

## L'identificazione varietale attraverso l'analisi del DNA

(Sintesi)

La ricerca di metodi di identificazione delle varietà di vite svincolati dall'ampelografia si è resa necessaria per la complessità e le criticità di questa disciplina, basata principalmente sulla morfologia degli organi della pianta. Attualmente l'identificazione varietale è supportata dall'analisi di particolari marcatori del DNA chiamati microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeats), analoghi a quelli usati per l'uomo nei test di paternità o per risalire ai proprietari di tracce biologiche lasciate, per esempio, in luoghi dove si sono consumati dei delitti. Per la vite, la storia di questi marcatori si sviluppa negli anni Novanta, quando ricerche effettuate in Australia, California e Austria individuarono una cinquantina di SSR che si cominciarono a testare nei laboratori di tutto il mondo. Marcatori del DNA di altro tipo, infatti, avevano mostrato forti criticità e la ricerca era in piena attività. Un'occasione d'oro si offrì nell'ambito di un progetto europeo (GenRes081, 1997-2002), dedicato alla conservazione e alla caratterizzazione delle risorse genetiche viticole: qui si costituì un gruppo di lavoro di nove partner appartenenti a sei Paesi europei che, in base ai dati disponibili, selezionarono un set di sei SSR particolarmente promettenti e si proposero di valutarne le potenzialità applicative soprattutto in termini di riproducibilità dei segnali. Il coordinatore distribuì a ciascun partner un mazzetto di talee di alcune decine di varietà, che ognuno mise a germogliare per ottenere le foglioline da cui estrarre il DNA. Ogni partner procedette in maniera indipendente e con propri protocolli per tutte le fasi dell'analisi, dalla purificazione del DNA, all'amplificazione, alla rilevazione dei segnali. I profili molecolari varietali vennero poi inviati al coordinatore e confrontati. Il risultato fu eccezionale: la riproducibilità dei dati sfiorava il 99%. I risul-

\* CREA, Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia (Conegliano)

tati ottenuti furono pubblicati nel 2004 in un articolo che rappresentò la pietra miliare dello sviluppo futuro dell'applicazione di questi marcatori per l'identificazione delle varietà di vite: l'uso comune di questo set, esteso in seguito a nove SSR, applicato su larga scala dalla comunità scientifica viticola internazionale consentì di implementare database molecolari che continuano ad arricchirsi di nuovi profili SSR (si veda per esempio il *Vitis International Variety Catalogue*, <http://www.vivc.de/>). Questa massa enorme di informazioni ha consentito passi da gigante nell'incremento delle conoscenze sul germoplasma viticolo mondiale, attraverso il chiarimento di nuove omonimie, sinonimie, errate denominazioni, l'individuazione di varianti somatiche, nuove scoperte sulle migrazioni delle varietà. Ripercussioni importanti si sono avute anche per la migliore gestione delle collezioni ampelografiche e del Registro nazionale delle varietà di vite. Il profilo SSR di un vitigno si può rappresentare come una stringa univoca di numeri. Quando si desidera identificare una vite anonima o controllare se è stata correttamente denominata, si produce il profilo SSR del campione e si confronta la stringa di dati con gli archivi disponibili o con i dati di letteratura. Quando si trova coincidenza, il campione viene identificato. I confronti sono effettuati a 360 gradi, senza altro limite che la presenza di quel profilo nell'archivio; in caso di assenza, l'identificazione potrà avvenire a posteriori, a mesi o anni di distanza, magari da parte di altri gruppi di ricercatori. Attualmente, produrre un profilo SSR è relativamente semplice, più complessa è la corretta associazione tra profilo e nome del vitigno. Infatti, questa associazione è semplice per le varietà ben note, ma diventa più complicata per quelle via via meno conosciute, richiedendo talvolta anni di studi per arrivare a conclusioni corrette. Dal punto di vista pratico, qualunque parte della pianta può essere analizzata, foglia, legno, radice o raspo; ciò significa che l'analisi per l'identificazione varietale si può eseguire in qualunque periodo dell'anno. Anche tecnicamente sono stati compiuti grandi progressi, infatti l'analisi si può realizzare con un estratto grezzo di DNA ed in multiplex, cioè amplificando più marcatori contemporaneamente. Questi nuovi protocolli hanno permesso di abbattere i tempi ed i costi di questa analisi, rendendola accessibile a chiunque ne abbia bisogno. Per esempio, presso il Centro di ricerca per la viticoltura e l'enologia di Conegliano è attivo da alcuni anni il SIV, Servizio di Identificazione delle Varietà di vite. Il SIV è nato grazie al supporto finanziario del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali che, attraverso progetti sviluppati negli anni passati, ha consentito di implementare il database molecolare di riferimento cui il Servizio si appoggia.

I profili microsatellite delle varietà di vite sono disponibili nel database

on-line del Registro nazionale (<http://catalogoviti.politicheagricole.it>). Inoltre il profilo SSR è richiesto prima di iscrivere nuove varietà e cloni, allo scopo di evitare ridondanze che, purtroppo, affliggono il Registro, o di iscrivere cloni attribuendoli alla varietà sbagliata.

Al suo esordio, l'attività di genotyping permise di delineare, nel 1999, una nuova proposta di definizione del "cépage", che univa solide competenze ampelografiche ai primi risultati dell'analisi SSR. Tale proposta classificava le piante appartenenti alla *Vitis vinifera* in sette livelli: specie (*Vitis vinifera* L.), sottospecie (per es. *sativa*), proles (per es. *occidentalis*), famiglie (per es. noiriens), cépages (per es. Pinot), sous cépages (per es. Pinot nero) e cloni (per es. 115). Nei primi cinque livelli la differenziazione dei genotipi era basata sulla riproduzione gamica, mentre negli altri due le piante si distinguevano per mutazione somatica fissata attraverso la propagazione vegetativa. In altri termini, si consideravano appartenenti allo stesso "cépage" tutte le piante derivate per propagazione vegetativa dallo stesso semenzale originario, cioè il capostipite del vitigno. Se su queste piante si originavano delle mutazioni stabili ed ereditabili attraverso la propagazione vegetativa, tali varianti avrebbero dato origine a nuove varietà o cloni, in funzione dell'entità della mutazione. L'analisi del DNA con i nove SSR "internazionali" distinguerebbe dunque i "cépage", ma non le varianti somatiche né i cloni. Questa proposta ha trovato piena conferma nei numerosissimi studi successivi. Tuttavia, studi recenti condotti sui mutanti per il colore dell'uva hanno consentito di individuare le basi genetiche di molti di essi. Questi mutanti si dividono in due tipologie: a) varietà che perdono la capacità di sintetizzare antociani e passano dall'originale bacca nera a meno colorata o bianca (per es. Pinot nero, Pinot grigio e Pinot bianco, b) varietà che acquisiscono la capacità di sintetizzare antociani e passano dall'originale bacca bianca a colorata (in genere rosa o rossa, per es. Italia bianca e Italia rossa). Oggi disponiamo di un paio di marcatori SSR che, uniti ai 9 SSR "internazionali", consentono di identificare molti mutanti della prima tipologia analizzando il DNA delle foglie.

L'intensa attività di genotyping della vite ha rivelato che ci sono varietà e cloni costituiti da mosaici di cellule con genotipi diversi, che convivono nella stessa pianta, come nel caso emblematico del Pinot grigio. Questo fenomeno, chiamato chimerismo, è molto più diffuso nella vite di quanto non si fosse sospettato, è favorito dalla propagazione agamica, spesso plurisecolare, delle varietà e potrebbe essere una delle fonti della variabilità clonale.