

**Prolusione anno 2008
Vinitaly ,Verona**

La caratterizzazione del genoma della vite per la viticoltura del XXI secolo

M. Enrico Pé

Scuola Superiore Sant' Anna di Studi Universitari e Perfezionamento, Piazza Martiri della Libertà 33,56127 Pisa

Nel 2007 sulla prestigiosa rivista inglese Nature è stato pubblicato un articolo a nome del Consorzio italo-francese per la caratterizzazione del genoma della vite, che ha riportato la prima descrizione della sequenza nucleotidica dell'intero genoma della vite (*Vitis vinifera*), della sua organizzazione e, per la prima volta, del suo contenuto informativo.

Questo risultato rappresenta contemporaneamente un prestigioso traguardo, al raggiungimento del quale hanno contribuito numerosi ricercatori italiani che operano all'interno di varie istituzioni di ricerca pubbliche, e un punto di partenza formidabile per l'adozione di metodologie innovative di genomica applicata per lo sviluppo e il rafforzamento della viticoltura italiana del XXI secolo. Nei paragrafi seguenti saranno presentati gli attori, sarà riassunto come si è raggiunto l'obiettivo, quali sono i principali risultati finora raggiunti, quali si ritiene possano essere le ricadute nel medio e lungo periodo, e che tipo di azioni sarà necessario intraprendere per fare in modo che la ricerca italiana trasformi una indubbia posizione di forza raggiunta nel campo della genomica della vite in una leadership mondiale.

Breve cronistoria di un'idea progettuale vincente

II *French-Italian Consortium for the Characterization of the Grapevine Genome* si è costituito nell'estate del 2005 in seguito ad un accordo programmatico di collaborazione scientifica bilaterale Italia-Francia, siglato dall'allora Ministro delle Politiche Agricole e Forestali onorevole Gianni Alemanno, dal collega francese Dominique Bussereau e dal ministro francese della ricerca François D'Aubert. La gestione dell'iniziativa di ricerca è stata affidata al Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura (CRA) e all'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) e ciascun Paese ha finanziato i propri gruppi di ricerca con 6,5 milioni di euro. All'iniziativa si è aggiunto, come terzo partner, l'Istituto di Genomica Applicata (IGA) del parco tecnologico Luigi Danieli di Udine, con

a) un contributo finanziario di 2 milioni di euro. I ricercatori italiani che operano nell'ambito del Consorzio italo-francese (Tabella 1) appartengono a gruppi di ricerca di varie università, del CNR, dell'ENEA che sono organizzati nell'ambito del Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Biologia Molecolare delle Piante (CINBMP), del CRA e di IGA. Il programma di ricerca è partito nel mese di Gennaio del 2006.

Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Biologia Molecolare delle Piante

- **Ente per le Nuove tecnologie, l'Energia e l'Ambiente (ENEA), Dip. di Biotecnologia e Agricoltura,**
Centro Ricerche Casaccia, Roma (ENEA)
 - **Istituto di Tecnologie Biomediche - CNR**
Sezione di Bioinformatica e Genomica - Bari - Sabino Liuni e Graziano Pesole
 - **Laboratorio Nazionale Consorzio Interuniversitario Biotecnologia di Trieste**
Claudio Schneider (CIB Ts)
 - **Scuola Sant' Anna di Studi universitari e .Perfezionamento di Pisa** - M Enrico Pè
 - **Università degli Studi di Bari,** Dip. di Biochimica e di Biologia Molecolare -
Graziano Pesole
- **Università degli Studi di Milano,** Dip. di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie Molecolari - David Homer
- **Università degli Studi di Padova,** Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative (CRIBI), Gruppo di Ricerche Genomiche - Giorgio Valle (CRIBI PD)
 - **Università degli Studi di Siena,** Dip. di Scienze Ambientali "G. Sarfatti"- Mauro Cresti (Uni Si)
 - **Università degli Studi di Udine** Dip. di Scienze Agrarie ed Ambientali - Raffaele Testolin e Michele Morgante
 - **Università degli Studi di Verona**
 - a) Dip. Scientifico e Tecnologico - Massimo Delledonne
 - b) Dip. Scienze Tecnologie e Mercati della vite e del vino - Mario Pezzotti (Univ. VR2)
- **CRA Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura di Fiorenzuola d'Arda**
 - a) Gruppo di lavoro Interazione Pianta/Ambiente - Luigi Cattivelli (CRA 1)
 - b) Gruppo di lavoro Patologia molecolare - Giampiero Valè (CRA 2)
 - c) Gruppo di lavoro Bioinformatica - Primetta Faccioli (CRA 3)
- **CRA Istituto Sperimentale per la Viticoltura di Conegliano veneto** - Antonio Calò (CRA 4)
 - a) Gruppo di lavoro Caratterizzazione molecolare dei vitigni - Antonio Calò (CRA 4)
 - b) Gruppo di lavoro Analisi zuccheri - Angelo Costacurta (CRA5)
 - c) Gruppo di lavoro Basi genetiche apirenia - Manna Crespan (CRA 6)
- **Istituto di Genomica Applicata** - Parco Tecnologico Luigi Danieli di Udine - -
 - Gruppo di Genomica strutturale e funzionale - Michele Morgante
 - Gruppo di Bioinformatica - Alberto Policriti
- Gruppo di Genetica e Miglioramento genetico - Gabriele Di Gaspero

Tabella I. Elenco dei gruppi di lavoro italiani del Consorzio italo-francese per la caratterizzazione strutturale e funzionali e della vite

Il sequenziamento del genoma

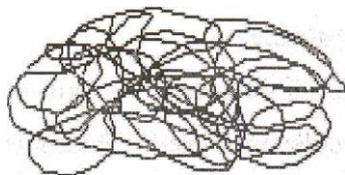
La genomica è senz'altro la disciplina più avanzata nel settore delle scienze della vita e di conseguenza anche delle scienze biologiche in senso ampio che si occupano degli esseri viventi del mondo vegetale, come la vite. La genomica è un lascito enorme di quella fantastica avventura scientifica che è stata il Progetto del Genoma Umano; che ha prodotto la tecnologia e i primi modelli concettuali per affrontare l'informazione genetica (genoma) di una cellula, di un individuo, di una specie, racchiusa nel DNA, nella sua interezza. Il primo passo per comprendere un genoma è quello di determinarne la sequenza lineare (sequenziamento) di nucleotidi, ovvero degli elementi molecolari unitari che costituiscono la molecola polimerica di DNA. Nelle molecole di DNA naturale ci sono quattro nucleotidi diversi, che si distinguono per la base azotata che portano, ovvero adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). Per questo motivo una sequenza di DNA può essere descritta in modo univoco come una sequenza ininterrotta di basi del tipo GA TT ACA. Per quanto riguarda la vite, il suo genoma è stato stimato essere tra 470 e 500 milioni di nucleotidi, organizzati in unità discrete di 19 cromosomi. In realtà, se si eccettuano i gameti, ovvero le cellule riproduttive, ogni cellula porta una coppia per ciascun tipo di cromosoma, uno di origine materna e una di origine paterna. Nella cellula di una foglia di vite quindi ci sono circa 1 miliardo di nucleotidi che compongono il genoma del nucleo. La prima bozza del genoma umano completo è stata pubblicata nel 2001, ma nel giro di pochi anni il numero di genomi di organismi superiori la cui sequenza nucleotidica completa è stata depositata nelle banche dati pubbliche è già rilevante ed è in continua crescita (visitare ad esempio il sito <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>). È importante ricordare che il genoma rappresenta il potenziale genetico di un individuo e le scoperte fatte studiando i genomi finora sequenziati hanno rivoluzionato la visione dei ricercatori sui meccanismi attraverso quali si esplica l'informazione genetica. La genomica si è affermata in seguito agli enormi progressi fatti nell'automazione e nella robotizzazione del sequenziamento del DNA e, al momento, la fase tecnica di produzione dei dati di sequenziamento non è il collo di bottiglia principale. I sequenziatori automatici più moderni che si basano sulla metodologia di sequenziamento dell'interruzione della sintesi dell'elica di DNA mediante nucleotidi modificati (*dideoxynucleotide chain termination method*) ideata da Frederick Sanger, premio Nobel per la chimica nel 1980, operando ininterrottamente 24 ore al giorno possono produrre decine di milioni di dati di

sequenze nucleotidiche alla settimana. Tuttavia, la tecnologia corrente:ha la grande limitazione di non essere in grado di partire da un'estremità di un cromosoma e progredire nel determinare la sequenza nucleotidica fino all'estremità opposta. Invece, essa è limitata a sequenze di dimensioni intorno agli 800 nucleotidi.

Ciò determina quindi che il DNA cellulare da sequenziare debba essere frammentato in pezzettini piuttosto corti, che sono successivamente clonati a formare collezioni molto ampie di cloni, che sono poi sottoposti al sequenziamento. Poiché il procedimento di clonazione è casuale, per avere una probabilità superiore al 90% di aver determinato almeno una volta la natura di ogni nucleotide che compone il DNA occorre produrre una quantità di dati molto superiore alla dimensione effettiva del genoma. Questo concetto si esprime in termini di genomi equivalenti. Per produrre dati di sequenza corrispondenti a 12 genomi equivalenti, che è la quantità che il Consorzio italo-francese ha stimato essere necessaria per ottenere una sequenza del genoma della vite completa e accurata, occorre sequenziare circa 7,5 milioni di frammenti casuali, corrispondenti a circa 6 miliardi di nucleotidi. Si può quindi immaginare la complessità organizzativa di un'operazione del genere, resa possibile soltanto dalla grande operatività dei sequenziatori automatici di ultima generazione e dalla robotizzazione. Da quanto descritto risulta evidente la necessità di risolvere un altro grosso problema: la ricostruzione della sequenza del DNA in una serie continua e univoca a partire da sequenze relativamente brevi. Questa fase del procedimento di determinazione della sequenza di un genoma complesso come quello della vite prende il nome di **assemblaggio** della sequenza. Ciò è reso possibile dal fatto che sequenziando un numero così elevato di frammenti casuali capita di sequenziare frammenti che contengano porzioni in comune e il riconoscimento di queste porzioni di sequenza comune, in termini tecnici sovrapposizioni, consente di ricostruire finalmente la sequenza completa, o una sua buona approssimazione. L'assemblaggio è reso possibile dall'applicazione di programmi bioinformatici sofisticati, in grado di gestire questa enorme quantità di dati. Una schematizzazione dell'intero processo è schematizzato nella Figura 1.

Whole Genome Shotgun Sequencing Method

d)



Genamir; DNA

Sequence Each Fragment with Shotgun Approach

Align Contiguous Sequences

GCATTTTCGAGTTTRCCTGGACRRCCRGTTGGTRCTGRGGACGCRRGAGGCTTGATTGGCCAATRRTRG

TRTRT

Generate Finished Sequence

Figura 1: Rappresentazione schematica del metodo di determinazione della sequenza nucleotidica del DNA genomico (*genomic DNA*) di un organismo definito *whole genome shotgun*, ovvero sequenziamento complessivo casuale. Il DNA è frammentato in piccoli frammenti che sono clonati. La clonazione produce una collezione causale di cloni che sono sottoposti a sequenziamento partendo dalle due estremità. Il sequenziamento di porzioni condivise tra cloni diversi (allineamento di sequenze contigue) consente di ricostruire la sequenza completa.

Una volta disponibile una sequenza assemblata di qualità, incomincia il lungo lavoro di interpretare i dati di sequenza in termini di geni, di sequenze spaziatrici, di elementi di regolazione, ovvero si procede alla cosiddetta **annotazione**.

Il primo obiettivo dell'iniziativa italo-francese, quindi, è la produzione di una sequenza del genoma della vite, la più accurata e completa possibile, che diventi la sequenza di riferimento per qualsiasi altro utilizzo applicativo successivo. Per questo si è deciso di produrre dati corrispondenti a 12 genomi equivalenti, suddivisi tra le tre unità di sequenziamento: 7 genomi equivalenti Génoscope, il centro nazionale di sequenziamento francese, 5 genomi equivalenti il Centro di Ricerca Intradipartimentale per le Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università di Padova, e IGA. Poiché la vite è una specie con elevata variabilità genetica all'interno dello stesso individuo (questa situazione prende il nome di eterozigotità e fa riferimento al fatto che in una cellula somatica ogni tipo di cromosoma è presente in copia: una di origine materna e una di origine paterna e la sequenza nucleotidica dei geni portati dai due cromosomi spesso è diversa), per semplificare la fase complessa di assemblaggio della sequenza, il Consorzio ha scelto come fonte del DNA da sequenziare il clone PN40024 sviluppato dai colleghi INRA di Colmar, ottenuto per cicli di autofecondazione e che ha un livello ridotto di eterozigotità. Questo clone non è coltivato: l'anormale livello di omozigosi rende questo clone molto debole e la sua propagazione necessita anche di approcci di coltura in vitro (Figura 2). Tuttavia la scelta di sequenziarlo si è dimostrata vincente.

Allorché, nel mese di marzo 2007, sono stati prodotti oltre i 2/3 (8.4 genomi equivalenti) dei dati di sequenziamento previsti, il Consorzio italo-francese ha ritenuto di avere informazioni sufficienti per produrre una prima versione di elevata qualità del genoma della vite, e la discussione di questi risultati è l'argomento della pubblicazione sulla rivista Nature citata in precedenza. Nel tempo intercorso dalla sottomissione dell'articolo ad oggi il Consorzio italo-francese non solo ha completato il sequenziamento del clone di riferimento PN40024, ma ha prodotto anche oltre 500

mila sequenze (poco meno di un genoma equivalente) del vitigno Tocai Friulano. La strategia infatti è stata quella di produrre da un lato una solida sequenza di riferimento, sulla quale raffrontare le sequenze di vitigni coltivati di interesse, al fine di raccogliere informazioni circa le differenze genetiche e produrre strumenti molecolari per cercare di dare un significato funzionale alla variabilità genetica osservabile.

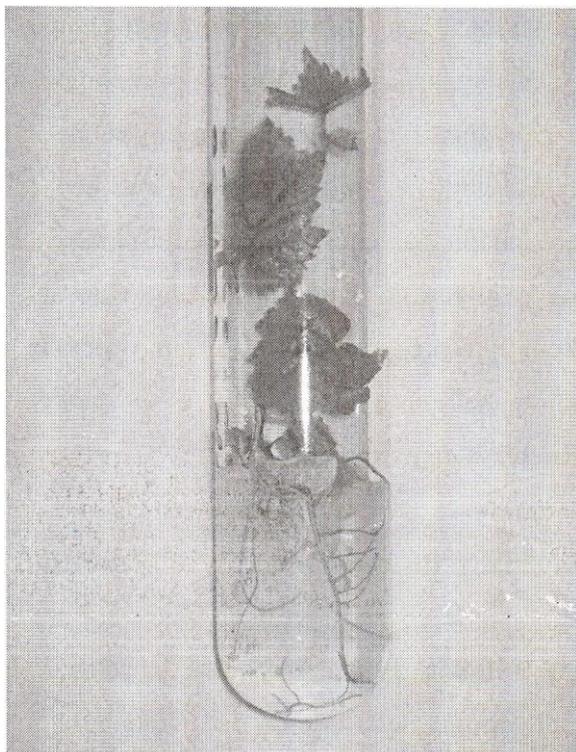


Figura 2: Propagazione mediante metodi di coltura *in vitro* del clone PN40024, che è stato la fonte di DNA genomico utilizzato per il programma di sequenziamento.

Risultati principali ottenuti

Riassumendo schematicamente le informazioni principali conseguite finora è emerso che:

- i) nel genoma sono stati riconosciuti circa 30 mila geni. Volendo fare un confronto, le stime più recenti danno per circa 23 mila il numero complessivo di geni umani, mentre il numero stimato per il riso è di oltre 37 mila. Questo indica chiaramente, per esempio, che la complessità di un organismo vivente non è tanto legata al numero di geni quanto al loro sistema di regolazione;
- ii) il genoma di vite non ha subito modificazioni drastiche nel suo ultimo periodo evolutivo, rendendo la sua struttura genomica più vicina a quella dei progenitori ancestrali. Ciò ha consentito di evidenziare che il genoma odierno contiene al suo interno ben 3 genomi ancestrali, e che questa struttura originaria 3 tre genomi è molto antica e probabilmente un evento importante nell'evoluzione delle dicotiledoni, uno

dei due grandi gruppi delle piante superiori;

iii) nella vite ci sono due famiglie geniche particolarmente numerose rispetto alle altre piante sequenziate finora: la prima famiglia è quella che sintetizza gli stilbeni, una classe di composti dedicati prevalentemente alla difesa da patogeni, alla quale appartiene il resveratrolo, il composto considerato benefico per la salute umana e che giustifica la raccomandazione di una assunzione, benché moderata, di vino. Di questi geni ne sono stati identificati ben 43. La seconda famiglia eccezionalmente ampia è quella dei geni deputati alla sintesi dei terpeni, i metaboliti secondari maggiormente responsabili degli aromi del vino. Di questi ne sono stati riconosciuti ben 116, di cui 89 funzionanti e 27 che hanno perso la loro funzione. Sarebbe molto interessante studiare se questa espansione è in qualche modo associata alla domesticazione della vite stessa da parte dell'uomo.

Filosofia e peculiarità del progetto italiano

Indubbiamente la collaborazione con i ricercatori francesi è stata ed è eccellente e ha portato a mutui benefici. Tuttavia, per comprendere la valenza del progetto di ricerca sulla caratterizzazione del genoma della vite da parte italiana, è importante sottolinearne alcune peculiarità, che la differenziano dal progetto francese. Quest'ultimo infatti è, almeno finora, un progetto molto focalizzato, volto essenzialmente all'ottenimento della sequenza genomica della vite, realizzato attraverso l'attività di Génoscope, il centro nazionale francese per il sequenziamento, un'istituzione di eccellenza sul panorama internazionale, estremamente qualificata ed esperta, che ha partecipato fattivamente a tutti i principali programmi di sequenziamento internazionali, uomo incluso. L'Italia, invece, non ha un centro di sequenziamento comparabile e, fino al sequenziamento della vite, non aveva mai partecipato, da protagonista, a nessuna delle importanti iniziative di sequenziamento. Di conseguenza l'idea progettuale volta alla caratterizzazione strutturale e funzionale della vite, fin dalla sua genesi, ha compreso due filosofie di impostazione strettamente interdipendenti. La prima ha preso l'avvio dalla consapevolezza che la ricerca italiana, nel caso specifico quella che si occupa di organismi vegetali e di specie coltivate, necessitava di riorganizzare e rafforzare le competenze nel settore avanzato della ricerca genomica, attraverso un adeguamento tecnologico, attraverso l'implementazione di nuove piattaforme genomiche e attraverso la formazione di una nuova generazione di ricercatori e tecnici con forti competenze nelle diverse aree della genomica moderna. Ciò non avrebbe potuto realizzarsi se non con un ambizioso progetto genomico che vedesse i ricercatori italiani come protagonisti e non come comparse.

D'altra parte un progetto di questo tipo, che richiedeva investimenti per la ricerca consistenti, avrebbe potuto prendere l'avvio soltanto avendo come oggetto una specie il cui genoma fosse abbordabile, e che soprattutto riunisse aspetti di importanza economica-strategica per l'Italia e una forte valenza culturale. La scelta non avrebbe potuto che essere la vite. È nata quindi l'idea progettuale denominata VIGNA (Vitis GeNome Analysis) che ha scelto di contribuire alle conoscenze non solo nel campo della genomica strutturale, ma anche in quella funzionale, volta ad attribuire una funzione ai geni e alle sequenze di regolazione identificate nel genoma. Contestualmente sono stati avviati progetti applicativi pilota per verificare come e quanto le informazioni e gli strumenti molecolari potessero essere utilizzati per affrontare alcuni problemi applicativi importanti per il comparto viti-vinicolo. Lo schema del progetto è illustrato nella Figura 3.

Piattaforme Tecnologiche Disponibili

Il progetto VIGNA ha contribuito a rafforzare piattaforme tecnologiche di analisi genomica già esistenti, come quella multifunzionale del CRIBI, quella per le analisi delle proteine dell'ENEA e quelle bioinformatiche del CNR di Bari e delle Università di Bari, Milano e Padova. Ha contribuito anche alla creazione di 3 nuove piattaforme tecnologiche, che rimangono come patrimonio della comunità scientifica italiana, da utilizzare ampiamente nei prossimi mesi per studi approfonditi sulla vite e su altre specie:"

- una piattaforma di sequenziamento e risequenziamento (IGA, Udine)
- una piattaforma per l'analisi dell'espressione genica (Università di Verona)
- un centro per l'analisi dei trascritti di singole cellule isolate da tessuti mediante dissezione laser (Università di Milano).

è)

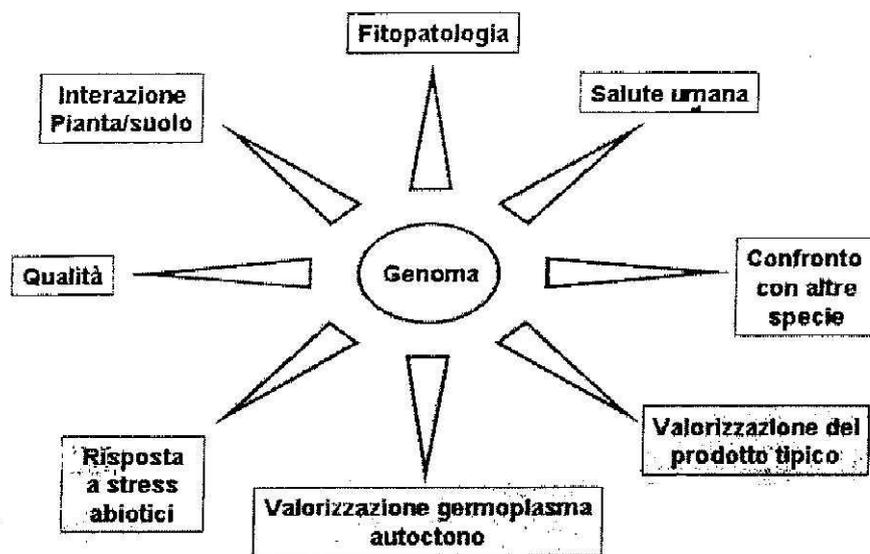


Figura 3. Schema del progetto genomico per la caratterizzazione strutturale e funzionale della vite. Le informazioni genomiche costituiscono il nucleo centrale del progetto che si apre fornendo conoscenze e strumenti per affrontare diverse problematiche applicative di interesse per il comparto viti-vinicolo.

Dopo la Sequenza

Il grande storico greco Tucidide scrisse che i popoli del mediterraneo uscirono dalla barbarie quando impararono a coltivare la vite e l'olivo. Ci piace pensare che la conoscenza del genoma della vite svolga un ruolo importante per ridurre la nostra ignoranza in molti settori di ricerca e di applicazione, come l'evoluzione dei genomi, la comprensione della variabilità genetica e dei suoi effetti sulle caratteristiche della pianta e della sua risposta a stimoli esterni. Quindi il sequenziamento è solo il punto di avvio per affrontare, con nuove conoscenze e nuovi strumenti, sia aspetti di ricerca di base, sia molte applicazioni di rilevante interesse per il mondo vitivinicolo. Onestamente è difficile prevedere con precisione l'impatto che la realizzazione di questi progetti genomici avrà sulla viticoltura, ma non c'è nessun dubbio che l'impatto ci sarà e sarà molto significativo. Alcuni esempi si riferiscono al fatto che:

- la vite è una delle specie in cui gli individui sopravvivono da un anno all'altro nei climi temperati entrando in quiescenza, con un meccanismo spettacolare: perdono le foglie e accumulano riserve per germogliare di nuovo, una volta superato l'inverno. Questo è un meccanismo che non hanno le piante annuali e quelle tropicali perenni e che è in gran parte poco conosciuto;

- la vite era originariamente una pianta a sessi separati, cioè piante femminili, in grado di produrre frutto se impollinate e piante maschili, in grado di produrre solamente polline. Durante la domesticazione l'uomo ha selezionato piante che a seguito di modificazioni spontanee erano diventate ermafrodite. Questo passaggio è un tema biologico ed evolutivo importante e controverso, con riflessi rilevanti anche per le produzioni agricole;
- la vite ha molti geni che possono proteggerla dai patogeni e quindi dalle malattie. Tuttavia, non è in grado di difendersi da alcuni patogeni e parassiti introdotti dalle Americhe a metà dell' '800, mentre molte specie e varietà di viti americane dell'estremo oriente e caucasiche sono in grado di difendersi. Esempi riguardano malattie come la peronospora, l'oidio, il mal dell'esca, la flavescenza dorata. Attualmente in Europa il controllo delle colture dai patogeni è condotto essenzialmente attraverso l'impiego di anticrittogamici. L'agricoltura europea impiega ogni anno oltre 532 mila tonnellate di anticrittogamici (<http://dataservice.eea.europa.eu>), il 46 % dei quali è impiegato in viticoltura. Per ridurre questo impiego e ridurre gli aspetti negativi sull'ambiente e sull'uomo è necessario approfondire la conoscenza dei meccanismi molecolari che controllano l'interazione tra cellula vegetale e patogeno. Ciò potrà consentire da un lato di sviluppare disegni di incrocio appropriati e di adottare metodi di selezione efficaci per ottenere varietà di vite che permettano di ridurre la quantità di anticrittogamici impiegati in viticoltura, dall' altro di ideare nuovi sistemi di difesa più rispettosi dell'ambiente.
- la vite produce migliaia di metaboliti secondari responsabili della qualità dei vini e il conoscere i geni che li determinano può guidare i genetisti nella selezione di nuove varietà;
- il ricco germoplasma che comprende sia le viti coltivate sia quelle selvatiche, potenziale riserva importante di geni utili, è ancora poco caratterizzato, e di conseguenza poco valorizzato. Le piattaforme implementate, ad esempio, stanno già producendo strumenti di analisi molto potenti. Entro la fine dell'anno saranno tipizzati, con una nuova generazione di marcatori molecolari, derivata dalle conoscenze della sequenza genomica, 1200 accessioni di vite della collezione del CRA di Conegliano veneto, incluse tutte le varietà iscritte al Registro Nazionale. Ciò potrà contribuire a chiarire alcuni problemi di omonimie e di parentela tra accessioni.
- In aggiunta, l'affermarsi di nuove tecnologie di sequenziamento (vedi più oltre) apre la prospettiva concreta non solo di identificare le varianti geniche presenti nel germoplasma, ma anche di legarle a caratteristiche fenotipiche importanti, come la resistenza a stress

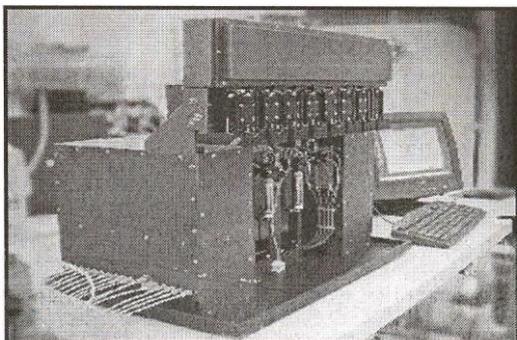
biotici e biotici.

Un génoma tanti génomi

Nello scorso triennio sono state sviluppate e consolidate nuove tecnologie di sequenziamento, che non utilizzano il metodo di ranger precedentemente citato, che consentono di sequenziare un genoma in tempi molto brevi e a costi molto contenuti. Tuttavia, al momento, per le peculiarità tecniche, questi nuovi sequenziatori di ultima generazione producono miliardi di dati nucleotidici per esperimento, organizzati in brevi frammenti di qualche decina di nucleotidi (si parla di etichette di sequenza, ovvero tag) che per la loro brevità, da soli non possono essere assemblati in pezzi contigui di sequenza. Tali etichette però acquistano significato se rapportati ad una sequenza di riferimento, come quella fornita dal Consorzio italo-francese. L'adozione di queste nuove tecnologie consente così di ri-sequenziare individui diversi della stessa specie e identificare le varianti genetiche e avere così un panorama della diversità genetica o biodiversità di quella specie. La potenza di tali strumenti, disponibili nelle piattaforme di sequenziamento implementate nell'ambito del progetto VIGNA, fa sì che l'identificazione delle basi molecolari che differenziano cloni di uno stesso vitigno possa diventare molto presto una realtà.

Piattaforme di analisi funzionale

Un altro aspetto con implicazioni applicative potenziali di grande interesse è l'uso dell'analisi del funzionamento dei geni (espressione genica) (Figura 4) per studiare processi fondamentali, quali la maturazione e l'appassimento della bacca, la risposta della pianta a condizioni di crescita diverse, l'interazione tra porta-innesto e innesto. Ciò contribuirà a fornire dei parametri funzionali per la caratterizzazione del binomio «vitigno-terroir». Dell'applicazione in campo fitopatologico abbiamo già accennato.



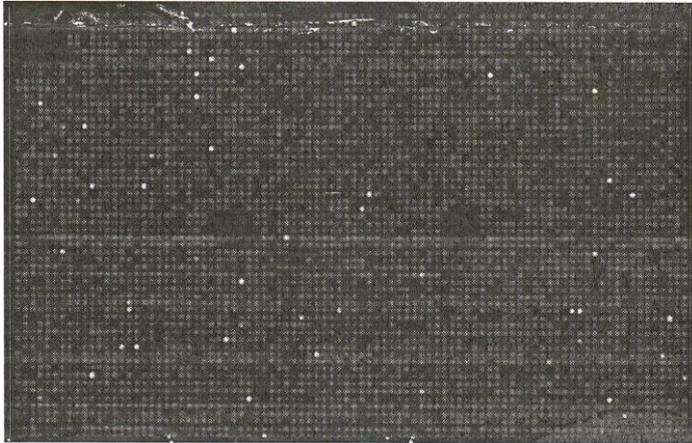


Figura 4. Piattaforma Combimatrix di analisi dell'espressione genica presso l'Università di Verona. Pannello in alto: strumento per la produzione miniaturizzata di vetrini sui quali sono state sintetizzate sequenze geniche specifiche. Pannello in basso: esempio di analisi di espressione di geni di vite. Su un vetrino del tipo da microscopio sono state sintetizzate in modo ordinato brevi sequenze specifiche per tutti i circa 30 mila geni di vite. Ogni punto colorato rappresenta il risultato di un esperimento per valutare il livello di espressione di un gene in uno specifico tipo cellulare/tessuto/organo analizzato, in questo caso la bacca durante la maturazione. Dall' intensità si può dedurre il livello di espressione dei vari geni e ricavare indicazioni circa la funzione dei geni stessi. Analisi informatiche consentono di individuare gruppi di geni attivi, indotti e/o repressi in modo coordinato.

In questo campo ci si aspettano grandi risultati dall'integrazione di competenze di bioinformatica, di analisi dell'espressione genica e di tecnologie per l'analisi di singole cellule (Figura 5).

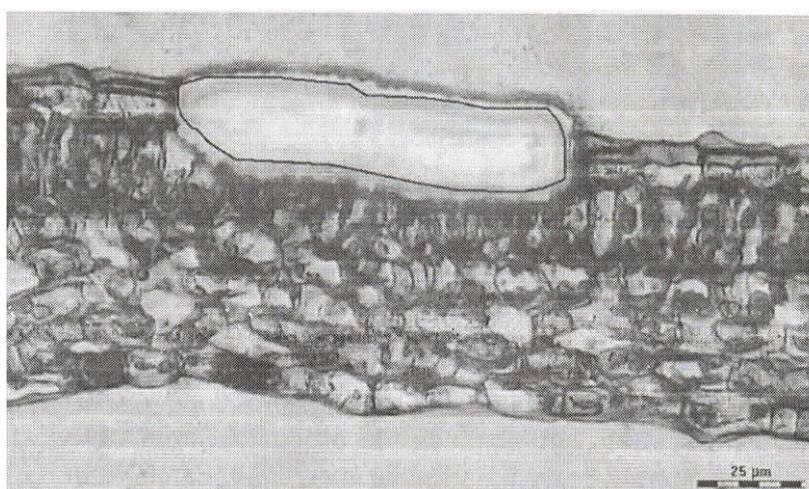
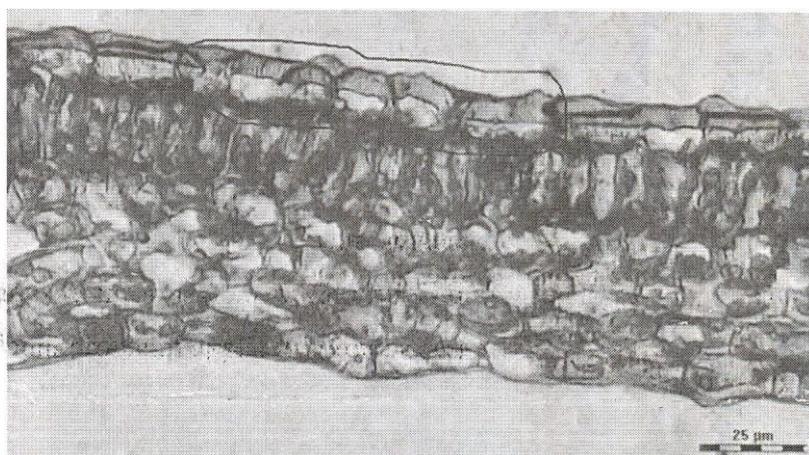


Figura 5: Esempio di raccolta di cellule mediante *laser microdissection* con strumento Leica 6000, Università di Milano. Pannello superiore: fotografia di una sezione trasversale (10 *f.lm*) dell'epidermide superiore di foglia di vite, con il gruppo di cellule selezionate per il taglio con laser evidenziate con la linea rossa; pannello inferiore: fotografia della stessa sezione dopo taglio con laser. Dalle cellule raccolte è possibile estrarre ed analizzare acidi nucleici e proteine

Conquista e mantenimento di una leadership nel settore

Il lancio e la realizzazione di questa grande iniziativa di ricerca genomica sulla vite non avrebbero potuto realizzarsi senza un forte sostegno economico e politico dai vari soggetti interessati: la comunità scientifica nazionale, le istituzioni nazionali, gli enti locali e il settore industriale viti-vinicolo. Nel caso specifico, il Ministero delle Politiche Agricole ha svolto un ruolo fondamentale di promotore, inserendo l'iniziativa in un contesto internazionale e fornendo sia il sostegno finanziario necessario per avviare il progetto, sia di coordinamento nazionale. A questa iniziativa hanno aderito enti locali come la Regione Friuli Venezia Giulia e la Regione Veneto, contribuendo supporto politico e finanziamenti, e soggetti privati sia industriali sia bancari.

Spero di aver suscitato nei lettori almeno una parte dell' eccitazione e delle aspettative che si sono impadronite di tutti noi coinvolti in questa avventura impegnativa ma affascinante di scoprire le caratteristiche geniche di una specie così fortemente legata alla nostra tradizione e così importante per il Comparto agro-alimentare nazionale. È' ambizione dell'idea progettuale VIGNA contribuire alla realizzazione della viticoltura italiana del XXI secolo, in sintonia con il principio di una società moderna fondata sulla conoscenza scientifica consapevole, capace di abbinare tradizione e innovazione tecnologica. Mi auguro che ci si renda conto che il cammino è ancora lungo, che la comunità scientifica italiana è ben attrezzata e combattiva, ma che necessità di un grande sostegno fattivo affinché queste ottime premesse portino alla giusta vendemmia. È una responsabilità che deve essere condivisa anche dal settore industriale e dalla classe politica nazionale e locale per far sì che questa grande occasione non vada persa.

g)

h)