

M. STELLA GRANDO*, RITA VIGNANI**, MONICA SCALI**,
MADDALENA SORDO*, ELISA PAOLUCCI**, SILVIA LORENZI*,
JACOPO BIGLIAZZI**, FLAVIA M. MOREIRA*, RICCARDO VELASCO*,
MAURO CRESTI**

Tracciabilità su base molecolare dell'intera filiera vitivinicola

INTRODUZIONE

Ragioni tecniche e commerciali si sono aggiunte negli ultimi tempi all'antica curiosità di conoscere l'identità delle viti e dei loro prodotti. La possibilità di stabilire sulla base di osservazioni morfologiche la corrispondenza varietale dei vitigni è stata infatti sempre molto esplorata, anche in ambienti diversi da quello produttivo ed è testimoniata dallo sviluppo della scienza ampelografica e dall'abbondante letteratura con riferimenti iconografici. Il nome dei vitigni è oggi evocativo per molti appassionati di vino, tanto che lo stesso marketing a volte attinge al vasto patrimonio di leggende e aneddoti per promuovere un prodotto enologico. Ma la fioritura di denominazioni che caratterizza i vitigni non ha uguali nelle altre specie coltivate, come particolare è per la vite l'esistenza di un numero ancora indefinito di varietà diverse nelle collezioni di germoplasma. In questa complessa situazione si inserisce oggi anche l'opportunità di stabilire l'origine varietale dei prodotti enologici, al fine di dimostrare il rispetto dei numerosi disciplinari che regolano le denominazioni dei vini.

IL RICONOSCIMENTO MOLECOLARE DELLE VARIETÀ DI VITE

L'applicazione diffusa dei test basati sul DNA nell'ultimo decennio ha certamente rivoluzionato molte assunzioni. Il riconoscimento dei vitigni è diven-

* *Fondazione Edmund Mach-Istituto Agrario di San Michele all'Adige Centro Ricerca e Innovazione, (Trento)*

** *Università di Siena, Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti"*

tato più oggettivo, sono stati svelati casi di identità insospettiti tra le varietà, è stato possibile indagare i legami di parentela e scoprire l'origine genetica di molte cultivar locali e internazionali (Vouillamoz e Grando, 2006). I marcatori molecolari di elezione in viticoltura sono diventati i microsatelliti, ovvero dei tratti del genoma caratterizzati da sequenze ripetute in tandem che presentano una elevata variabilità naturale. Sfruttando l'alto potere discriminante di questi marcatori, alcuni loci microsatelliti (SSR) proposti dalla comunità scientifica sono stati adottati per stabilire un profilo molecolare minimo delle varietà di vite, al fine di semplificare i confronti varietali e creare delle descrizioni di riferimento per i vitigni. Il successo di tale approccio è dimostrato dai numerosi laboratori che si sono dotati dell'attrezzatura necessaria per le analisi, dalla miriade di profili SSR pubblicati nelle riviste tecnico-scientifiche e anche dall'inserimento ufficiale di 6 loci microsatelliti fra i descrittori OIV (This et al., 2004). Questo riconoscimento della necessità di complementare le tradizionali descrizioni ampelografiche e ampelometriche con l'apporto dei marcatori molecolari ha rappresentato un passaggio significativo nella pratica di caratterizzazione dei vitigni, tuttavia ha reso indispensabile la creazione di database dei profili molecolari e la definizione true-to-type delle varietà.

La possibilità di avere l'intero patrimonio di vitigni e accessioni di germoplasma viticolo descritto con profili molecolari molto informativi, facili da confrontare e rapidi da ottenere è oggi tecnicamente fattibile ma un po' difficile da realizzare se si considera la frammentarietà delle collezioni e l'esistenza di materiali ancora non recuperati sul territorio.

IL RICONOSCIMENTO DEI CLONI

In viticoltura si parla di cloni per intendere sia delle cultivar ottenute dalla propagazione di varianti fenotipiche comparse all'interno di un certo vitigno, sia delle selezioni sanitarie di uno stesso vitigno. A sua volta il vitigno è una popolazione di piante riprodotte per via vegetativa da un semenzale originario e ha dunque generalmente un'origine monoclonale. Cercare le mutazioni genetiche responsabili delle variazioni intra-varietali è stata finora un'impresa incerta. Questo perché non sempre il fenotipo della pianta di vite varia a causa di una mutazione genetica, anche se poi la variazione si dimostra relativamente stabile nel tempo. Fenomeni di modificazione del patrimonio genetico sono senz'altro all'origine di certe variazioni somatiche osservate nei tralci di diverse varietà che poi sono state propagate. Ogni caso

ha presumibilmente un'origine particolare e non esiste ancora un metodo efficace per la discriminazione generale dei cloni. I mutanti del colore della bacca sono stati recentemente distinti a livello molecolare con un certo successo, grazie alla chiara descrizione del fenotipo e all'esistenza di informazioni sul controllo genetico e biochimico della pigmentazione dell'uva (Walker et al., 2006 e Yakushiji et al., 2006). Tuttavia, la maggior parte delle selezioni clonali in viticoltura non si distingue dalla varietà di origine per qualche tratto ben preciso. Di solito le caratteristiche dei cloni fanno riferimento a variazioni di epoche fenologiche, migliori performance produttive, una più elevata qualità delle uve. In queste situazioni la ricerca delle mutazioni non può essere ristretta a geni candidati, perché è difficile ipotizzare la base genetica del fenotipo complesso. Se la differenza è genetica, verrà più probabilmente identificata tramite estesi confronti delle porzioni più instabili del genoma, come recentemente dimostrato dal profiling di famiglie di retrotrasposoni in vite (Moisy et al., 2008). Un'altra prospettiva potrà considerare lo stato epigenetico della pianta: differenze nel pattern di metilazione del genoma sono state riportate da Schellenbaum et al. (2008) tra cloni osservati dopo coltura in vitro della stessa varietà di vite.

OLTRE AI MARCATORI MICROSATELLITI: GLI SNP

I microsatelliti sono e, probabilmente, saranno ancora per qualche anno i marcatori più utilizzati dalla comunità scientifica interessata all'analisi varietale. Questi marcatori potranno essere sostituiti o affiancati da altri quali i Polimorfismi di Singolo Nucleotide (SNP). Gli SNP derivano dalle variazioni, per mutazione, di una singola base nucleotidica e sono molto frequenti nel genoma. L'eterozigosi del Pinot Nero, per esempio, è documentata dall'identificazione di circa 2 milioni di polimorfismi di singolo nucleotide, oltre a circa un milione di inserzioni e delezioni (in/dels) nella sequenza del suo intero genoma (Velasco et al., 2007). I marcatori SNP si prestano meglio dei microsatelliti a un'analisi automatizzata e in multiplex, ovvero di molti loci contemporaneamente. Diverse tecnologie sono disponibili per caratterizzare gli individui a livello di numerosi SNP e alcune sono già state applicate alla vite, come per es. il sistema SNPLex (Lijavetzky et al., 2007). Con questo approccio è stato calcolato che un set di 48 SNP validati, distribuiti lungo tutti i cromosomi di vite e frequenti tra le cultivar, può definitivamente soddisfare la maggior parte delle richieste di genotipizzazione dei materiali viticoli per scopi di tracciabilità (tab. 1). Diversi sistemi possono oggi fornire rapidamente

VITIGNO	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	SNP 6	SNP 7	SNP 8	SNP 9	SNP 10	SNP 11	SNP 12	SNP 13	SNP 14
Rebo	CC	AG	CC	TT	TT	TT	CT	CG	CC	AA	AA	AA	AG	AG
Refosco peduncolo rosso	CC	AG	CC	CT	GG	TT	CT	CG	AA	GG	AA	TT	GG	AG
Schiava grossa	AA	AG	CT	CT	GT	AT	TT	CC	AA	AA	AA	TT	AA	AG
Marzemino	CC	AG	CC	TT	GT	TT	CT	CG	AC	GG	AA	TT	GG	AG
Teroldego	CC	AG	CC	TT	GT	AT	CT	CG	CC	AG	AA	AT	GG	AG
Lagrein	AC	AG	CC	TT	TT	AT	TT	CG	AC	AA	AA	AA	GG	AG
Lambrusco a f.f.	AA	GG	CC	CT	GT	AT	TT	CG	CC	AG	AG	AT	AA	AG
Lambrusco casetta	AC	GG	CT	TT	TT	TT	TT	CG	CC	AA	AA	AT	AA	AA

Tab. 1 *Esempio di genotipizzazione dei vitigni trentini ad alcuni loci SNP*

informazioni su migliaia di SNP, come una scansione dell'intero genoma, per ogni varietà o accessione di interesse. In questa direzione si sono mossi diversi gruppi per caratterizzare il germoplasma di vite in collezione, allo scopo di studiare le origini genetiche e la diffusione della viticoltura, ma soprattutto di stabilire associazioni tra il genotipo molecolare e tratti di importanza agronomica (Myles et al., 2010). Con approcci simili, che garantiscono l'esplorazione di una buona parte delle porzioni variabili del genoma, è stata intrapresa la ricerca di variazioni genetiche anche tra le selezioni clonali.

TRACCIABILITÀ DELLA FILIERA VIVAISTICA

Il controllo dell'identità dei materiali prodotti dalle attività vivaistiche ha oggi a disposizione metodi robusti e facilmente accessibili basati sui test del DNA. Una volta stabilito il profilo delle piante madri, la corrispondenza dei materiali di propagazione è accertabile con analisi di routine. Certo non tutti i vitigni inseriti nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite si possono definire univocamente caratterizzati. Esistono infatti casi in cui lo stesso genotipo compare nel Registro con diverse denominazioni (sinonimie non riconosciute) e casi in cui genotipi diversi sono considerati la stessa varietà (omonimie). Inoltre, la mancanza delle fonti originali dei materiali riportati nel Registro rende difficile stabilire il profilo genetico di riferimento per alcuni vitigni minori e diversi portinnesti. Il viticoltore ha comunque modo di avvalersi oggi di validi strumenti per conoscere il genotipo molecolare dei materiali presenti nei vigneti o acquistati per i nuovi impianti. Considerato che la filiera vivaistica è solo una parte dell'intera filiera viti-enologica, la certezza dell'identità

e dell'omogeneità genetica delle viti coltivate rappresenta una buona base per garantire e difendere l'identità genetica del vino prodotto.

TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DEL VINO

La tracciabilità di un prodotto alimentare tipico, compreso il vino di alta qualità, può essere ottenuta sia attraverso l'attuazione di un'attenta politica di tutela del germoplasma locale che attraverso lo sviluppo di metodiche analitiche in grado di supportare le attuali procedure di certificazione, da cui sia possibile attestare la composizione delle materie prime utilizzate. Data la crescente necessità di competere efficacemente sui mercati internazionali, sembra infatti necessario che le attuali procedure di certificazione documentale vengano implementate con test analitici standardizzabili e ripetibili, in accordo a un rigoroso criterio di applicabilità scientifica.

Un sistema di tracciabilità completo registra e trasmette informazioni dettagliate di un particolare cibo attraverso la catena alimentare, recuperando le informazioni critiche relative a ogni stadio di lavorazione delle materie prime. Allo scopo di attuare un sistema accurato di tracciabilità è comunque essenziale avere una conoscenza approfondita sull'identità genotipica dei vitigni, di cui il germoplasma regionale italiano è estremamente ricco. È quindi impensabile sviluppare e adottare un sistema di tracciabilità molecolare aziendale accurato per il vino, senza avere come prerequisito essenziale una conoscenza dettagliata della variabilità genotipica dei vitigni utilizzati per le varie produzioni regionali, regolamentate dai numerosi e rispettivi disciplinari di produzione.

I marcatori molecolari e in particolare i marcatori tipo SSR si sono rivelati già da circa un decennio, strumenti importanti per la determinazione varietale di mosto e vino (Siret et al., 2000; Garcia-Beneytez et al., 2002; Vignani et al., 2006; Bisson et al. 2002).

L'autenticazione della composizione varietale di un vino, mediante test del DNA, costituisce pertanto una logica conseguenza e un completamento dello sviluppo delle tecniche molecolari applicate a tutela della qualità delle produzioni vitivinicole.

METODI DI ESTRAZIONE DI DNA DA VINO

Nell'ambito della caratterizzazione varietale del vino, l'aspetto critico dell'intero processo consiste nella fase di estrazione del DNA residuo presente in bottiglia.

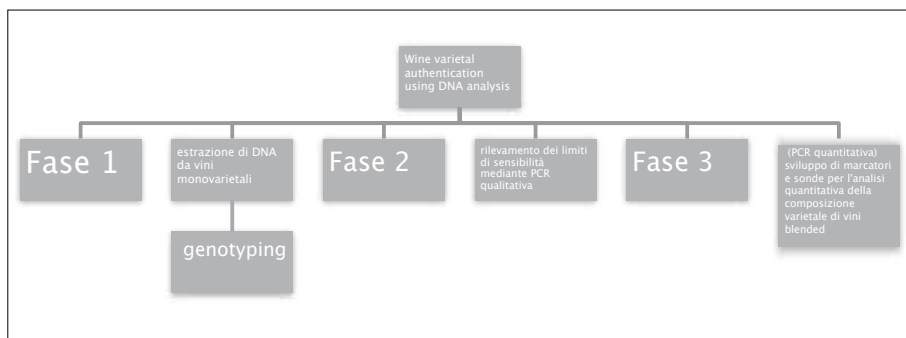


Fig. 1 Schema delle fasi di attuazione del progetto dal titolo: "Wine varietal authentication using DNA analysis" (settembre 2009-marzo 2011), finanziato a Serge-genomics (Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti", Università di Siena) dall'Ente governativo statunitense TTB per lo studio di fattibilità dell'applicazione dei test molecolari per la determinazione della composizione varietale del vino

Come è naturale, il DNA presente nel vino derivante da *Vitis vinifera* costituisce solo una minima parte del DNA presente, che deriva infatti in prevalenza dalle popolazioni di lievito e dai batteri che hanno partecipato ai processi fermentativi (Savazzini e Martinelli 2006), ed è stimabile nell'ordine delle pico- fento- moli. A tale scopo, nei laboratori Serge-genomics (www.serge-genomics.it, Siena) sono stati confrontati tre metodi di estrazione su un pannello di 10 vini commerciali comprendenti varie tipologie di produzioni regionali aventi invecchiamento diverso (fino a 12 anni). I risultati ottenuti hanno dimostrato un miglior risultato, valutato in termini di rapporto resa e percentuale di campioni amplificabili in PCR, nel caso del protocollo di Siret et al. (2000), a cui sono state apportate modificazioni minori.

Allo scopo di confrontare l'efficacia dei marcatori microsatelliti per la certificazione dell'uvaaggio del vino mediante test del DNA, il Dipartimento di Scienze Ambientali, attraverso lo spin-off Serge-genomics, ha intrapreso uno studio di fattibilità finanziato dal TTB (Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau) volto alla caratterizzazione di vini monovarietali sperimentali prodotti appositamente allo scopo dal "Wine Institute" (US). Il progetto dal titolo: "WINE VARIETAL AUTHENTICATION USING DNA ANALYSIS" (Settembre 2009-Marzo 2011) (fig. 1), ha dimostrato che esiste una buona corrispondenza tra i profili genotipici ottenuti da vino e pianta (vedi paragrafo successivo).

I vini impiegati sono costituiti da sette tipologie monovarietali ottenute in quadruplicato dai principali vitigni diffusi in USA (Pinot Noir, Merlot, Sauvi-

ignon Blanc, Riesling, Zinfandel, Chardonnay, Cabernet Sauvignon). Alla lista dei campioni sono stati aggiunti dei vini monovarietali di controllo ottenuti con Sangiovese. La qualità del DNA è stata verificata mediante spettrofotometria fine (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) e le frazioni di DNA purificato sono state conservate a -20°C e utilizzate per le applicazioni “downstream” anche a distanza di diverse settimane, dimostrando la relativa stabilità chimica del DNA estratto, anche se presente in quantità estremamente esigua. A causa delle condizioni critiche del DNA presente nel vino, le letture mediante spettrofotometro hanno condotto sovente a valori non completamente attendibili. Per questa ragione i campioni sono stati sistematicamente sottoposti ad amplificazione mediante PCR per l'identificazione del genotipo.

GENOTIPIZZAZIONE DEL DNA DA VINO

Ogni campione di DNA è stato analizzato mediante genotipizzazione in condizioni standard (Vignani et al., 2008) utilizzando un pannello di almeno 7 loci SSR, in modo da garantire un'adeguata significatività statistica ($PI \leq 10^{-7}$). Il dimensionamento allelico è stato effettuato per mezzo di un sequenziatore e analizzatore di frammenti (MegaBACE TM 500), dotato di software per la rielaborazione dei profili genotipici, Fragment Profiler, v. 1.2 (entrambi GE Healthcare, Milano, Italia). I dati grezzi sono stati confrontati con diverse banche dati on-line specificamente dedicate alla vite (MsDbase <http://www.msdb.unisi.it/login.php>, www.vitisgenome.it/en/index.php5). Tutti i campioni di vino hanno consentito di ottenere una frazione di DNA utilizzabile per la genotipizzazione, mostrando una buona ripetibilità nelle repliche tecniche. In media, ogni vino è stato identificato sulla base del dimensionamento allelico effettuato su 12 loci. I dati mostrati in tabella 2 sono la risultante delle analisi effettuate in tre repliche tecniche per tipologia varietale, incluso i campioni di controllo monovarietale di Sangiovese che sono stati introdotti a ogni ciclo di caratterizzazione dei vini forniti dal Wine Institute statunitense.

Due vini (Sauvignon Blanc e Sangiovese) sono stati analizzati per 15 e 14 loci, rispettivamente. Altri due, Chardonnay e Pinot nero, per 11 loci, il Cabernet Sauvignon per 14 loci e lo Zinfandel per 7 loci rispettivamente. Solo il Riesling e il Merlot sono stati analizzati utilizzando 5 e 6 loci rispettivamente, che rappresentano mediamente, fatto salvo il potere discriminante dei marcatori impiegati, il pannello minimo di loci SSRs utili a effettuare un'accurata identificazione varietale per la vite.

<i>vini</i>	<i>TTB</i>	<i>TTB</i>	<i>TTB</i>	<i>TTB</i>	<i>TTB</i>	<i>TTB</i>	<i>TTB</i>	<i>controllo</i>
	Riesling	Sauv Blanc	Chardon	Cabernet S	Merlot	Pinot Nero	Zinfandel	Sangiovi
D7		+						+
S2		+				+		+
D14		+		+		+		+
D27	+	+	+	+	+	+	+	+
D25		+	+	+	+	+	+	+
ZAG47	+	+	+	+				+
D31		+	+	+	+	+	+	+
ZAG79		+		+		+		+
D21	+	+	+	+	+		+	+
D36	+		+	+	+		+	+
ZAG21		+	+	+		+		+
ZAG64		+		+			+	
ZAG83		+	+	+		+		+
D24	+	+	+	+		+	+	+
D32		+	+	+				
D34		+	+	+	+	+		+

Tab. 2 *Amplificazione della componente di DNA residuale nei 7 vini monovarietali prodotti dal Wine Institute, oltre al vino di controllo monovarietale ottenuto da Sangiovese. L'identificazione varietale del vitigno impiegato è basata sull'amplificazione di un pannello di marcatori SSRs variabile dai 5 ai 15 loci*

MISURE DELLA COMPONENTE VARIETALE DEL DNA NEL VINO

Fra gli aspetti critici della caratterizzazione varietale dei vini mediante amplificazione di loci microsatelliti, è importante valutare le potenzialità della metodica sotto il profilo della sensibilità. Tale aspetto risulta fondamentale sia per stimare la potenziale contaminazione varietale in vini monovitigno, che per saggiare l'uvaaggio nel caso dei vini *blended*. Il limite di rilevabilità permette di capire quale sia la percentuale minima di uvaaggio proveniente da una cultivar, eventualmente non ammessa dal disciplinare di produzione, rintracciabile nel vino. Nel caso specifico sono stati prodotti artificialmente vini *blended* costituiti da Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc, presenti in quantità controllate.

I vini *blended* sono stati ottenuti incrementando la percentuale volumetrica di Sauvignon Blanc rispetto al Cabernet Sauvignon d'intervalli minimi (da 1 a 2 %), in accordo allo schema riportato in tabella 3.

L'estrazione del DNA e la caratterizzazione varietale è stata effettuata per i seguenti campioni: 1-2-3-4-5-6-11-14-16-26-51, consentendo di evidenziare con attendibilità statistica la componente varietale minoritaria fino all'1% (Elisa Paolucci, tesi di dottorato).

Numero assegnato	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CABERNET SAUVIGNON	100%	99%	97.5%	95%	92%	90%	88%	86%	84%	82%
SAUVIGNON BLANC	0%	1%	2.5%	5%	8%	10%	12%	14%	16%	18%
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
CABERNET SAUVIGNON	80%	78%	76%	74%	72%	70%	68%	66%	64%	62%
SAUVIGNON BLANC	20%	22%	24%	26%	28%	30%	32%	34%	36%	38%
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CABERNET SAUVIGNON	60%	58%	56%	54%	52%	50%	48%	46%	44%	42%
SAUVIGNON BLANC	40%	42%	44%	46%	48%	50%	52%	54%	56%	58%
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
CABERNET SAUVIGNON	40%	38%	36%	34%	32%	30%	28%	26%	24%	22%
SAUVIGNON BLANC	60%	62%	64%	66%	68%	70%	72%	74%	76%	78%
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
CABERNET SAUVIGNON	20%	18%	16%	14%	12%	10%	8%	5%	2.5%	1%
SAUVIGNON BLANC	80%	82%	84%	86%	88%	90%	92%	95%	97.5%	99%
	51									
CABERNET SAUVIGNON	0%									
SAUVIGNON BLANC	100%									

Tab. 3 Vini "blended" ottenuti da vini monovarietali di Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc rispettivamente, utilizzati per la determinazione del limite di rilevabilità della componente minoritaria mediante PCR

CONCLUSIONI

Attraverso le analisi del DNA è oggi possibile effettuare il controllo di qualità genetica lungo l'intera filiera vitivinicola, per quanto l'estensione dell'indagine alle numerose casistiche dei disciplinari di produzione dei vini italiani richieda ancora un certo impegno di validazione. Insieme all'analisi isotopica che traccia l'origine geografica dei prodotti enologici, l'approccio genetico-molecolare e una più profonda valutazione della composizione dei vini offerta dall'emergente analisi metabolomica rappresentano potenti nuovi strumenti disponibili per complementare gli attuali sistemi di certificazione.

RIASSUNTO

Le produzioni vivaistiche viticole si basano sulla moltiplicazione vegetativa di materiali che rispondono ai requisiti di identità su base ampelografica. Diversi tipi di marcatori del DNA possono essere applicati per analisi di corrispondenza varietale e finora i profili di riferimento sono stati basati sui microsatelliti. Altri polimorfismi del DNA vengono ora esplorati per sviluppare applicazioni utili anche al riconoscimento delle selezioni clonali. La conoscenza della variabilità genotipica dei materiali utilizzati è un prerequisito per lo sviluppo e l'adozione di sistemi di tracciabilità molecolare che si estendano al segmento enologico. Insieme ad alcune considerazioni specifiche sui segmenti vivaistico ed enologico della filiera vitivinicola, in questa presentazione si riportano i risultati dell'esperienza di analisi della componente varietale del DNA del vino ottenuti dal laboratorio Serge-genomics dell'Università di Siena.

ABSTRACT

Grapes are propagated by nurseries starting from stocks which are identified based on ampelographic evaluations. In order to check the identity of grapevine materials from the source to the vineyard, several kinds of DNA markers are available, even though reference DNA profiles have been established so far based only on microsatellites. Other DNA polymorphisms are now being explored for the identification of grapevine clonal selections. Before the development of a DNA-based system of traceability for controlling the entire production chain at farm level, the extent of genetic variability within the cultivated materials should be considered. Here we discuss some specific features of grape and wine molecular tracing and present the results obtained by the laboratory Serge-genomics at Siena University aimed to determine the grape cultivar content of wine using microsatellite PCR products.

RINGRAZIAMENTI

La caratterizzazione del germoplasma viticolo con marcatori del DNA e lo sviluppo di un sistema di riconoscimento dei vitigni finalizzato ad applicazioni di tracciabilità sono stati condotti presso la FEM-IASMA con il finanziamento del Progetto Europeo GRAPE-GEN06.

Il presente studio, per ciò che riguarda la tracciabilità molecolare del vino, è stato finanziato all'Università di Siena dallo statunitense TTB nell'ambito del progetto: "*Wine varietal authentication by use of DNA analysis*". Si ringraziano in particolare il Dr. Abdul Mabud per i preziosi suggerimenti e il costante supporto scientifico offerto durante tutto lo svolgimento del progetto e i Sig.ri Giampaolo Fregoli e Gianni Totaro di Sistema Qualità Siena per aver fornito i vini monovarietali di Sangiovese usati come controllo.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

BISSON L., WATERHOUSE A. L., EBELER S. E., WALKER A., LAPSLEY J.T. (2002): *The present and future of the International wine industry*, «Nature», 418, pp 696-699.

- GARCIA-BENEYTES E., MORENO-ARRIBAS M.V., BORREGO J., POLO M.C., IBANEZ J.J. (2002): *Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of Vitis vinifera L. using microsatellite markers*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 50, pp. 6090-6096.
- LIJAVETZKY D., CABEZAS J.A., IBÁÑEZ A., RODRÍGUEZ V., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M. (2007): *High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (Vitis vinifera L.) by combining a re-sequencing approach and SNPLex technology*, «BMC Genomics», 8, pp. 424-434.
- MYLES S., CHIA J.-M., HURWITZ B., SIMON C., ZHONG GY. ET AL. (2010): *Rapid Genomic Characterization of the Genus Vitis*, «PLoS ONE» 5, e8219. doi:10.1371/journal.pone.0008219.
- MOISY C., GARRISON K.E., MEREDITH C.P., PELS F. (2008): *Characterization of ten novel Ty1 copia-like retrotransposon families of the grapevine genome*, «BMC Genomics», 9, pp. 469-475.
- SAVAZZINI F., MARTINELLI L. (2006): *DNA Analysis in Wines: development of methods for enhanced extraction and real-time Polymerase Chain Reaction quantification*, «Analytica Chimica acta», 563, pp. 274-282.
- SCELLENBAUM P., MOHLER V., WENZEL G., WALTER B. (2008): *Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (Vitis vinifera L.)*, «BMC Plant Biology», 8, pp. 78-85.
- SIRET R., BOURSICQUOT J.M., MERLE M.H., CABANIS J.C., THIS P. (2000): *Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (Vitis vinifera L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 48, pp. 5035-5040.
- THIS P., JUNG A., BOCCACCI P., BORREGO J., BOTTA R., COSTANTINI L., CRESPIAN 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*, «Theoretic and Applied Genetics», 109, pp. 1448-1458.
- VELASCO R., ZHARKIKH A., TROGGIO M., CARTWRIGHT D.A., CESTARO A. ET AL. (2007): *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*, «PLoS ONE», 7, pp. 1326-1330.
- VIGNANI R., MASI E., SCALI M., MILANESI C., SCALABRELLI G., WANG W., SENSI E., PAOLUCCI E., PERCOCO G., CRESTI M. (2008): *A critical evaluation of SSRs analysis applied to Tuscan grape (Vitis vinifera L.) germplasm*, «Advances in Horticultural Science», 22, pp. 33-37.
- VIGNANI R., WANG W., SCALI M., PAOLUCCI E., PECORARO L., PERCOCO G., CRESTI M. (2006): *SSR markers for Tuscan grapevine germplasm evaluation and wine traceability*, XIV Plant & Animal Genome XIV Conference, 14-18 Gennaio 2006, S. Diego California (USA), p. 152.
- VOUILLAMOZ J., GRANDO M.S. (2006): *Genealogy of wine grape cultivars: Pinot is related to Syrah*, «Heredity», 97, pp. 102-110.
- WALKER A.R., LEE E., ROBINSON S.P. (2006): *Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus*, «Plant Molecular Biology», 62, pp. 623-635.
- YAKUSHIJI H., KOBAYASHI S., GOTO-YAMAMOTO N., JEONG S.-T., SUETA T., MITANI N.,

AZUMA A. (2006): *A skin color mutation of grapevine, from black-skinned 'Pinot Noir' to white skinned 'Pinot Blanc' is caused by the deletion of the functional VvmybA1 allele*, «Bioscience, Biotechnology and Biochemistry», 70, pp. 1506-1508.