRAV)** $\frac{\% \text{ sup. infetta}}{\text{dischetti totali}}$
- **incidenza (INC)** $\frac{\text{dischetti infetti}}{\text{dischetti totali}} \cdot 100$

Inoltre è stato utilizzato il descrittore OIV 452-1 per classificare la resistenza a peronospora (OIV, 2009):

- Livello di espressione 1: resistenza molto debole;
- Livello di espressione 3: resistenza debole;
- Livello di espressione 5: resistenza media;
- Livello di espressione 7: resistenza elevata;
- Livello di espressione 9: resistenza molto elevata.

Figura 3.4: dischetti fogliari che presentano sporulazione



3.6.2 INOCULO SU PIANTA INTERA PER LA RESISTENZA A PERONOSPORA

È stata preparata, in modo analogo a quanto già riportato, una soluzione di inoculo. La sospensione acquosa è stata quindi introdotta in appositi nebulizzatori e cosparsa in modo omogeneo sulla pagina inferiore delle foglie.



Figura 3.5: micro serre in cui viene effettuata l'infezione artificiale.

Le piante sono state poste per 9 giorni nelle micro serre ad una temperatura di circa 21°C ed umidità relativa superiore al 90% prima di essere sottoposte ad osservazione. Sono state quindi prese in esame circa una decina di foglie ed è stata stimata per ognuna la percentuale di sporulazione presente sulla pagina inferiore, attribuendone un valore come descritto nelle schede OEPP/EPPO (Fig. 3.6) (OEPP/EPPO, 1997). Analogamente a quanto fatto con i dischetti, i dati sono stati inseriti in tabella e sono state calcolate la **gravità** e l'**incidenza** mediante le formule sopra indicate. Si è quindi utilizzato il descrittore OIV 452, analogo al descrittore OIV 452-1 per i dischetti, per classificare la resistenza a peronospora su foglia (OIV, 2009).

3.6.3 VALUTAZIONE RESISTENZA AD OIDIO

L'infezione di oidio sulle è stata realizzata ponendo in prossimità delle piante da testare viti sensibili alla malattia fortemente colpite dal patogeno; le condizioni presenti nella serra (irrigazione per scorrimento, umidità non troppo elevata) hanno favorito una rapida diffusione della malattia sulle piante in prova.

La resistenza che la pianta dimostra nei confronti dell'oidio è stata quantificata in classi, prendendo in considerazione l'intera pianta e non la singola foglia:

- Classe 0: pianta priva di sintomi;
- Classe 1: bassa presenza di sintomi;
- Classe 2: media presenza di sintomi;
- Classe 3: alta presenza di sintomi.

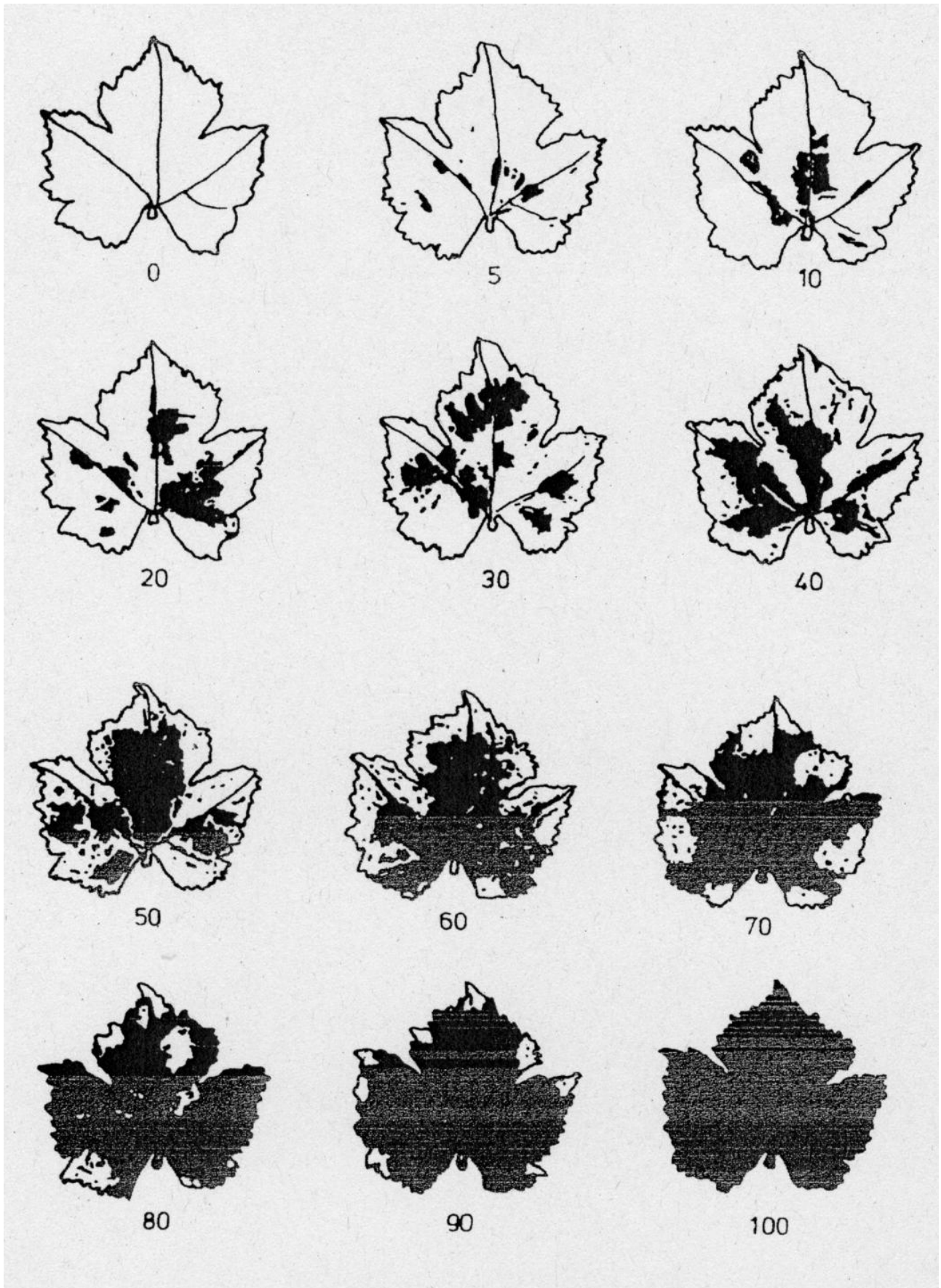


Fig. 3.6: schede OEPP/EPPO- percentuale di sporulazione sulla pagina inferiore delle foglie.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 UTILIZZO DI DIFFERENTI KIT DI ESTRAZIONE DEL DNA

Lo *step* iniziale di questo mio lavoro di tesi ha previsto l'estrazione del DNA dai vari campioni collezionati e già descritti nella sezione *materiali e metodi*. A tale scopo è stato effettuato un confronto tra due diversi kit di estrazione quali il kit DNAeasy 96 Plant Kit (QIAGEN, Germany) e il NucleoSpin® Plant II MN. Il kit DNAeasy 96 Plant Kit (QIAGEN, Germany) risulta piuttosto costoso per essere applicato al grande numero di piante analizzate in un processo di MAS; inoltre, negli ultimi anni, sta risultando sempre meno efficace in termini di resa di concentrazione di DNA (sebbene mantenga una buona purezza). I risultati sono molto altalenanti anche all'interno di una stessa piastra multipozzetto, per quanto l'estrazione venga svolta in serie e per larga parte sia automatizzata. Per questo motivo si è utilizzato la piastra in doppio dei campioni per testare un kit meno costoso (NucleoSpin® Plant II MN).

Il test non ha dato risultati positivi. Il kit della NucleoSpin® è risultato avere un'efficacia di estrazione poco superiore al kit della QIAGEN, ma produce campioni molto più contaminati da proteine. Qui sono riportati i valori medi rilevati dei campioni:

| | NucleoSpin® | QIAGEN |
|------------------------|-------------|--------|
| Concentrazione (ng/μl) | 15,42 | 10,22 |
| Lettura 260 nm | 0,31 | 0,20 |
| Lettura 280 nm | 0,19 | 0,10 |
| rapporto 260/280 | 1,18 | 2,00 |

Tabella 4.1

4.2 ANALISI MOLECOLARI DEI CAMPIONI

A seguito dell'estrazione del DNA dai vari campioni, si è proceduto con l'analisi molecolare degli stessi utilizzando marcatori associati ai diversi loci di resistenza; a questo scopo sono state analizzate diverse popolazioni di incrocio.

4.2.1 BRONNER X REAGENT

| | test parentale | <i>Rpv3</i> | | | <i>Ren3</i> | <i>Rpv10</i> | |
|-------|----------------|-------------|--------|--------|-------------|--------------|---------|
| | | VMC7F2 | UDV305 | UDV737 | ScOR A 760 | GF09-46 | GF09-47 |
| BXR1 | + | | - | - | + | - | - |
| BXR2 | + | + | + | + | + | - | - |
| BXR3 | + | + | + | + | + | - | - |
| BXR4 | + | + | + | + | + | + | + |
| BXR5 | + | + | + | + | + | - | - |
| BXR6 | + | + | + | + | + | - | - |
| BXR7 | + | + | + | + | - | - | - |
| BXR8 | + | - | - | - | + | + | + |
| BXR9 | + | - | | - | + | + | + |
| BXR10 | + | + | | + | + | + | + |
| BXR11 | + | - | - | - | + | - | - |
| BXR12 | + | | | | + | - | - |
| BXR13 | + | + | + | + | + | - | - |
| BXR14 | + | - | | | + | - | - |
| BXR15 | + | - | | - | + | + | + |
| BXR16 | + | + | | + | - | + | + |
| BXR17 | + | + | + | + | + | + | + |
| BXR18 | + | + | | + | + | + | + |
| BXR19 | + | - | | | + | + | + |
| BXR20 | + | - | | - | + | + | + |
| BXR21 | + | + | + | + | + | + | + |
| BXR22 | autofec. | | | - | + | + | + |
| BXR23 | + | - | | - | - | + | + |
| BXR24 | + | - | | - | + | - | - |

Tabella 4.2

In tabella 4.2 si sono sottolineati in verde gli individui che hanno ereditato con certezza tutte le resistenze. Infatti, come si può vedere nella tabella, i dati mancanti sono molti: in particolar modo il marcatore UDV305 ha dimostrato una scarsissima rilevabilità, nonostante i numerosi tentativi e le diverse condizioni testate.

Inoltre, come evidenziato in rosso, l'incrocio BXR22 è risultato, attraverso un test ad alta riproducibilità che ha fatto uso di marcatori universali, il prodotto di un'autofecondazione: di conseguenza è stato scartato dall'analisi poiché portante il patrimonio genetico di uno solo dei parentali, in questo caso della madre.

4.2.2 SOLARIS X REGENT

| | test parentale | <i>Rpv3</i> | | | <i>Ren3</i> | <i>Rpv10</i> | |
|-------|----------------|-------------|--------|--------|-------------|--------------|---------|
| | | VMC7F2 | UDV305 | UDV737 | ScOR A 760 | GF09-46 | GF09-47 |
| SXR1 | + | + | | + | + | - | - |
| SXR2 | + | + | + | | + | - | - |
| SXR3 | + | + | + | + | + | - | - |
| SXR4 | + | + | | + | + | + | + |
| SXR5 | + | - | | - | + | - | - |
| SXR6 | + | + | | + | - | - | - |
| SXR7 | + | + | + | + | + | - | - |
| SXR8 | + | + | + | + | + | + | + |
| SXR9 | + | - | | - | - | + | + |
| SXR10 | + | - | | - | + | + | + |
| SXR11 | + | + | | + | + | - | - |
| SXR12 | + | + | | | + | - | - |
| SXR13 | + | - | | | + | - | - |
| SXR14 | autofec. | - | | | + | - | - |
| SXR15 | autofec. | - | | - | + | + | + |
| SXR16 | + | - | | - | + | + | + |
| SXR17 | + | - | | - | + | + | + |
| SXR18 | + | + | | + | + | + | + |
| SXR19 | + | + | + | | + | + | + |
| SXR20 | autofec. | - | | - | + | + | + |
| SXR21 | + | + | + | | + | + | + |
| SXR22 | + | + | + | | + | + | + |
| SXR23 | + | + | + | | + | + | + |
| SXR24 | + | - | | - | + | - | - |

Tabella 4.3

Come nel caso precedente, il marcatore UDV305 si è dimostrato particolarmente poco riproducibile. Anche tra questi individui erano presenti piante derivanti da autofecondazione (e quindi, da scartare) quali SXR14, SXR15 e SXR20.

4.2.3 BC4 X KISHMISH VATKANA

Questo è stato il campione di popolazione in cui l'applicazione dei metodi genetici è risultata più semplice e immediata. Le piante che hanno ereditato tutte le resistenze sono una frazione molto alta rispetto al totale (circa un terzo).

| | test parentale | <i>Ren1</i> | <i>Rpv1</i> | | <i>Run1</i> |
|-------|----------------|-------------|-------------|--------|-------------|
| | | UDV-020 | VMC1g3.2 | VVIM11 | VMC8g9 |
| BXK1 | + | - | - | - | - |
| BXK2 | + | + | - | - | + |
| BXK3 | + | + | + | + | + |
| BXK4 | + | + | - | - | - |
| BXK5 | + | + | + | + | + |
| BXK6 | + | + | - | - | - |
| BXK7 | + | + | + | + | + |
| BXK8 | + | + | + | + | + |
| BXK9 | + | + | - | - | - |
| BXK10 | + | - | + | + | + |
| BXK11 | + | + | - | - | - |
| BXK12 | + | + | - | - | - |
| BXK13 | + | + | + | + | + |
| BXK14 | + | + | - | - | - |
| BXK15 | + | + | + | + | + |
| BXK16 | + | + | - | - | - |
| BXK17 | + | + | - | - | - |
| BXK18 | + | + | - | - | - |
| BXK19 | + | + | + | + | + |
| BXK20 | + | + | - | - | - |
| BXK21 | + | + | - | - | - |
| BXK22 | + | + | + | + | + |
| BXK23 | + | + | + | + | + |
| BXK24 | + | + | - | - | - |

Tabella 4.4

4.2.4 MONICA X PETRA

Sia Monica che Petra possiedono il locus *Rpv12*; l'incrocio in questo caso è stato effettuato anche per cercare di avere la resistenza in omozigoti, e verificare quindi un eventuale effetto additivo della presenza di *Rpv12* su entrambi gli alleli. Gli individui che hanno ereditato *Rpv12* da entrambi i genitori sono riportati con il testo in azzurro (tab. 4.5).

| | test parentale | Rpv1 | | Run1 | Rpv12 | |
|-------|----------------|----------|--------|--------|--------|--------|
| | | VMC1g3.2 | VVIM11 | VMC8g9 | UDV350 | UDV370 |
| MXP1 | + | - | - | - | - | + |
| MXP2 | + | + | + | + | + | + |
| MXP3 | + | + | - | - | + | + |
| MXP4 | + | - | - | - | - | - |
| MXP5 | autofec. | + | + | + | - | - |
| MXP6 | + | - | - | - | + | + |
| MXP7 | + | - | - | - | + | + |
| MXP8 | + | - | - | - | - | - |
| MXP9 | + | + | + | + | - | - |
| MXP10 | + | + | + | + | + | + |
| MXP11 | + | + | + | + | + | + |
| MXP12 | + | + | + | + | + | + |
| MXP13 | + | - | - | - | + | + |
| MXP14 | + | - | - | - | + | + |
| MXP15 | + | + | + | + | - | - |
| MXP16 | autofec. | + | + | + | - | - |
| MXP17 | + | + | + | + | - | - |
| MXP18 | + | - | - | - | + | + |
| MXP19 | + | - | - | - | + | + |
| MXP20 | + | + | + | + | + | + |
| MXP21 | + | - | - | - | - | - |
| MXP22 | + | + | + | + | + | + |
| MXP23 | + | + | + | + | + | + |
| MXP24 | + | - | - | - | - | - |

Tabella 4.5

4.3 ANALISI FENOTIPICHE DEI CAMPIONI

Le analisi fenotipiche riportate sono parziali a causa dell'alta moria di semenzali avvenuta durante luglio/agosto 2013, che ha ridotto il numero di individui di circa un terzo. Le cause sono da ricercare in alcuni problemi gestionali nelle serre (disguidi nella fertirrigazione e concause). Le piante sopravvissute, inoltre, non erano sempre sufficientemente sviluppate: alcuni dischetti fogliari sono marciti a causa dell'utilizzo di foglie troppo giovani e sottili, e nelle infezioni di peronospora sulla pianta intera non sempre si avevano foglie a sufficienza (10) per il conteggio completo.

| | DISCHETTI | | | FOGLIE | | | OIDIO |
|-------|-----------------------|-----------|-----|-----------------------|-----------|-----|-------|
| | Gravità | Incidenza | OIV | Gravità | Incidenza | OIV | |
| BXR1 | pianta morta | | | | | | |
| BXR2 | pianta morta | | | | | | |
| BXR3 | pianta morta | | | | | | |
| BXR4 | 2 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR5 | pianta troppo piccola | | | | | | |
| BXR6 | 1 | 33 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR7 | 1 | 50 | 7 | 0 | 0 | 9 | 3 |
| BXR8 | 4 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| BXR9 | 15 | 100 | 5 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR10 | 0 | 0 | 9 | pianta troppo piccola | | | |
| BXR11 | 1 | 17 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR12 | 13 | 100 | 5 | 1 | 20 | 7 | 1 |
| BXR13 | pianta morta | | | | | | |
| BXR14 | 2 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 2 |
| BXR15 | 2 | 67 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR16 | pianta troppo piccola | | | | | | |
| BXR17 | 13 | 100 | 5 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR18 | pianta morta | | | | | | |
| BXR19 | pianta morta | | | | | | |
| BXR20 | 8 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR21 | 2 | 86 | 7 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| BXR22 | pianta morta | | | | | | |
| BXR23 | 8 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXR24 | 38 | 100 | 1 | 3 | 56 | 7 | 1 |

Tabella 4.6

| | DISCHETTI | | | FOGLIE | | | OIDIO |
|-------|-----------------------|-----------|-----|---------|-----------|-----|-------|
| | Gravità | Incidenza | OIV | Gravità | Incidenza | OIV | |
| SXR1 | 10 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 2 |
| SXR2 | 24 | 100 | 3 | 0 | 0 | 9 | 3 |
| SXR3 | 3 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 2 |
| SXR4 | pianta morta | | | | | | |
| SXR5 | 24 | 100 | 3 | 3 | 50 | 7 | 3 |
| SXR6 | pianta troppo piccola | | | | | | |
| SXR7 | 3 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| SXR8 | pianta morta | | | | | | |
| SXR9 | 19 | 100 | 5 | 0 | 0 | 9 | 3 |
| SXR10 | pianta troppo piccola | | | | | | |
| SXR11 | pianta troppo piccola | | | | | | |
| SXR12 | 3 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 3 |
| SXR13 | 63 | 100 | 1 | 6 | 75 | 7 | 3 |
| SXR14 | 9 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 3 |
| SXR15 | pianta morta | | | | | | |
| SXR16 | pianta morta | | | | | | |
| SXR17 | 9 | 100 | 7 | 1 | 25 | 7 | 3 |
| SXR18 | pianta morta | | | | | | |
| SXR19 | 4 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| SXR20 | pianta morta | | | | | | |
| SXR21 | pianta morta | | | | | | |
| SXR22 | 3 | 100 | 7 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| SXR23 | 11 | 100 | 5 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| SXR24 | 51 | 100 | 1 | 0 | 0 | 9 | 1 |

| | DISCHETTI | | | FOGLIE | | | OIDIO |
|-------|--------------|-----------|-----|--------------|-----------|-----|-------|
| | Gravità | Incidenza | OIV | Gravità | Incidenza | OIV | |
| BXK1 | 29 | 100 | 3 | 21 | 100 | 3 | 2 |
| BXK2 | pianta morta | | | | | | |
| BXK3 | 17 | 100 | 5 | pianta morta | | | |
| BXK4 | 14 | 100 | 5 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| BXK5 | 32 | 100 | 1 | 18 | 100 | 5 | 2 |
| BXK6 | 19 | 100 | 5 | 33 | 100 | 1 | 1 |
| BXK7 | pianta morta | | | | | | |
| BXK8 | 44 | 100 | 1 | 13 | 100 | 5 | 1 |
| BXK9 | pianta morta | | | | | | |
| BXK10 | 29 | 100 | 3 | 30 | 100 | 3 | 1 |
| BXK11 | 44 | 100 | 1 | 28 | 100 | 3 | 1 |
| BXK12 | 13 | 100 | 5 | 12 | 80 | 5 | 1 |
| BXK13 | pianta morta | | | | | | |
| BXK14 | 13 | 100 | 5 | 21 | 100 | 3 | 1 |
| BXK15 | 23 | 100 | 3 | 12 | 100 | 5 | 1 |
| BXK16 | pianta morta | | | | | | |
| BXK17 | pianta morta | | | | | | |
| BXK18 | 53 | 100 | 1 | 38 | 100 | 1 | 1 |
| BXK19 | pianta morta | | | | | | |
| BXK20 | pianta morta | | | | | | |
| BXK21 | 34 | 100 | 1 | 28 | 100 | 3 | 2 |
| BXK22 | 26 | 100 | 3 | 3 | 30 | 7 | 1 |
| BXK23 | pianta morta | | | | | | |
| BXK24 | 3 | 100 | 7 | 12 | 100 | 5 | 3 |
| MXP1 | 2 | 63 | 7 | 12 | 100 | 5 | 3 |
| MXP2 | 3 | 100 | 7 | 10 | 80 | 5 | 2 |
| MXP3 | 0 | 0 | 9 | 8 | 100 | 7 | 2 |
| MXP4 | 9 | 100 | 7 | 6 | 71 | 7 | 2 |
| MXP5 | 19 | 100 | 5 | 14 | 86 | 5 | 2 |
| MXP6 | 5 | 100 | 7 | 12 | 90 | 5 | 3 |
| MXP7 | 2 | 50 | 7 | 9 | 89 | 7 | 3 |
| MXP8 | 26 | 100 | 3 | pianta morta | | | |
| MXP9 | 26 | 100 | 3 | 20 | 100 | 3 | 1 |
| MXP10 | 0 | 13 | 7/9 | 8 | 80 | 7 | 1 |
| MXP11 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| MXP12 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| MXP13 | 0 | 0 | 9 | 15 | 100 | 5 | 3 |
| MXP14 | 1 | 25 | 7/9 | pianta morta | | | |
| MXP15 | 1 | 14 | 7/9 | 8 | 60 | 7 | 1 |
| MXP16 | pianta morta | | | | | | |
| MXP17 | 8 | 75 | 7 | 12 | 100 | 5 | 2 |
| MXP18 | pianta morta | | | | | | |
| MXP19 | 5 | 100 | 7 | 5 | 50 | 7 | 2 |
| MXP20 | 0 | 13 | 7/9 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| MXP21 | pianta morta | | | | | | |
| MXP22 | 0 | 0 | 9 | pianta morta | | | |
| MXP23 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| MXP24 | 4 | 75 | 7 | 14 | 90 | 5 | 3 |

Tabella 4.7

Come si desume dalle tabelle, il numero di piante morte è notevole (30 su 96). L'evento ha interessato tra l'altro anche le poche settimane che sono intercorse tra il test d'infezione su dischetti (effettuato in data 28 agosto 2013) e la lettura dei test d'infezione su pianta intera (11 settembre, incroci BXK e MXP; 23 settembre, incroci BXR e SXR). Un altro ostacolo che ha determinato forti difficoltà nella piena riuscita del test, e, probabilmente, l'elevata moria, è stata la crescita poco omogenea dei semenzali. A causa, forse, della sistemazione troppo fitta e dell'assenza di un sostegno su cui permettere ai tralci di svilupparsi in modo ordinato, molte piante, coperte dalla vegetazione di quelle adiacenti, hanno ritardato notevolmente lo sviluppo. In alcuni casi non è stato possibile nemmeno eseguire il test su dischetti, poiché le plantule disponevano di 3-4 foglioline apicali appena. D'altronde in un processo di piramidazione in cui si incrociano, per più generazioni, individui altamente eterozigoti, è inevitabile dare luogo a popolazioni con altissima variabilità genetica al loro interno, e di conseguenza a genotipi molto meno vigorosi di altri. Per questo motivo sarebbe opportuno porre le plantule in condizioni mirate a ridurre al minimo la competizione di crescita all'interno della popolazione. Senza diminuire la concentrazione di individui per unità di superficie, che, in serra, causerebbe un notevole aumento dei costi, probabilmente basterebbe introdurre un sostegno vegetativo per ogni vaso fin dalle prime settimane di vita, come già viene fatto per piante di età superiore, su cui far sviluppare il giovane tralcio. Una crescita verticale ordinata degli individui consentirebbe, tra l'altro:

- una distribuzione luminosa più omogenea e più distribuita sulla superficie fogliare complessiva, e, di conseguenza, una crescita più veloce;
- una serie di facilitazioni nei confronti degli operatori, snellendo tutti i procedimenti in cui è richiesto l'accesso diretto e garantito ai singoli individui, in quanto ricercare l'apice corretto dell'individuo da campionare all'interno di una massa vegetale disordinata è un procedimento lento e faticoso;
- una distribuzione molto più omogenea dell'inoculo di peronospora sulla superficie fogliare durante i test;
- una salvaguardia dal danneggiamento intenso a cui va incontro la pianta nel momento in cui, ad esempio per la lettura delle infezioni su foglia, si deve districare

il tralcio, rompendo inevitabilmente numerosi viticci e perdendo molte foglie non più disponibili per la lettura.

4.3.1 OSSERVAZIONI SUL CONFRONTO TRA I DUE TEST DI INFEZIONE PER LA RESISTENZA A PERONOSPORA

Considerato l'esiguo numero di individui, non è possibile fare alcun tipo di analisi statistica che consenta di dare un giudizio sulla reale inferenza che sussiste tra i due metodi, né una vera valutazione sulla loro efficacia e predittività.

Mettendo infatti in relazione la percentuale di superficie infetta totale (gravità) riscontrata sui dischetti e sulle foglie in un grafico di regressione semplice,

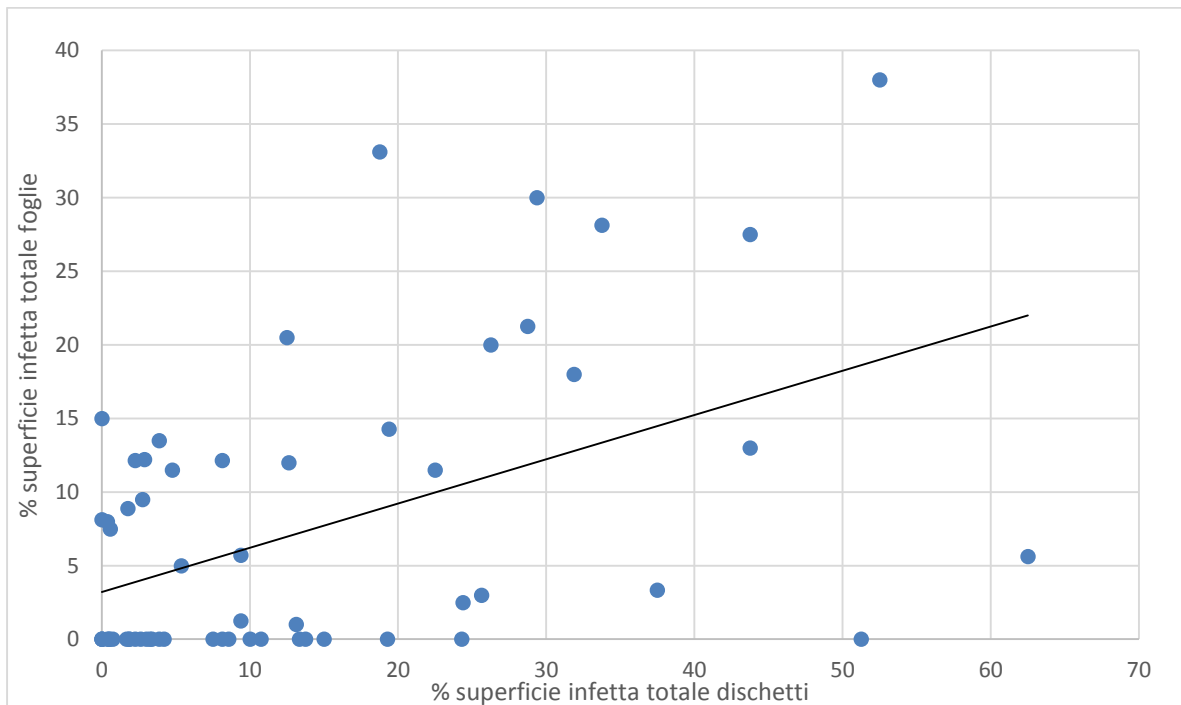


Grafico 4.1: Grafico di dispersione delle percentuali di superficie infetta totale dei due metodi messi in associazione

risulta evidente, dall'analisi grafica dei residui, come la correlazione lineare tra le due serie sia scarsa, a causa dell'abbondanza di valori anomali.

Considerazioni più interessanti possono invece essere fatte mettendo a confronto le medie delle superfici totali infette tratte dai due metodi:

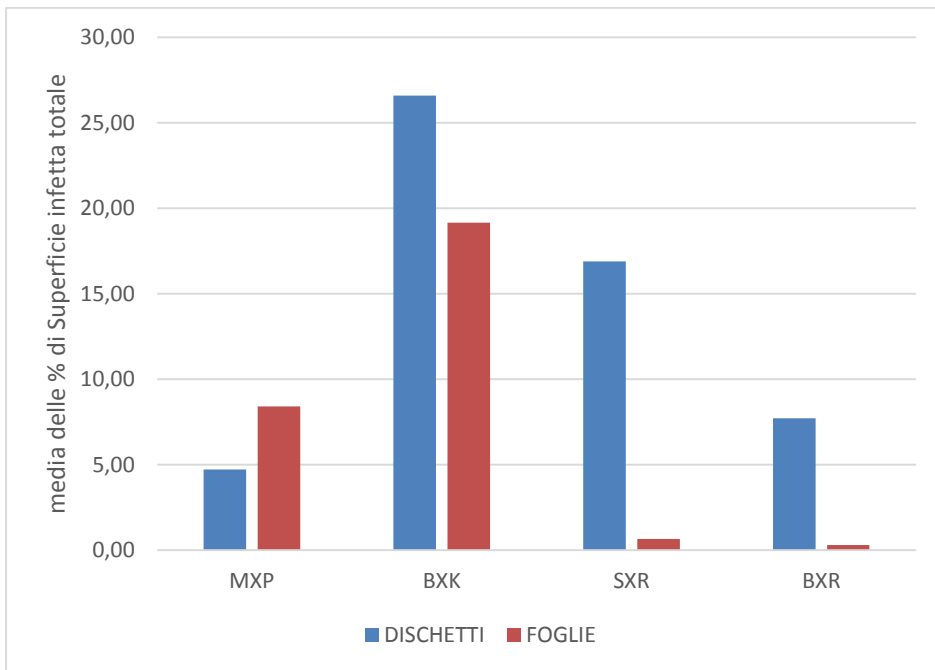
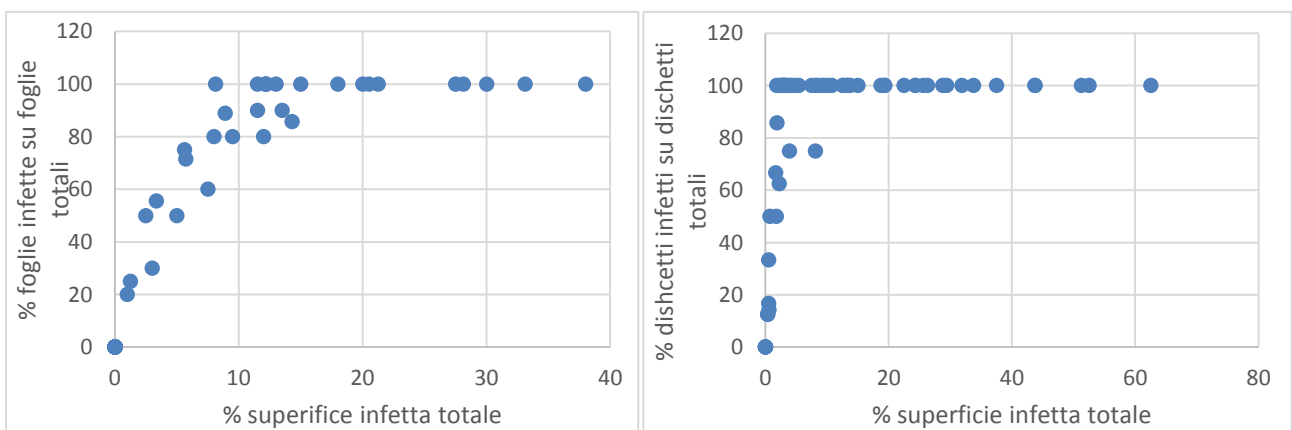


Grafico 4.2: diagramma di confronto, per ogni popolazione, delle medie delle percentuali di superficie infetta totale riscontrati con i due metodi

Da questo confronto si evidenzia bene come i risultati dalla lettura dei dati fogliari di SXR e BXR non siano una rappresentazione verosimile della resistenza delle due popolazioni alla peronospora; il dato è decisamente in contrasto con la percentuale di sporulazione rilevata sui dischetti. Questa considerazione, unita all'osservazione dei due grafici di regressione seguenti:



Grafici 4.3 e 4.4: grafici di dispersione delle percentuali di superficie infetta totale associati alle percentuali di foglie/dischetti infetti su foglie/dischetti totali dei due differenti metodi

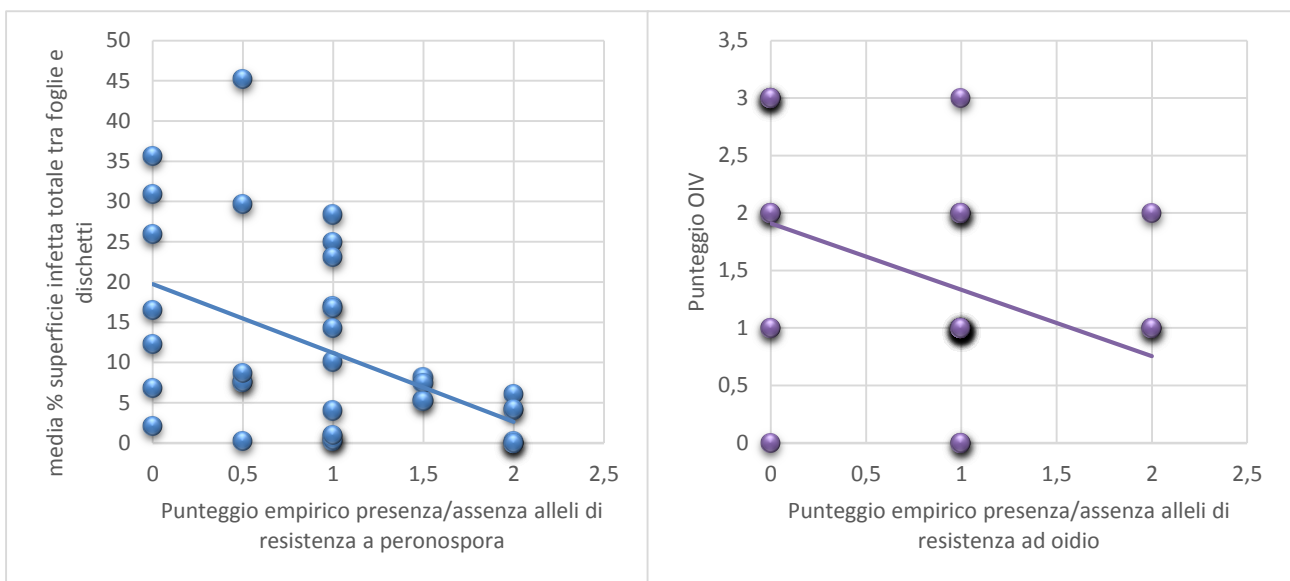
suggerisce che, nelle condizioni in cui le due osservazioni sono state svolte, il test su dischetto fogliare rappresenti un'immagine più verosimile della reale resistenza della pianta.

Infatti, partendo dal presupposto che l'efficacia del test sia proporzionale all'omogeneità con cui è stato distribuito l'inoculo sulla pagina inferiore della foglia (o sulla superficie di dischetto) e, ovviamente, dal mantenimento delle condizioni ideali per l'infezione, è corretto supporre che, in una situazione di distribuzione di inoculo ideale, in condizioni ottimali, l'eventuale sporulazione dovrebbe manifestarsi, indipendentemente dalla percentuale di superficie aggredita, in maniera uguale su ogni campione analizzato. I due grafici appena mostrati, che correlano superficie infetta totale al numero di foglie/dischetti infetti su foglie/dischetti totali, mostrano come il metodo di infezione su dischetto si avvicini maggiormente ad una condizione ideale rispetto all'infezione della pianta intera. Osservando inoltre che le media totali delle percentuali di superficie infetta dei dischetti è circa il doppio di quella fogliare (13,37% contro 7,22%), si può effettivamente ipotizzare che la maggior accuratezza del test su dischetto derivi da una miglior distribuzione di inoculo sulla superficie del disco rispetto a quella fogliare, il che è verosimile. Infatti, infettare le piante intere è un procedimento lungo e complicato che è stato sicuramente aggravato, come detto, dall'intricata massa vegetale, che ha di fatto reso quasi impossibile raggiungere con la nebulizzazione tutte le pagine inferiori delle foglie.

4.4 CONFRONTO TRA ANALISI FENOTIPICHE E GENOTIPICHE

Analogamente a quanto detto sopra, non è possibile con questi pochi numeri fare un'analisi che confermi i risultati dei test fenotipici attraverso l'analisi dei marcatori molecolari, sebbene si sia tentato di trovare un qualche tipo di correlazione significativa. Bisogna inoltre considerare che per questo tipo di valutazione si è dovuto eliminare tutti i campioni che presentavano osservazioni genotipiche/ fenotipiche incomplete, oltre a tutti gli individui morti, pertanto il numero di campioni totali di cui è stato possibile fare un confronto completo si riduce così a 41. Una verifica di inferenza tra i due dati è stata effettuata ugualmente attribuendo un punteggio empirico numerico alla presenza/assenza dell'allele di resistenza (1 presenza/0 assenza allele di resistenza; in caso di risultati discordanti tra i marcatori di un singolo allele, ogni marcatore varrà il reciproco del numero totale di marcatori del locus: in caso ci siano 3 marcatori, ad esempio, la presenza di ogni marcatore varrà 1/3). Quindi sono stati correlati i punteggi così ottenuti con le osservazioni fenotipiche;

per la resistenza a peronospora, sono stati uniti i punteggi relativi agli alleli *Rpv* alla media tra le superfici totali infette riscontrate sui dischetti e sulle foglie; per l'oidio sono stati correlati i punteggi dei propri alleli di resistenza con i punteggi OIV. Come si denota dal grafico, in entrambi i casi, in cui c'è inferenza significativa, si ha anche una certa regressione lineare negativa, poiché un alto punteggio OIV ed un'alta superficie fogliare infetta determinano una bassa resistenza.



Grafici 4.5 e 4.6: grafici di dispersione che evidenziano una leggera correlazione tra dati fenotipici e genotipici

È difficile poter trarre delle conclusioni, utilizzando questi dati, riguardo ad una eventuale efficacia di una preselezione attraverso l'espressione fenotipica della resistenza. In BC4 x Kishmish Vatkana, facendo una preselezione, ad esempio, per gli esemplari la cui media dei punteggi OIV non superi il 5 per la peronospora e l'1 per l'oidio, si eliminerebbero tutte le piante tranne due, di cui solo una delle due (BXK22) possiede tutte le resistenze dell'incrocio, a fronte delle 4 totali.

In Bronner x Regent, sulle poche piante ancora vive (6) rimaste, tutte le piante mostrano una buona resistenza alla peronospora, e solo in un caso vi è una marcata non-resistenza ad oidio (unico esemplare che non ha ereditato la resistenza *Ren3*). In questo caso l'espressione fenotipica è abbastanza affidabile, ma non mostra differenze significative tra gli esemplari che hanno ereditato la resistenza a peronospora e i due che non l'hanno ereditata.

Diversamente in Monica x Petra, in cui, dalle analisi fenotipiche, emerge una notevole distinzione tra piante molto ben resistenti e piante non resistenti, una eventuale preselezione che conservi tutte le piante superiori al grado OIV per la peronospora superiore al 7 (compreso), e le piante inferiori all'uno (compreso) per l'oidio, porta invece a risultati molto positivi. Rimangono infatti in questo modo solo 6 piante su 16, 4 delle quali portatrici complete delle resistenze, di cui una portatrice della resistenza omozigote per *Rpv12* (andrebbero persi in questo caso solo un genotipo portatore delle resistenze complete e due con la resistenza omozigote per *Rpv12*, sebbene entrambi risultino mancanti dell'allele per la resistenza ad oidio *Run1*). Si sottolinea il fatto che il genotipo più interessante del campione, MXP10, portatore di tutti gli alleli di resistenza e di *Rpv12* in omozigosi, con questa selezione viene selezionato e mantenuto. È altresì interessante notare come, in questo caso, la correlazione tra presenza/assenza dell'allele di resistenza *Run1* per l'oidio sia favorevolmente correlata con l'attribuzione del punteggio OIV per la resistenza. Per miglior comprensione si riportano i dati genotipici e fenotipi di questa popolazione affiancati:

| | test p. | <i>Rpv1</i> | | <i>Run1</i> | <i>Rpv12</i> | | DISCHETTI | | | FOGLIE | | | OIDIO |
|--------------|----------|-------------|----------|-------------|--------------|----------|-----------|-----------|------------|----------|-----------|----------|----------|
| | | VMC1g3.2 | VVIM11 | VMC8g9 | UDV350 | UDV370 | Gravità | Incidenza | OIV | Gravità | Incidenza | OIV | |
| MXP2 | + | + | + | + | + | + | 3 | 100 | 7 | 10 | 80 | 5 | 2 |
| MXP3 | + | + | - | - | + | + | 0 | 0 | 9 | 8 | 100 | 7 | 2 |
| MXP4 | + | - | - | - | - | - | 9 | 100 | 7 | 6 | 71 | 7 | 2 |
| MXP5 | autofec. | + | + | + | - | - | 19 | 100 | 5 | 14 | 86 | 5 | 2 |
| MXP6 | + | - | - | - | + | + | 5 | 100 | 7 | 12 | 90 | 5 | 3 |
| MXP7 | + | - | - | - | + | + | 2 | 50 | 7 | 9 | 89 | 7 | 3 |
| MXP9 | + | + | + | + | - | - | 26 | 100 | 3 | 20 | 100 | 3 | 1 |
| MXP10 | + | + | + | + | + | + | 0 | 13 | 7/9 | 8 | 80 | 7 | 1 |
| MXP11 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| MXP12 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| MXP13 | + | - | - | - | + | + | 0 | 0 | 9 | 15 | 100 | 5 | 3 |
| MXP15 | + | + | + | + | - | - | 1 | 14 | 7/9 | 8 | 60 | 7 | 1 |
| MXP17 | + | + | + | + | - | - | 8 | 75 | 7 | 12 | 100 | 5 | 2 |
| MXP19 | + | - | - | - | + | + | 5 | 100 | 7 | 5 | 50 | 7 | 2 |
| MXP20 | + | + | + | + | + | + | 0 | 13 | 7/9 | 0 | 0 | 9 | 0 |
| MXP23 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 9 | 1 |
| MXP24 | + | - | - | - | - | - | 4 | 75 | 7 | 14 | 90 | 5 | 3 |

Tabella 4.8

5. CONCLUSIONI

Gli obiettivi preposti erano, come detto, tentare di descrivere nel dettaglio un processo di miglioramento genetico assistito per la resistenza alle malattie in vite e acquisire un'idea pratica della sua messa in atto. Ciò è stato raggiunto grazie ad una esperienza di tirocinio trasversale, che mi ha permesso di partecipare in prima persona a tutti i passaggi che compongono questo complesso processo, che investe personale molto differenziato e gruppi di ricerca con competenze diverse presso il Centro Ricerca e Innovazione della fondazione E. Mach: si passa dal campionamento di semenzali allevati in serra, all'estrazione del DNA, dalle analisi genetiche fino ai test fenotipici.

In questo modo ho potuto affiancare alla mera descrizione una serie di constatazioni di carattere tecnico: valutare e confrontare le efficienze dei due kit di estrazione del DNA e discriminarne il più efficace, fare delle considerazioni sull'efficacia dei diversi metodi di infezione artificiale, mettere in luce le difficoltà di messa punto di un processo laborioso e ancora in fase di standardizzazione.

Un ulteriore importante aspetto che riguarda la MAS, che va sottolineato, è il lavoro di ricerca necessario a priori, che consente di valutare quali siano i marcatori genetici delle resistenze disponibili in letteratura, quali tra questi i più riproducibili, e quali e quanti marcatori siano necessari per ogni locus al fine di garantire una buona affidabilità diagnostica della resistenza. Nella fase di validazione è poi necessario ricostruire, tramite svariati confronti, la taglia allelica associata alla resistenza, poiché a volte essa non è riportata in letteratura.

Concludendo si può dire che, nonostante l'utilizzo diffuso e standardizzato della MAS in vite soffra ancora di alcuni limiti, è evidente come (anche in un esiguo numero di individui come quello riportato) si possano immediatamente riconoscere alcuni vantaggi pratici che ne rendono l'utilizzo odierno fondamentale; come la facilità di riconoscimento degli individui autofecondati, o la velocità con cui è possibile mettere in atto un processo di piramidazione

come quello riportato, anche incrociando individui di partenza molto eterozigoti (derivanti a loro volta da incroci) come i genotipi qui utilizzati. Trattandosi di tratti quantitativi, l'associazione tra un marcatore e il fenotipo di resistenza non sempre è risultata chiara (sebbene si sia potuto osservare una certa tendenza): il valore predittivo dei marcatori, come l'eventuale effetto additivo conferito dalla piramidazione, dovrà essere valutato sulle popolazioni intere, o, quantomeno, su numeri di individui molto più alti.

BIBLIOGRAFIA:

- Adam-Blondon A. F., Lahogue-Esnault F., Bouquet A., Boursiquot J. M., This P., 2001: *Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars*. *Vitis* 40: 147-155.
- Barker C. L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M. B., Bouquet A., Adam-Blondon A. F., Thomas M. R., Dry I., 2005: *Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library*. *Theor Appl Genet* 111: 370-377.
- Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A. F., Cipriani G., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G., 2009: *Resistance to Plasmopara viticola in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site*. *Theor Appl Genet* 120: 163-176.
- Blasi P., Blanc S., Prado E., Ruhl E. H., Mestre P., Merdinoglu D., 2011: *Construction of a reference linkage map of Vitis amurensis and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew*. *Theor Appl Genet* 123: 43-53.
- Boso S., Kassemeyer H. H., 2008: *Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew*. *Vitis* 47: 39-49.
- Bouquet A., Paquet J., Adam-Blondon A. F., Torregrosa L., Merdinoglu D., Wiedermann-Merdinoglu S., 2000: *Vers l'obtention de variétés de vigne résistantes à l'oidium et au mildiou par les méthodes conventionnelles et biotechnologiques*. *Progr Agric Vitic* 117: 383-389.
- Cabezas J. A., Cervera M. T., Ruiz-Garcia L., Carreno J., Martinez-Zapater J. M., 2006: *A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine*. *Genome Sour* 49: 1572-1585.
- Coleman C., Copetti D., Cipriani G., Hofmann S., Kozman P., Kovacs L., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G., 2009: *The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines*. *BMC Genet* 10: 89.

- Cozzolino E., 2004: *Avversità della vite e le strategie di difesa*, in *Viticultura ed enologia biologica*. Bologna: Edizioni Edagricole, 236-243.
- Dalbo M. A., Ye G. N., Weeden N. F., Wilcox W. F., Reisch B. I., 2001: *Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 126: 83-89.
- Dangl J. F., Horvath D. M., Staskawicz B. J., 2013: *Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment*. Science 341: 746-751
- DeLattin G., 1957: *On the genetics of grapevines. Present results of the factor analysis of Vitis*. Vitis 1: 1-8
- Delmotte F., Mestre P., Schneider C., Kassemeyer H. H., Kozma P., Richart-Cervera S., Rouxel M., Delière L., 2013: *Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: Evidence from European populations of Plasmopara viticola, the causal agent of grapevine downy mildew*. Infection, Genetics and Evolution xxx: xxx-xxx (non ancora pubblicato)
- Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S. D., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindrić P., Kovács L., Morgante M., Testolin R., 2012: *Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance*. Theor Appl Genet 124: 277-286.
- Eibach R., Zyprian E., Welter L, Töpfer R., 2007: *The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding*. Vitis 46: 120-124
- Feechan A., Kabbara S., Dry I. B., 2010: *Mechanisms of powdery mildew resistance in the Vitaceae family*. Molecular plant pathology 12: 263-274.
- Feechan A., Anderson C., Torregrosa L., Jermakow A., Mestre P., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Walker A. R., Cadle-Davidson L., Reisch B., Aubourg S., Bentahar N., Shrestha B., Bouquet A., Adam-Blondon A. F., Thomas M. R., Dry I. B., 2013: *Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species Muscadinia rotundifolia identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine*. The Plant Journal 76: 661-674

- Fisher B. M., Salakhutdinov I., Akkurt M., Eibach R., Edwards K. J., Töpfer R., Zyprian E. M., 2004: *Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine*. Theor Appl Genet 108: 501-515.
- Gómez-Zeledón J., Zipper R., Spring O., 2013: *Assessment of phenotypic diversity of Plasmopara viticola on Vitis genotypes with different resistance*. Crop Protection 54: 221-228.
- Hedrick U. P., Anthony R. D., (1915): *Inheritance of certain characters of grapes*. J. Agri. Res. 4:315-330.
- Hoffmann S., Di Gaspero G., Kovács L., Howard S., Kiss E., Galbács Z., Testolin R., Kozma P., 2007: *Resistance to Erysiphe necator in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth*. Theor Appl Genet 116: 427-438
- Husfeld B., 1962: *Reben*. In: H Kappert, W Rudorf (eds) *Handbuch der Pflanzenzüchtung VI*. Paul Parey, Berlin und Hamburg, Germany, pp 723-773.
- Kiss E., Galli Z., Halász G., Heszky L., Hoffmann S., Kozma P., Szoke A., Veres A., 2010: *Gombarezisztencia gének térképezése szőlőben = Mapping resistance genes against fungi in grapevine*. Project Report. OTKA.
- Molnar S., Galbacs Z., Hasasz G., Hoffmann S., Kiss E., Kozma P., Veres A., Galli Z., Szöke A., Heszky L., 2007: *Marker assisted selection (MAS) for powdery mildew resistance in a grapevine hybrid family*. Vitis 46: 212-213
- Moreira F. Madini A., Marino R., 2011: *Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (Vitis spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance*. Tree Genet Genomes 7: 153– 167.
- OEPP/EPPO (1997). *Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products, vol. 2, fungicides and bactericides*. OEPP/EPPO, France: 197.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin O.I.V. (2009). *Code des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis*. Deuxième édition (Dedon, Paris).

- Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A. F., 2001: *Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection*. Theor Appl Genet 103: 1201-1210.

- Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R., 2011: *Rpv10: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine*. Theor Appl Genet 124: 163-176.

- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G. S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando M. S., Ibáñez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhães R., Meredith C. P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E., 2004: *Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars*. Theor Appl Genet 109: 1448-1458.

- Töpfer R., Hausmann L., Eibach R., 2011: *Genetics, Genomics and Breeding of Grapes, cap. 7: Molecular Breeding*. Editors: Adam-Blondon A., Martinez-Zapater J. M., Kole C. CRC Press, USA, pp 160-185

- van der Biezen E. A., Freddie C.T., Kahn K., Parker J.E., Jones J.D., 2001: *Arabidopsis RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components*. Plant J. 29: 439-451.

- Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Cindrić P., Kozma P., Scalabrin S., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G., 2013: *Historical Introgression of the Downy Mildew Resistance Gene Rpv12 from the Asian Species Vitis amurensis into Grapevine Varieties*. PLOS ONE, April 2013, Volume 8, Issue 4, e61228

- Weeden N. F., Hemmat M., Lawson D. M., Lodhi M., Bell R. L., Manganaris A. G., Reisch B. I., Brown S. K., Ye G. N., 1994: *Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops*. Euphytica 77: 71-75.

- Welter L. J., Göktürk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Töpfer R., Zyprian E., 2007: *Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (Vitis vinifera L)*. Mol Breed 20: 359-374.

- Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Coste P., Dumas V., Butterlin G., Bouquet A., Merdinoglu D., 2006: *Genetic analysis of resistance to downy mildew derived from Muscadinia rotundifolia*. 9th Int Conf Grape Genet Breeding, 2-6 July 2006, Udine, Italy.

- Wiedemann-Merdinoglu S., Dumas V., Dorne M. A., Duchêne E., Mestre P., Merdinoglu D., 2013: *Development of a phenotyping platform to assess grapevine resistance to downy and powdery mildews*. Cost Action FA 1003. Development of phenotyping methodologies. Madrid. 2013.

- <http://en.wikipedia.org/wiki/File:UncinulaNecatorOnGrapes.jpg>

Ringraziamenti:

In primo luogo un sentito grazie alle mie relatrici, la Dottoressa Grando e la Professoressa Lucchin.

Desidero ringraziare vivamente Silvia Lorenzi per il costante supporto che mi ha fornito durante il periodo di tirocinio alla Fondazione E. Mach e per la disponibilità che mi ha garantito mentre scrivevo questa tesi.

Devo ringraziare poi Antonella Vecchione e Luca Zulini, a cui mi sono affiancato per effettuare le osservazioni fenotipiche. Mi hanno insegnato molto riguardo le metodologie in questione e hanno raccolto ed elaborato i miei dati. Non posso non essere riconoscente anche a loro per la grande disponibilità mostrata.

Grazie a Simone Larger, che mi ha seguito con pazienza durante le fasi di estrazione in piattaforma di sequenziamento, e a Maria Lucia Prazzoli, che ha corretto con molta cura questa tesi.

Grazie alla mia famiglia e alle persone che mi sono vicine.