

## I.A.M.C.-C.N.R. di Capo Granitola



### ***Attività scientifiche del progetto “Développement des Interventions innovantes sur les cépages de Vignes autochtones pour l’INtégration italo-tunisienne – DIVIN (PS1.1.002)”***

*F. Vaccaro<sup>b</sup>, M.L. Carelli<sup>b</sup>, R. Graci<sup>b</sup>, F. Bulfamante<sup>b</sup>, M. Musco<sup>b</sup>, G.A. Armeri<sup>b</sup>, C. Bennici<sup>b</sup>, C. Patti<sup>b</sup>, B. De Luca<sup>c</sup>, M. Tagliavia<sup>a</sup>, G. Biondo<sup>a</sup>, A. Nicosia<sup>a</sup>, T.Masullo<sup>a</sup>, G. Titone<sup>b</sup>, S. Mazzola<sup>c</sup>, A. Cuttitta<sup>a</sup>.*

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l’Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia;

b – Laboratorio Creativo di Divulgazione Scientifica – EDU Lab - Istituto per l’Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia;

c - Istituto per l’Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

## **Premessa e contesto generale**

Il progetto DIVIN, finanziato dal Programma di Cooperazione Transfrontaliera Italia Tunisia, è coordinato dall'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche - IAMC-CNR (Bénéficiaire) UOS di Capo Granitola e coinvolge l' Istituto di Bioscienze e Biorisorse – IBBR (P1) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), il Centro di Biotecnologie di Borj - Cedria - CBBC (P2) L'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie – INRAT (P3), La Direction Générale de la Production Agricole – DGPA (P4) e L'Associazione “Strada del vino Alcamo Doc” (P5). Il finanziamento complessivo è stato pari a € 674.107,06 e le attività si sono svolte a partire da novembre 2013 per concludersi a luglio 2016.

Si è trattato di una prodigiosa opportunità per potenziare e valorizzare le eccellenze scientifiche in campo vitivinicolo e per consolidare la collaborazione tra Italia e Tunisia sulla produzione di vini di qualità e sul lancio di itinerari enoturistici che mettano in dialogo permanente le due sponde del mediterraneo.

Il progetto, ha avuto la durata di 31 mesi e ha investito sullo sviluppo di ricerche e soluzioni tecnologiche per prevenire e curare le patologie della vite e per certificare e tracciare la qualità del vino prodotto in Italia e in Tunisia.

I benefici del progetto hanno avuto ricadute anche su tutti i territori dell'area di cooperazione in quanto, nella parte finale del progetto, si sono sviluppate azioni di marketing congiunte per la creazione di un marchio d'area e l'ampliamento delle esperienze delle "strade del vino" per creare itinerari turistici tematici che colleghino le zone di produzione siciliane e quelle tunisine.

## **Struttura del progetto**

DIVIN si articola in 5 macro-attività (Composantes), due delle quali hanno carattere trasversale e coincidenza di tempo con l'intera durata del progetto (C1-Gestione del progetto e C2-Comunicazione) e 3 tematiche finalizzate alla realizzazione di interventi specifici. Tutti i partner, rispettando le rispettive competenze, hanno cooperato nell'attuazione delle attività e per il conseguimento dei risultati del progetto.

### **C1 – GESTIONE E COORDINAMENTO**

- 1.1 Riunione di lancio;
- 1.2 Sistema di controllo interno e per il coordinamento del progetto;
- 1.3 Rapporti di monitoraggio e di valutazione amministrativa e finanziaria interna ed esterna;
- 1.4 Sistema di Gestione delle Conoscenze (SGC);
- 1.5 Comitato di Pilotaggio (Comité de Pilotage).

La C1 si basa su una struttura organizzativa che rappresenta l'intero partenariato, il Comitato di Pilotage (CdP), responsabile del coordinamento, della corretta ed efficiente gestione del progetto e del raggiungimento dei risultati attesi. La definizione del progetto, delle sue regole interne e delle linee guida per coordinare adeguatamente le azioni sono state condivise durante le riunioni preparatorie svoltesi tra la Tunisia e la Sicilia. Il CdP è composto da rappresentanti di tutti i partner, con un responsabile – scientifico e/o tecnico – per le attività assegnate a ciascun partner, mentre il capofila ha designato un coordinatore per la gestione di tutti gli aspetti del progetto: il buon funzionamento del Comitato è garantito attraverso

riunioni fisiche e "riunioni virtuali", in totale 7 (4 fisiche, presso il capofila e a Tunisi; 3 attraverso delle videoconferenze via Skype). Il capofila ha organizzato la riunione di lancio del progetto. Uno strumento per la comunicazione interna è stato messo a punto per creare un sistema di gestione della conoscenza (SGC) tra tutti i partner. E' stato elaborato un cruscotto interattivo, una DIVIN Intelligente Charte(DIC), per misurare l'impatto economico e competitivo delle attività progettuale, a livello locale e transnazionale, grazie alla fattiva collaborazione di tutto il partenariato. Inoltre il capofila ha elaborato e condiviso un mini «Manuale tecnico di qualità», con le indicazioni di riferimento per coordinare le azioni tecniche previste, verificare l'avanzamento del progetto, pianificare e garantire soluzioni per eventuali momenti di impasse e necessità di micro-riprogrammazione. Ogni partner ha contribuito al monitoraggio del progetto secondo le proprie capacità ed esperienze, oltre che alla gestione amministrativa e finanziaria ai fini della tenuta dei conti e revisione, compilando regolarmente su base mensile un "diario di bordo" («journal de bord») per aggiornare il capofila sui risultati delle azioni e l'utilizzo delle risorse allocate.

Le attività della C1 sono state coordinate dal Capofila, col supporto di tutti i partners.

Outputs: 10 mini-rapporti delle riunioni di progetto; 6 «diari di bordo» corrispondenti ad ogni partner; 1 DIC; 1 SGC; 1 Manuale tecnico; un'Analisi dei Rischi, 1 Piano delle Attività, 3 Rapporti sulle attività (iniziale, intermedio e finale); 3 Rapporti di monitoraggio.

## C2 – COMUNICAZIONE E DISSEMINAZIONE

2.1 Creazione di un'immagine coordinata di progetto;

2.2 Workshop tematici e seminari di diffusione;

2.3 Creazione di un sito Internet e strategia di comunicazione 2.0;

2.4 Pubblicazioni e materiale promozionale;

2.5 Valutazione semestrale dell'efficacia delle attività di comunicazione e diffusione del progetto.

Inaugurata dalla Conferenza di lancio, la C2 si compone di quattro azioni principali: a) sviluppo di un piano di comunicazione, b) creazione di un sito web e strategia 2.0, c) 2 seminari di divulgazione, 1 Conferenza Internazionale (alla fine del primo anno di attività) e 2 workshops tematici mirati a specifici gruppi target, d) valutazione semestrale dell'efficacia della comunicazione. Il piano di comunicazione prevede la creazione di una immagine coordinata del progetto, costituita da un logo e da un sito web dedicato per informare un gran numero di stakeholders sulle attività e gli obiettivi del progetto. Inoltre il sito permetterà di scaricare tutti i documenti prodotti durante il corso del progetto, in una sezione apposita per i partner. Ogni partner ha contribuito al contenuto del sito web (anche nella propria lingua) ed il Capofila ne ha curato il continuo aggiornamento. La strategia di diffusione prevede naturalmente la preparazione e la distribuzione di materiali promozionali (shopper, penne, etc., con il logo del progetto). Alla fine del progetto i rappresentanti dei partners prenderanno parte ad un evento pubblico finale di diffusione.

Le attività della C2 sono state coordinate dal Capofila, col contributo di tutti i partners.

Outputs: 1 immagine del progetto; 1 sito Internet con un «Digital Business Ecosystème» e uno spazio dedicato alle buone pratiche integrato sulla piattaforma; 3 Conferenze: 1 di apertura e una di chiusura, 1 Conferenza internazionale (alla fine del primo anno del progetto); 2 Seminari per la diffusione e 2 workshops tematici; 1 Piano di comunicazione e una strategia e.0; 1000 brochures; 300 mini-posters; 200 borse, 100 T-shirt, 1000 penne con il logo del progetto; 3 Rapporti di monitoraggio e valutazione sulle attività di disseminazione del progetto.

### C3. ANALISI COMPARATIVA SULLE CARATTERISTICHE GENETICHE E LA DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA DELLE VARIETÀ DI VITI PRESENTI NELLA ZONA DI COOPERAZIONE TRANSFRONTALIERA

- 3.1. Analisi genetica dei popolamenti di vite sul territorio tunisino e siciliano e loro comparazioni genetiche;
- 3.2. Analisi dei territori sulla distribuzione delle varietà di vite e sulla produzione enologica;
- 3.3. Analisi dei territori per identificare le condizioni ambientali appropriate per l'attivazione di impianti produttivi in Tunisia;
- 3.4. Analisi comparativa dei principali vitigni monospecifici tra prodotti siciliani e tunisini.

Ai fini di una corretta conservazione, oltre agli aspetti strettamente tecnici vanno considerati anche quelli che riguardano la valutazione della diversità delle entità tassonomiche da conservare. A questo scopo, la caratterizzazione molecolare offre un valido strumento per determinare il valore della variabilità genetica delle popolazioni di origine e quindi il livello di stabilità di una specie dal punto di vista demografico. Offre inoltre un insostituibile supporto per stimare la diversità genetica delle collezioni e per classificare il germoplasma in funzione di pool genetici.

L'analisi genetica è stata fatta utilizzando un minimo di 6 microsatelliti (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 and VrZAG79) e sono stati analizzati popolamenti di vite presenti anche nelle Isole minori con particolare attenzione a Linosa e Lampedusa dove, in passato, sono stati registrati intensi scambi di materiale vegetale con la Tunisia (La Mantia et al., 2011). Al fine di condurre un'analisi quanto più capillare possibile, le indagini genetiche sono state effettuate presso i laboratori dell'IBBR-CNR e presso i laboratori dell'IAMC-CNR, ognuno per la propria area di competenza (Sicilia orientale e Sicilia occidentale). Lo stesso protocollo di analisi verrà applicato al materiale individuato e raccolto dai partner tunisini.

La Sicilia si conferma tra le prime regioni italiane per produzione di vino e la situazione odierna della viticoltura siciliana è il risultato di profonde trasformazioni, tuttora in atto. I fattori che influenzano la coltivazione di un vigneto sono legati al territorio, al suo clima e alle pratiche attuate dall'uomo ma di primaria importanza per ottenere vino di elevata qualità è soprattutto il vitigno. È infatti il genotipo del vitigno che si deve integrare perfettamente nell'ambiente per poter esprimere al meglio tutte le sue peculiarità e per poter dare, alla fine, un ottimo prodotto. La Sicilia presenta una piattaforma varietale in parte composta da vitigni di interesse nazionale, in parte da varietà diffuse esclusivamente o quasi a livello locale ed infine da un patrimonio ampelografico autoctono negletto o in via di estinzione da recuperare e valorizzare.

Sono state condotte indagini finalizzate all'analisi e catalogazione dei territori dedicati alla coltivazione della vite. I dati raccolti sono stati affiancati a quelli relativi alla produzione enologica del territorio in esame in modo da correlare i risultati.

Le caratteristiche del suolo interagiscono tra loro e con il clima nel determinare le variabili del funzionamento della vite, influenzando il comportamento fisiologico della vite, all'origine di differenze in termini di qualità e tipicità delle uve e dei vini prodotti. Uno studio è stato condotto sulle caratteristiche del suolo e del clima dei territori precedentemente identificati. Le migliori varietà dal punto di vista dell'adattabilità alle condizioni ambientali sono state oggetto di studio degli effetti di queste condizioni sulla resa e sulla qualità delle uve e del vino, per identificare delle varietà con caratteristiche tipiche e in grado di competere con le varietà di vitigni introdotte.

Al fine di comparare le produzioni vitivinicole di Sicilia e Tunisia, sono stati individuati due vitigni per regione transfrontaliera da mettere a confronto. Per l'importanza che rivestono nell'economia siciliana, i vitigni su



cui è stata principalmente rivolta l’attenzione sono il Catarratto e il Nero d’Avola. Per la parte tunisina, oggetto di analisi sono stati il Beldi e il Khamri.

In questa fase i vitigni sono stati comparati per determinati caratteri scelti; infatti, in parallelo alle analisi genetiche sono state effettuate le analisi chimiche, determinando la percentuale di zuccheri, l’acidità totale, la concentrazione di acido malico e di acido tartarico. Lo stesso protocollo e le stesse analisi sono state fatte sui prodotti tunisini.

Le attività della C3 sono state guidate dal Partner2, insieme con il capofila, P1 e P3.

Outputs: 1 Analisi genetica dei popolamenti di vite; 1 Analisi dei territori sulla distribuzione delle varietà di vite; 1 Analisi dei territori per identificare le condizioni ambientali appropriate per l’attivazione di impianti produttivi; 1 Analisi comparativa dei principali vitigni monospecifici.

#### C4. AZIONI PILOTA DIVIN PER LA DEFINIZIONE DI UNA CARTA GENETICA DELLE COLTIVAZIONI

4.1. Creazione di un laboratorio per la campionatura, il confezionamento e la spedizione dei materiali genetici ai laboratori specializzati;

4.2. Azioni di trasferimento delle competenze per il risanamento delle viti affette da virosi;

4.3. Creazione di una Carta Genetica delle colture.

Fondamentale per il successo del risanamento risulta la fase di gestione delle giovani piantine ottenute dal risanamento, sia per evitare l’eventuale reinfezione da parte di vettori, sia per garantirne la crescita adeguata in una fase delicata del loro sviluppo. Una volta ottenuti gli ecotipi di vitigni autoctoni sani (dalla selezione o da risanamento), questi sono stati conservati in strutture idonee (serre a rete a prova d’insetto) ed allevate con procedure atte ad evitare la reinfezione del materiale (sterilità dei substrati, difesa dalle malattie e da eventuali vettori, controllo periodico dello stato sanitario del materiale, verifica della corrispondenza varietale, ecc).

Un laboratorio idoneo alla gestione del materiale risanato prevede la presenza di diverse aree (area nera, area grigia e area bianca) ognuna destinata ad una specifica attività. L’area nera è destinata all’imballaggio e spedizione dei campioni. L’area grigia è destinata alla preparazione dei campioni (etichettatura, confezionamento ed eventuale conservazione a 4°C in attesa della spedizione). L’area bianca è infine destinata alla manipolazione del materiale risanato e alla sua moltiplicazione e gestione in vitro.

Indagini condotte nel recente passato nei vigneti tunisini hanno rivelato uno stato sanitario della coltura fortemente compromesso da malattie di natura virale. Molto diffuse sono risultate le malattie dell’accartocciamento fogliare (enroulement foliaire), della degenerazione infettiva (court noué) e del legno riccio (bois strié) i cui effetti sulle produzioni, sia in termini quantitativi che qualitativi, risultano particolarmente deleteri.

Lo stato sanitario degli ecotipi selezionati è stato pertanto verificato attraverso l’applicazione congiunta di tecniche di diagnosi biologica (indexing su idonei indicatori legnosi), sierologica (ELISA), e molecolare (real time-PCR), allo scopo di evidenziare la presenza/assenza delle principali malattie virali e virus-simili, in particolare di: enroulement foliaire (Grapevine leafroll associated viruses = GLRaVs), court noué (principalmente Grapevine fan leaf virus – GFLV, Arabis mosaic virus – ArMV e altri nepovirus della vite), bois strié (GVA, GVB, GVD vitiviruses e Grapevine rupestris stem pitting associated virus –GRSPaV), marbrure (Grapevine fleck virus – GFkV), incompatibilité au greffage (Grapevine leafroll associated virus 2 – GLRaV-2), nécrose des nervures, mosaïque des nervures, bois noir, Flavescence dorée et autre jaunissements.

Considerato l'elevato livello di infezione esistente su vite in Tunisia, come era prevedibile per un alto numero di varietà autoctone, è risultato estremamente difficile reperire "individui sani" dopo la semplice selezione nei vigneti commerciali o nei campi collezione; è stato opportuno, pertanto, ricorrere obbligatoriamente al risanamento dei vitigni attraverso l'impiego di tecniche diverse, idonee al tipo di virus coinvolto nell'infezione. In particolare, sono state applicate le tecniche di risanamento con termoterapia in aria calda, coltura di apici meristemati, o con combinazioni di entrambe le tecniche.

Al fine di trasferire le conoscenze e per una buona disseminazione dei risultati e delle competenze, sono stati organizzati dei brevi periodi di stage (dalla Tunisia in Italia e vice versa) per il trasferimento di tecniche di diagnosi virologica, di risanamento, di gestione del materiale risanato. Sono stati inoltre potenziati due laboratori in modo da implementare le facilities per la diagnosi molecolare, per la coltura in vitro e per la realizzazione di una piccola screen house.

Per una completa valorizzazione sul piano enologico e commerciale dei vitigni ritenuti strategici, è opportuno approfondire anche aspetti legati alle caratteristiche genetiche delle cultivar, come la loro precisa identità e denominazione, la presenza e l'ampiezza della variabilità genetica all'interno di esse, su cui si fonda la possibilità di selezionare cloni, la loro origine genetica e geografica e le relazioni con gli altri vitigni del territorio.

La caratterizzazione molecolare, oltre ad essere un valido mezzo per determinare il valore della variabilità genetica delle popolazioni, offre anche un insostituibile supporto per stimare la diversità genetica delle collezioni e per classificare il germoplasma in funzione di pool genetici presenti. L'analisi genetica condotta secondo quanto descritto nell'attività 3.1 fornirà i dati utili alla creazione di una carta genetica dei popolamenti censiti.

Le attività della C4 sono state coordinate dal P1, con P3 e P4.

Outputs: 1 un laboratorio per la campionatura, il confezionamento e la spedizione dei materiali genetici; 2 due protocolli di risanamento basati sulla coltura di apici meristemati e sull'embriogenesi somatica; 1 Convenzione per brevi periodi di stage per il trasferimento di conoscenze ed expertise tra il personale interno dei centri di ricerca partner; 1 Carta Genetica delle colture.

Durata della C4: 12 mesi.

## C5. STRATEGIA GLOBALE DIVIN DI INCORAGGIAMENTO AGLI INVESTIMENTI TRA LE DUE RIVE

5.1. Sviluppo di una campagna di sensibilizzazione che diffonda ed incoraggi le nuove tecniche tra i produttori dei territori dei due Paesi per il risanamento dopo l'intervento;

5.2. Laboratori italo-tunisini rivolti a valorizzare le particolarità dei vini tunisini in relazione alle caratteristiche peculiari di quelli siciliani

5.3 Laboratori riguardanti il potenziale economico degli investimenti italiani nel settore etnologico in Tunisia grazie all'attivazione di reti partenariali.

È essenziale un'efficace sensibilizzazione dell'opinione pubblica per motivare la partecipazione attiva dei gruppi target e dei beneficiari finali. DIVIN ha sviluppato una campagna ad hoc per la diffusione, l'adozione e il sostegno all'utilizzo di nuove tecniche per il trattamento dei vitigni affetti da patologie: questa strategia di capitalizzazione, valorizzazione e disseminazione dei risultati ha lo scopo di incoraggiare tra produttori locali l'uso di conoscenze e metodologie sperimentate ed appropriate, garantendo il trasferimento rapido dal campo della ricerca scientifica. Una serie di pubblicazioni (cartacee/o interattive), due eventi di

sensibilizzazione e una vetrina di buone pratiche online (già previste nella C2) hanno contribuito a rafforzare l'integrazione.

Questa attività è finalizzata a far conoscere l'originalità e la qualità dei prodotti delle tradizioni enologiche locali, attraverso l'organizzazione di specifiche azioni di comunicazione, informazione e promozione delle tradizioni locali. Sulla base dell'esperienza maturata in questo ambito, l'associazione Strada del Vino ha avuto cura di attivare dei brevi i corsi di formazione pratici sulla valorizzazione del patrimonio vinicolo legato al territorio, sviluppando degli itinerari transfrontalieri del gusto come potenziali attrattori turistici di qualità (enoturismo). Allo stesso tempo IAMC e DGPA hanno definito degli "schemi di valorizzazione" rivolti a professionisti del settore, associazioni e operatori turistici, concentrandosi sui seguenti aspetti: potenziamento commerciale, culturale e istituzionale; questa azione porterà alla creazione di un "kit di strumenti di marketing " su misura per le esigenze di crescita economica locale e transfrontaliera.

Le azioni previste hanno supportato la diffusione di conoscenza sulle opportunità di investimento in Tunisia: dei laboratori sono stati realizzati per formare ed informare sulle nuove iniziative per stimolare gli investimenti privati (ad esempio ISMED - nuovo strumento di facilitazione per finanziamenti nei paesi vicini UE) nel quadro del nuovo piano d'azione che rafforza il partenariato privilegiato tra l'UE e la Tunisia per sostenere le riforme e il processo democratico in Tunisia (stabilito ne novembre 2012) . Come evidenziato nella Conferenza FEMIP di marzo 2012, il focus doveva essere ed è stato sul miglioramento e la diversificazione dei servizi finanziari per le piccole e microimprese, con un impegno per il loro rafforzamento sul piano della competitività internazionale (innovare le strategie e i metodi di produzione, distribuzione, e marketing) al fine di accedere a nuovi mercati. In considerazione del numero crescente di partenariati di impresa nella regione dell'Euro-Mediterraneo, un laboratorio specifico ha affrontato il tema delle forme di attivazione di partenariato, compreso il partenariato pubblico-privato (PPP), approfondendo le principali questioni e nuove prospettive.

Le attività della C5 sono state gestite dal Capofila, in stretta collaborazione con P4 e P5.

Outputs: 1 campagna di sensibilizzazione destinata ai produttori italiani e tunisini; 3 Laboratori italo-tunisini rivolti a valorizzare le particolarità dei vini locali; 3 Laboratori per favorire gli investimenti italiani nel settore etnologico in Tunisia.

## **Descrizione delle attività scientifiche**

Il progetto DIVIN ha svolto un'analisi comparativa dei territori e della qualità genetica dei vigneti con le seguenti attività/output :

- Localizzazione e caratterizzazione dei popolamenti di vite selvatica, in aree identificate in Sicilia e in Tunisia: prelevati campioni di vitigni siciliani, da cui si è proceduto all'estrazione del DNA per la comparazione genetica con vitigni tunisini
- Azioni di studio e visite di approfondimento e scambio di conoscenze sulla caratterizzazione molecolare, per stimare la variabilità genetica dei vitigni e classificare il germoplasma in funzione di pool genetici
- Analisi e comparazione dei vitigni autoctoni siciliani (Catarratto, Nero d'Avola, Inzolia e Zibibbo) e tunisini (Beldi, Khamri, Razzegui e Muscat de Kelibia)
- Ottimizzazione e messa a punto di un protocollo comune per la diagnosi delle virosi
- Valutazione dello stato della virosi dei vitigni autoctoni in Tunisia e in Sicilia

Nell'ambito della realizzazione delle attività del progetto di cooperazione transfrontaliera italo-tunisina "Sviluppo di interventi innovativi sui vitigni autoctoni per l'integrazione italo-tunisina - DIVIN" (PS1.1.002), Francesco Carimi, capo ricercatore del team dell'Istituto di Bioscienze e Bio-Risorse (IBBR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Palermo ha incontrato i rappresentanti dei partner tunisini di DGPA, CBBC ed INRAT in Tunisia tra il 25 e il 27 Febbraio 2015.

Dal giorno successivo al suo arrivo è iniziata la seconda missione di campo congiunta con i rappresentanti dei partner tunisini, il dott. Mohamed Habib Khalfaoui (DGPA), il dott. Samir Chebil (CBBC) e la dott.ssa Naima Mahfoudhi (INRAT), per completare il lavoro di caratterizzazione genetica e sanitaria dei vitigni siciliani e tunisini. In particolare, sono stati condivisi gli standard (DNA e RNA) da utilizzare per le analisi comparate dei campioni vegetali raccolti nell'ambito delle attività del progetto DIVIN (C. 3 e C. 4).

Gli standard tunisini preparati dal CBBC sono di seguito elencati:

	<b>Code ENPI</b>	<b>Name cultivar</b>
1	ENPI-403	Khamri
2	ENPI-404	Razzegui
3	ENPI-405	Muscat Raf Raf
4	ENPI-406	Beldi

Gli standard tunisini preparati dall'INRAT sono di seguito elencati:

	<b>Code ENPI</b>	<b>Name Cultivar</b>
1	ENPI-346	Meski Rafraf
2	ENPI-347	Bidh El H'mem
3	ENPI-348	Charaoui
4	ENPI-349	Marsaoui
5	ENPI-350	Tebourbi
6	ENPI-351	Vieux Beldi
7	ENPI-352	M'guergueb akhal
8	ENPI-353	Kohli
9	ENPI-354	Hamami
10	ENPI-355	Bezoul Khadem
11	ENPI-356	Farranah
12	ENPI-357	Djebbi
13	ENPI-358	Bahbahi
14	ENPI-359	Garai
15	ENPI-360	Testouri
16	ENPI-361	Blanc 1
17	ENPI-362	Blanc 2
18	ENPI-363	Blanc 3
19	ENPI-364	Neb Jmal
20	ENPI-365	Balta 1
21	ENPI-366	Balta 2



22	ENPI-367	Balta 3
23	ENPI-368	Balta 4
24	ENPI-369	Rouassi 1
25	ENPI-370	R'bii 1
26	ENPI-371	R'bii 2
27	ENPI-372	Ain taghet
28	ENPI-373	Arbi
29	ENPI-374	Souebaa Eljia
30	ENPI-375	Bezoul bagra
31	ENPI-376	R'kihi
32	ENPI-377	Khadri 1
33	ENPI-378	Khadri 2
34	ENPI-379	Souche 2 blanc 1
35	ENPI-380	Souche 3 blanc 2
36	ENPI-381	Arbi local
37	ENPI-382	Meski abiadh
38	ENPI-383	Rafrafi
39	ENPI-384	Souebaa Eljia
40	ENPI-385	Asli
41	ENPI-386	Kahli
42	ENPI-387	Bidh El Hmem
43	ENPI-388	Bezoul Kalba bidha
44	ENPI-389	Asli
45	ENPI-390	Hamri
46	ENPI-391	Meski 2 Khalt
47	ENPI-392	Kahli
48	ENPI-393	Limaoua BK
49	ENPI-394	Sakasli
50	ENPI-395	Arricha
51	ENPI-396	Chaouch
52	ENPI-397	M'guergueb
53	ENPI-398	Saouadi
54	ENPI-399	Meski abiadh
55	ENPI-400	Jerbi
56	ENPI-401	Chetoui
57	ENPI-402	Meski local

L'elenco dei sue set di standard siciliani preparati da IBBR e consegnati alla dott.ssa Naima Mahfoudhi (INRAT) ed al dott. Samir Chebil (CBBC) è riportato di seguito:

	<b>Code ENPI</b>	<b>Name Cultivar</b>
1	ENPI-0020	Inzolia
2	ENPI-0021	Perricone
3	ENPI-0022	Malvasia

4	ENPI-0023	Catarratto comune
5	ENPI-0025	Damaschino
6	ENPI-0026	Carricante
7	ENPI-0099	Perricone
8	ENPI-0101	Inzolia
9	ENPI-0103	Nerello Mascalese
10	ENPI-0108	Zibibbo
11	ENPI-0118	Nero d'Avola
12	ENPI-0119	Perricone
13	ENPI-0121	Grillo
14	ENPI-0123	Frappato
15	ENPI-0127	Frappato
16	ENPI-0153	Inzolia
17	ENPI-0157	Albanello
18	ENPI-0158	Grecanico dorato
19	ENPI-0159	Grecanico dorato
20	ENPI-0172	Perricone
21	ENPI-0207	Nocera
22	ENPI-0215	Minutidda
23	ENPI-0216	Malvasia
24	ENPI-0219	Minutidda
25	ENPI-0220	Malvasia
26	ENPI-0241	Catarratto A
27	ENPI-0342	Sauvignon blanc
28	ENPI-0343	Trebbiano Toscano
29	ENPI-0344	Cabernet Sauvignon
30	ENPI-0345	Nero d'Avola

Si sono realizzate, inoltre, Azioni pilota per la definizione di una carta genetica delle colture con le seguenti attività/output :

- Condivisione di un protocollo comune per l'applicazione dell'embrionogenesi somatica per effettuare il risanamento delle viti
- Scambio di conoscenze e buone pratiche per la conservazione e gestione in sicurezza del materiale risanato sviluppo, anche attraverso missioni scientifiche in missioni nei territori siciliani e tunisini
- Raccolta di elementi per la creazione di una Carta Genetica delle Colture, che costituirà una mappa delle qualità delle varietà di viti

Nei giorni 6-7 maggio 2014, presso i laboratori dell'IBBR del CNR di Palermo, siti in Corso Calatafimi 414, si è tenuto il primo incontro tra i partner tunisini e i ricercatori dell'IBBR coinvolti nel progetto e, nello specifico, con i ricercatori coinvolti nella parte di coltura in vitro.

Erano presenti per l'IBBR il Dr. Francesco Carimi e La Dr.ssa Angela Carra. Per la Tunisia erano presenti per CBBC: Samir Chebil e Badra Bouamama e per l'INRAT Nedhra Kaaniche.

Durante il meeting si è stabilito un protocollo sperimentale unico che, insieme ai risultati parziali, è riportato di seguito.

## EMBRIOGENESI SOMATICA

### Prelievo e sterilizzazione degli espianti

Come materiale di partenza sono stati utilizzati ovari, antere, stili e fiori interi tagliati, prelevati da infiorescenze di diversi genotipi, raccolte in pieno campo prima dell’antesi. In particolare, l’attenzione è stata rivolta alle cultivar riportate in tabella 2. Il materiale vegetale ha provenienza tunisina (da ENPI 1 a ENPI 11) e italiana (da ENPI 12 a ENPI 15). Gli espianti sono stati sterilizzati per immersione in una soluzione di etanolo al 70% per 45 sec e, a seguire, in una soluzione di candeggina commerciale al 20% per 7 minuti; successivamente, sono stati eseguiti 3 risciacqui in acqua distillata sterile di 5 min. ciascuno.

### Induzione dell’embriogenesi somatica

Dopo il trattamento sterilizzante dei fiori, si è proceduto al prelievo dei diversi espianti fiorali mediante l’utilizzo di un microscopio, sotto cappa a flusso laminare. Gli espianti sono stati posti in coltura in capsule Petri (60x10 mm) contenenti 8 ml di mezzo di coltura.

Gli espianti sono stati piastrati su mezzo di coltura MS (Murashige and Skoog, 1962) contenente 20 g/l di saccarosio, 7 g/l di agar e addizionato di fitoregolatori come riportato in tabella 1. Il pH del mezzo è stato portato, mediante l’uso di NaOH, a valori compresi tra 5,65 e 5,75, prima della sterilizzazione in autoclave (121°C per 20 minuti). I fitoregolatori, sterilizzati per filtrazione, sono stati addizionati al mezzo di coltura già autoclavato.

Composizione ormonale	Mezzo di coltura
NOA 5 µM + BAP 4,4 µM	12
NOA 10 µM + BAP 4,4 µM	16

**Tab. 1:** combinazioni ormonali utilizzate per l’induzione di embrioni somatici da espianti fiorali di *Vitis vinifera*. (NOA= acido naftossiacetico; BAP= 6-benzylaminopurine)

Per ciascuna delle quattro tipologie di espianti fiorali e per le due diverse combinazioni ormonali testate, sono stati previste, per ogni genotipo, 5 ripetizioni. Le colture sono state mantenute a temperatura ambiente, al buio. Dopo circa 3 mesi dall’inizio dell’esperimento sono stati registrati i primi dati.

## Risultati

### EMBRIOGENESI SOMATICA

Dopo circa 3 mesi dalla messa in coltura degli espianti, sono state osservate 3 diverse risposte morfologiche: espianti nulla facenti; formazione di callo non- embriogenico; formazione di callo embriogenico dall’aspetto

granulare, di colore bianco o giallo pallido (Fig.1). In alcuni casi, l'osservazione al microscopio delle formazioni di callo embriogenico ha evidenziato la presenza di embrioni somatici nei diversi stadi di sviluppo (Fig.2).

In tabella 2 sono riportati i risultati parziali relativi alla percentuale di callo e alla percentuale di espianti embriogenici registrati dopo 5 mesi dall'inizio della coltura. I dati relativi agli espianti nulla facenti è stato omissso. La percentuale di espianti embriogenici non è elevata, e questo risultato è probabilmente da imputarsi all'effetto genotipo, fattore che influenza significativamente il risultato come riportato in letteratura.

GENOTIPO	CODICE ENPI	MEZZO DI COLTURA	ESPIANTO	% CALLO	% EMBRIONI
<b>Chaàraoui</b>	ENPI 1	12	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	80	0
			Antere	50	0
			Ovario	40	0
		16	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	40	0
			Antere	40	20
			Ovario	20	0
<b>Nebjmel</b>	ENPI 2	12	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	40	0
			Antere	70	20
			Ovario	46.7	0
		16	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	20	0
			Antere	40	0
			Ovario	60	0
<b>M'guergueb</b>	ENPI 3	12	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	35	0
			Antere	20	0
			Ovario	0	0
		16	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	46.7	0
			Antere	30	0

			Ovario	30	0
<b>Meski abiadh</b>	ENPI 4	12	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	30	0
			Antere	32	0
			Ovario	40	0
		16	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	30	0
			Antere	0	0
			Ovario	0	0
<b>El Houamdia</b>	ENPI 5	12	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	20	20
			Antere	70	0
			Ovario	40	0
		16	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	0	0
			Antere	60	0
			Ovario	40	0
<b>Khamri</b>	ENPI 6	12	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	35	0
			Antere	20	0
			Ovario	0	0
		16	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	20	0
			Antere	0	0
			Ovario	0	0
<b>Razzegui 1</b>	ENPI 7	12	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	20	0
			Antere	75	0
			Ovario	50	0



		16	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	40	0
			Antere	56	0
			Ovario	30	0
<b>Razzegui 2</b>	ENPI 8	12	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	0	0
			Antere	80	0
			Ovario	0	0
		16	Fiore tagliato	80	0
			Stilo	0	0
			Antere	0	0
			Ovario	0	0
<b>Muscat</b>	ENPI 9	12	Fiore tagliato	86.7	0
			Stilo	0	0
			Antere	75	0
			Ovario	40	0
		16	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	20	0
			Antere	30	0
			Ovario	0	0
<b>Beldi-Rafraf</b>	ENPI 10	12	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	86.7	0
			Antere	60	0
			Ovario	100	0
		16	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	0	0
			Antere	55	0
			Ovario	40	0
<b>Beldi-Bouargoub</b>	ENPI 11	12	Fiore tagliato	100	0

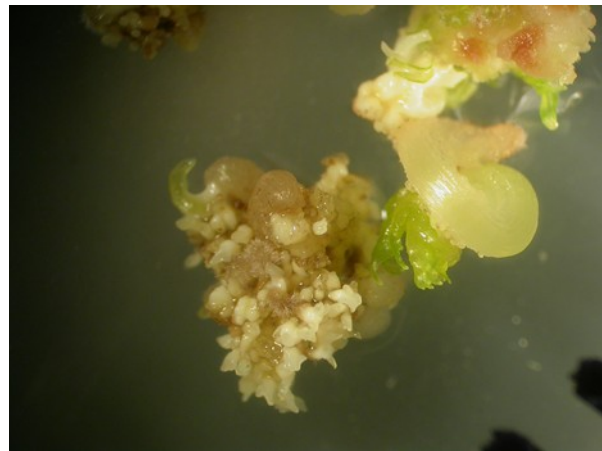
			Stilo	0	0
			Antere	64	0
			Ovario	0	0
		16	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	0	0
			Antere	60	0
			Ovario	40	0
<b>Nero d'Avola</b>	ENPI 12	12	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	20	0
			Antere	53.3	0
			Ovario	52	0
		16	Fiore tagliato	93.3	0
			Stilo	0	0
			Antere	60	0
			Ovario	40	0
<b>Zibibbo</b>	ENPI 13	12	Fiore tagliato	//	0
			Stilo	//	0
			Antere	//	0
			Ovario	//	0
		16	Fiore tagliato	100	0
			Stilo	0	0
			Antere	90	0
			Ovario	60	0
<b>Inzolia</b>	ENPI 14	12	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	20	0
			Antere	60	0
			Ovario	40	0
		16	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	0	0
			Antere	100	0

			Ovario	50	0
<b>Catarratto</b>	ENPI 15	12	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	20	0
			Antere	60	0
			Ovario	40	0
		16	Fiore tagliato	0	0
			Stilo	64	0
			Antere	55	0
			Ovario	60	0

**Tabella 2:** Percentuali di callo e espianti embriogenici ottenuti da fiori di vite dopo 5 mesi dall’inizio dell’esperimento.



**Fig.1** Callo embriogenico proveniente da antere di Nebjmel (ENPI 2) poste in mezzo 12.



**Fig.2** Callo embriogenico proveniente da pistilli di Nero d’Avola (ENPI 12) posti in coltura in mezzo 12. E’ possibile vedere contemporaneamente embrioni somatici a diversi stadi di sviluppo.