

LA VARIABILITÀ INTRAVARIETALE NELLA VITE: le vie che si aprono con la sua analisi genetica

S. Meneghetti, G. Morreale, A. Calò, A. Costacurta.

Introduzione

La constatazione della variabilità all'interno di una popolazione varietale, oltre che fra vitigni, ha in viticoltura un passato piuttosto remoto anche se non molto conosciuto.

Nel libro III, 9, 1 del suo *De re rustica*, Columella [1] si esprime proprio nel seguente modo: "... per quanto la natura abbia voluto che alcune varietà fossero particolarmente feraci, come la Biturica e la Balisca, non può aver reso l'Aminnea così sterile che su molte migliaia di piante di tale varietà non ve ne abbia essere almeno qualcuna buona produttrice ... questo ragionamento è perfettamente verosimile, ma l'esperienza mi ha dimostrato che è anche vero ..." (Fig. 1).

L. JVNII MODERATI
COLVMELLAE
DE
RE R VSTICA
LIBRI XII
CVRANTE
JO. MATTHIA GESNERO
TOMVS PRIMVS



MANNHEMII,
Cura & Sumptibus Societatis literatae
MDCCLXXXI.

148 COLVMELLAE LIB. III.

tius orbis fruges, adhibito studio colonorum, ferre didicerit. quo minus addubitamus de eo fructu, qui velut indigena, peculiarisque & vernaculus est hujus foli. Neque enim dubium est, Maffici, Surrentinique & Albanæ atque Caecubi agri vites omnium, quas terra suffinet, in nobilitate vini principes esse.

Ut uva complura genera acinorum habeat.

CAP. IX. Foecunditas ab his forsitan desideratur: sed & haec adjuvari potest cultoris industria. Nam si, ut paullo ante retuli, benignissima rerum omnium parens natura, quaeque genteis atque terras ita muneribus propriis ditavit, ut tamen caeteras non in uniuersum similibus dotibus fraudaret: cur eam dubitemus etiam in vitibus praedictam legem seruasse? ut quamvis earum genus aliquod praecipue foecundum esse uoluerit, tanquam Bituricum, aut basilicum; non tamen sic Amineum sterile reddiderit, ut ex multis millibus ejus ne paucissimae quidem vites foecundae, tanquam in Italicis hominibus Albanæ illae sorores reperiri possint. Id autem cum sit verisimile, tum etiam verum esse nos docuit experimentum, cum & in Ardeatino agro, quem multis temporibus ipsi ante possedimus, & in Carseolano, itemque

Fig. 1. Tratto da libro III, 9, 1 del *De re rustica* di L. Junii Moderati Columellae edizione curata da Johann Matthias Gesner nel 1781

Questa profondità di ragionamento (nel tempo e nella psiche) va bene messa in evidenza, perché gli uomini hanno evidentemente seguito nei secoli questa percezione per scegliere e selezionare i biotipi (come li chiamiamo oggi) per le coltivazioni. Ed il dialogo fra uomo e pianta si è stabilito non solo per la scelta dei vitigni, ma anche all'interno di quelle che oggi chiamiamo popolazioni varietali.

Oggi sappiamo che l'eterogeneità, all'interno della varietà, può avere un'origine policlonale, può esser dovuta a mutazioni stratificatesi nel tempo in funzione anche di una struttura preferenzialmente chimerica della pianta, dovuta ai due strati cellulari di differente origine ontogenetica dei quali è composto il germoglio e che si esprimono in modi differenti con la moltiplicazione vegetativa.

Sta di fatto che proprio in quella che chiamiamo selezione clonale abbiamo sempre sfruttato questa diversità per scegliere piante con caratteri quantitativi più o meno accentuati.

Abbiamo applicato analisi statistiche per separare gli effetti ambientali e abbiamo applicato i concetti di "stabilità ambientale" per misurare le distanze nelle espressioni fenotipiche di caratteri ritenuti interessanti per la coltivazione; ma non siamo andati molto al di là del metodo proposto da Columella. Forse e per un certo tempo ci siamo anche poco preoccupati di estinguere una variabilità, base essenziale del mantenimento di un insostituibile equilibrio con l'ambiente.

Ad un certo punto i progressi delle analisi genetiche ci hanno permesso di evidenziare sicure differenze genetiche fra cultivar ma difficilmente siamo scesi a livello intravarietale. Questa variabilità che ora chiamiamo clonale, invece, pur essendo composta fondamentalmente dalla variabilità genetica della vite, ha una sua natura in buona parte sconosciuta dal punto di vista genetico in quanto talvolta legata a variazioni nella trascrizione, ma frequentemente derivante da differenti sviluppi durante la traduzione.

Il nostro laboratorio si è molto impegnato per evidenziare differenze genetiche fra cloni e ne è scaturito un protocollo di analisi, del quale accenneremo, che ha messo bene in evidenza queste differenze; tutti i lavori eseguiti ci hanno anche portato ad alcune inattese ma fondamentali osservazioni che qui riassumeremo.

L'indagine della variabilità genetica intravarietale e l'individuazione molecolare di biotipi e cloni è stata svolta associando una tecnica capace di sondare ampie porzioni del genoma (AFLP, Amplified

Fragment Length Polymorphism) con l'utilizzo di sequenze che caratterizzano zone ipervariabili quali le regioni microsatelliti, sfruttate in *Vitis* per l'identificazione varietale. La discriminazione tra genotipi di vite appartenenti alla medesima cultivar [2] è stata messa a punto espandendo l'analisi molecolare su DNA di vite precedentemente ristretto, ligato e pre-amplificato secondo la tecnica AFLP e successivamente associando ai primer universali AFLP altri primer tipici di specifiche regioni microsatelliti (SSR, Simple Sequence Repeat), regioni fiancheggianti i microsatelliti (ISSR, Inter Simple Sequence Repeat) o in cui si ha un cambiamento nella sequenza del motivo microsatellite SAMPL (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci), compiendo in tal modo un'analisi completa su tutto il genoma di vite (non mirata come per gli SSR) ma che tiene conto anche dei polimorfismi tassonomicamente importanti per il genere *Vitis* (microsatelliti). Queste metodologie AFLP-derivate prendono il nome di SAMPL e M-AFLP (Microsatellites Amplified Fragment Length Polymorphism) e sono state messe a punto per ciascuna cultivar poiché non è stata trovata una procedura standard univoca bensì un protocollo di azione egualmente efficace ed applicabile in ogni varietà di vite finora analizzata [3].

Con questi protocolli abbiamo recentemente analizzato differenze intravarietalità: di Garnacha, Grenache, Gamay perugino, Tocai rosso, Alicante, Cannonau (stesso vitigno) su biotipi provenienti da Spagna, Francia, Toscana/Umbria, Veneto, Sicilia Sardegna, (Fig. 2) [4]; di Malvasia nera pugliese su biotipi provenienti dalle province di Lecce e Brindisi (Fig. 3 A., B.); di Negroamaro su biotipi provenienti da diversi comuni delle province di Lecce e Brindisi (Fig. 4 A., B.); di Primitivo su biotipi delle province di Bari e Taranto e della California (Zinfandel) (Fig. 5 A., B., Fig. 6) [5]; di Malvasia istriana su biotipi del Friuli Venezia Giulia e dell'Istria (Fig. 7) [6].

Di seguito riportiamo i raggruppamenti più significativi con le figure relative.

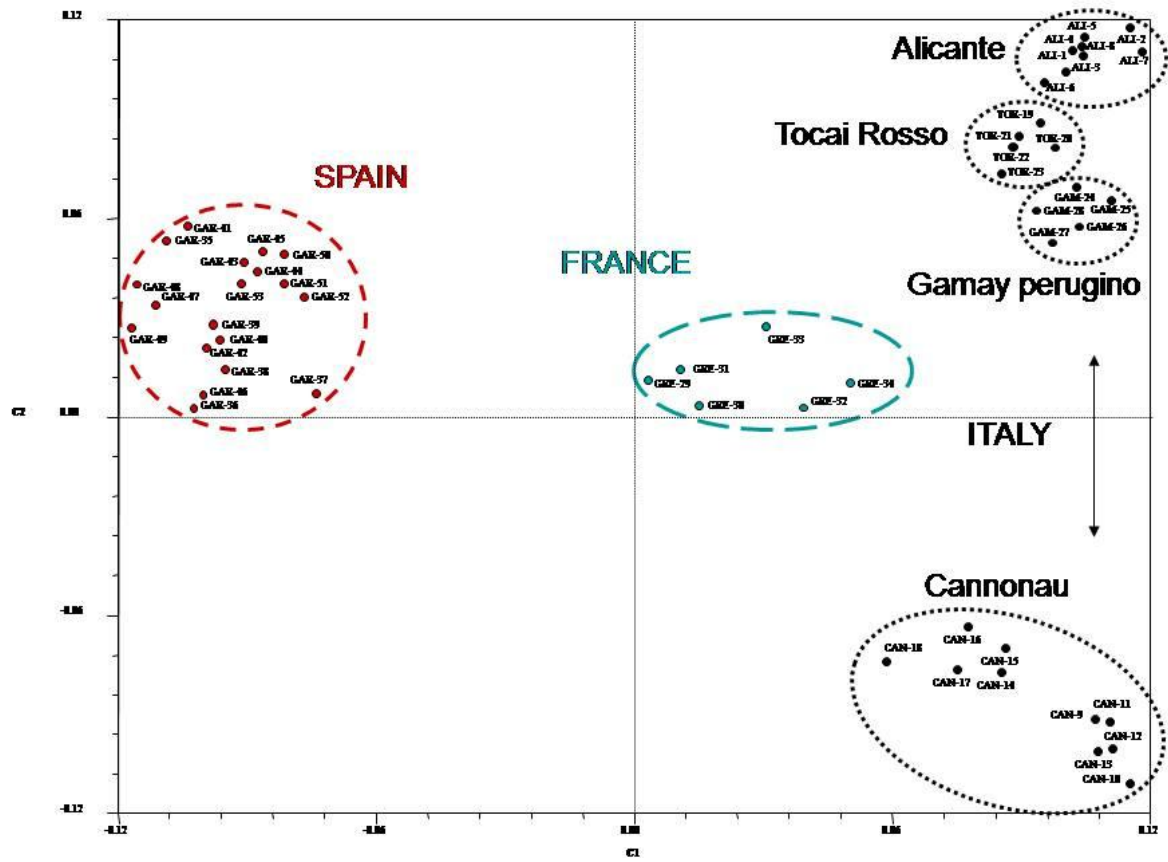


Fig. 2. Centroidi dei raggruppamenti di Garnacha, Grenache, Gamay perugino, Tocai Rosso, Alicante e Cannonau, risultati un unico vitigno [4].

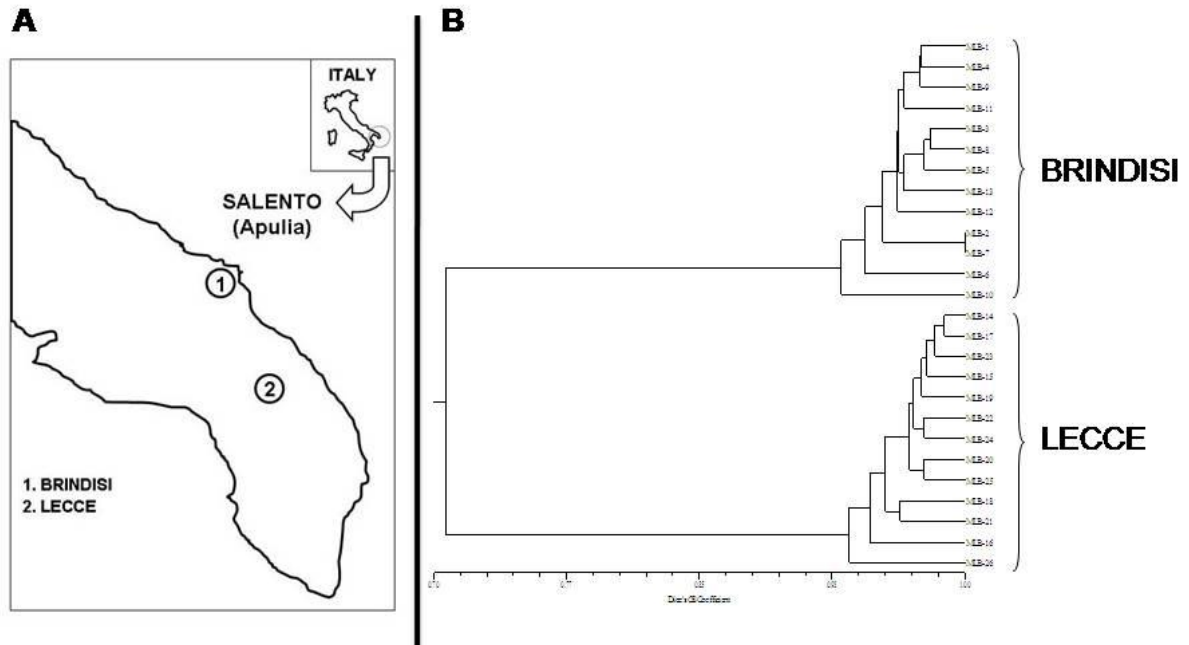


Fig. 3. A. Località di reperimento dei biotipi di Malvasia Nera. B. Dendrogramma dei loro accoppiamenti in relazione al luogo di origine [5].

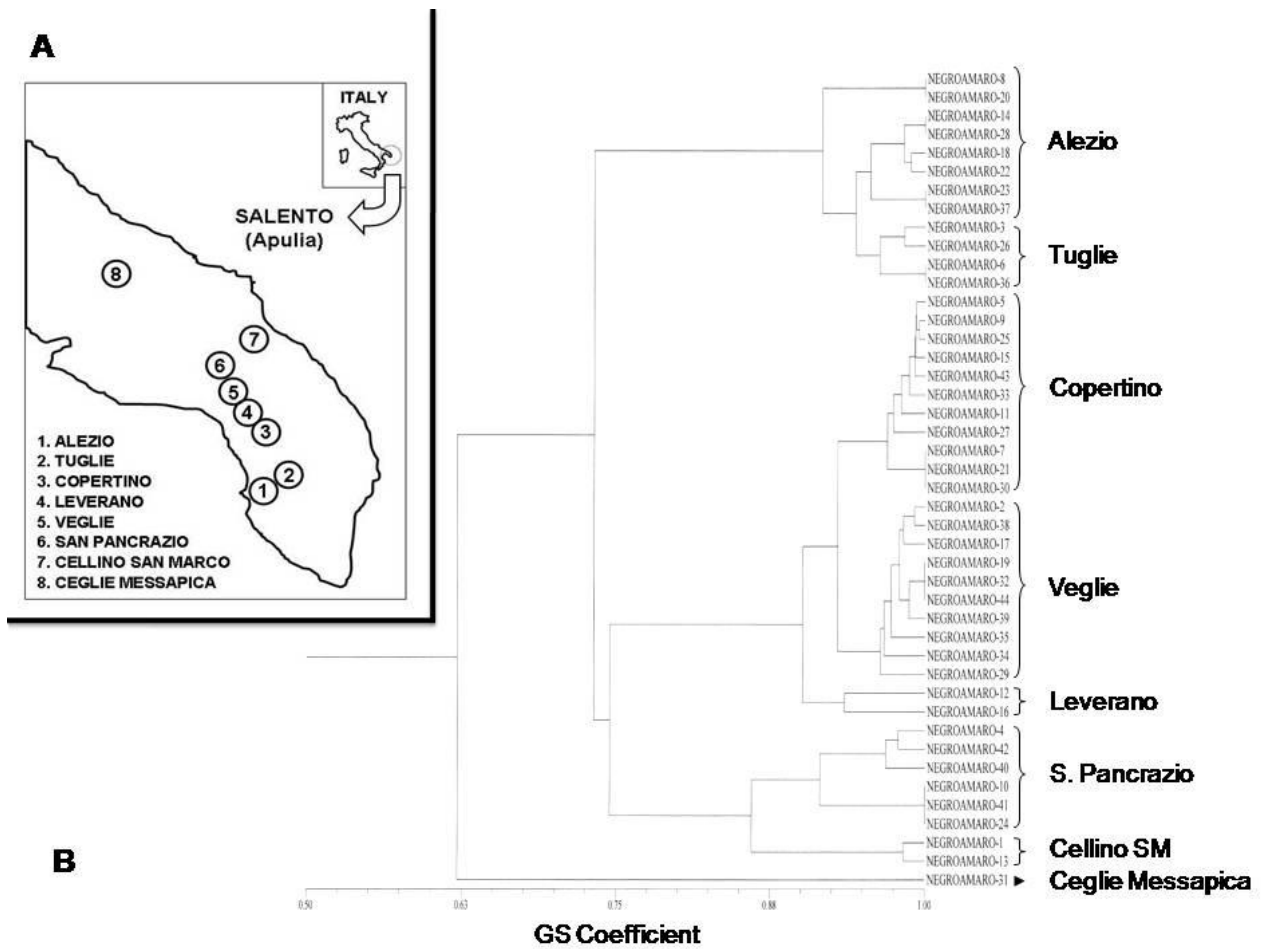
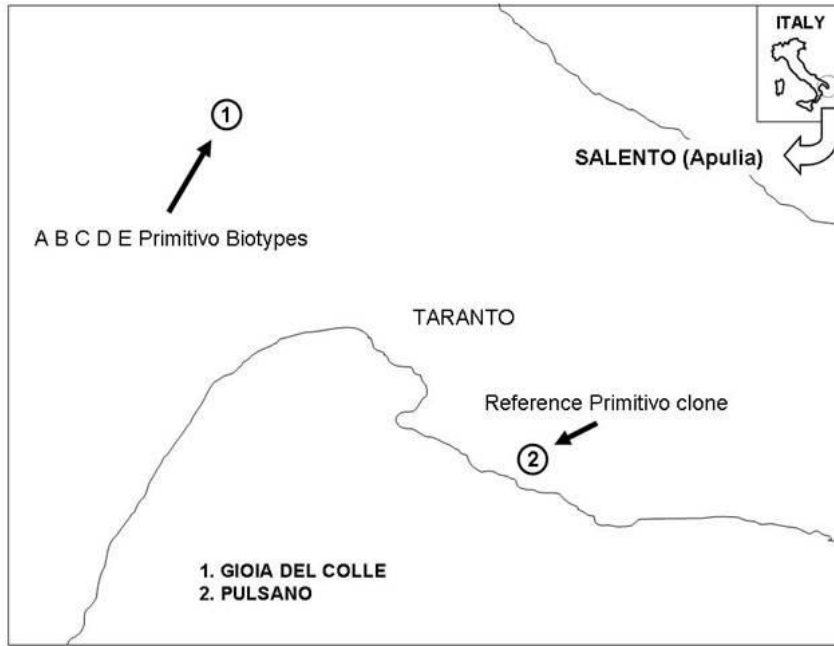
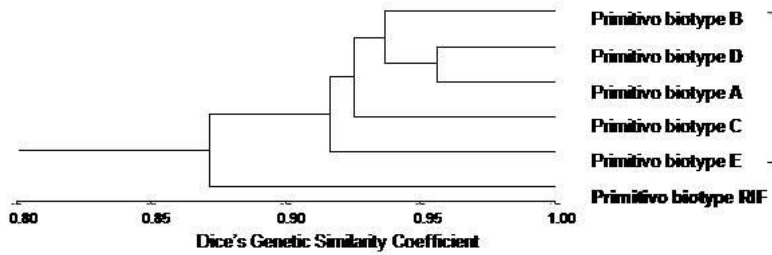


Fig. 4. A. Località di reperimento biotipi del Negroamaro. B. Dendrogramma dei loro accoppiamenti in relazione al luogo di origine [5].



A

**Mappa
delle
zone di
prelievo**



Gioia del Colle (TA)

B

Fig. 5. A. Località di reperimento dei biotipi di Primitivo. B. Dendrogramma dei loro accoppiamenti in relazione al luogo di origine [5].

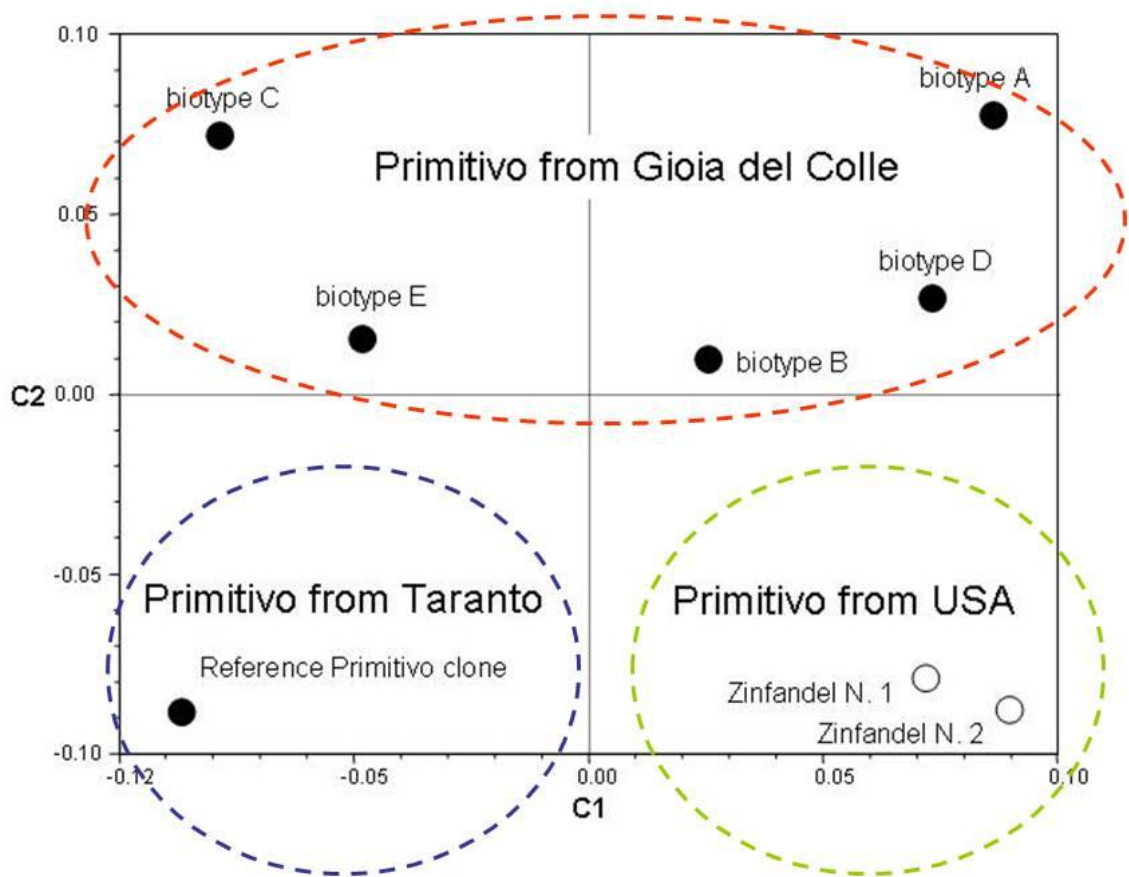


Fig. 6. Centroidi dei raggruppamenti di Primitivo in relazione alle zone di reperimento dei biotipi [5].

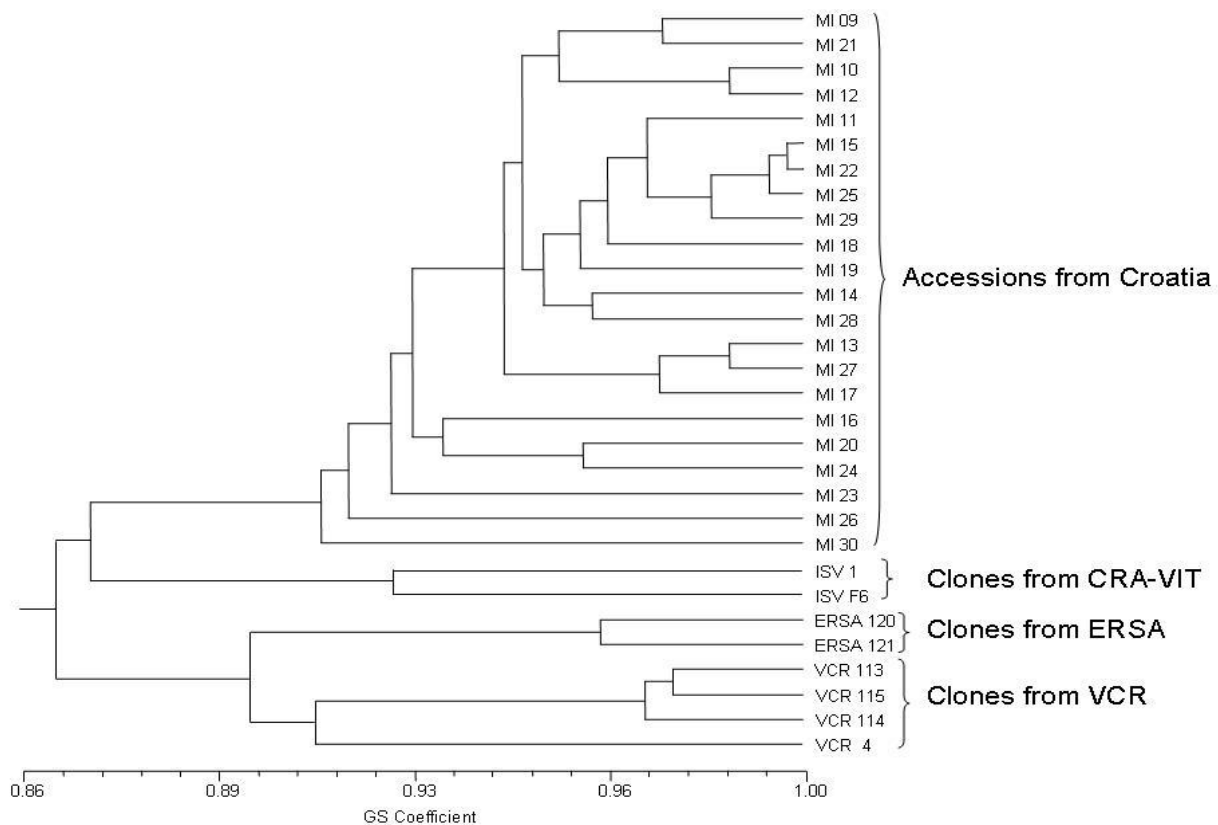


Fig. 7. Dendrogramma degli accoppiamenti dei biotipi di Malvasia Istriana in relazione al costituente [6].

Le analisi hanno messo in luce potenzialità informative che sembrano capaci di scendere progressivamente nel dettaglio della composizione genetica dei materiali: dalla varietà (SSR e AFLP) alle popolazioni locali (SAMPL; ad esempio Garnacha, Cannonau, etc), ai singoli genotipi (M-AFLP; ad esempio Negroamaro, Primitivo).

Gli esperimenti, inoltre, hanno dimostrato non solo che si possono discriminare attraverso le tecniche sopracitate cloni, biotipi e accessioni afferenti alla stessa cultivar (Malvasia istriana, Primitivo, Negroamaro, Malvasia di Lecce e Brindisi, Garnacha tinta), ma anche distinguere i genotipi di vite in funzione della zona geografica di origine (accessioni) e in conformità con le osservazioni ampelografiche (cloni, biotipi). In sostanza si è resa possibile una marcatura molecolare di diversi caratteri morfo-fisiologici in funzione della variabilità dell'ambiente di origine, anche quando non si rileva un evidente riscontro fenotipico distintivo. Infatti, accessioni anche simili morfologicamente hanno dimostrato polimorfismi molecolari capaci di differenziarle secondo un gradiente geografico dell'areale di coltivazione (Negroamaro, Malvasia di Lecce e Brindisi, Malvasia istriana, Garnacha tinta); ed anche in biotipi con caratteri fenotipici differenti

(come per esempio nei grappoli di Primitivo) le diversità attribuibili all'ambiente di coltivazione (Gioia del Colle e Pulsano (TA)) risultano più accentuate con questo tipo di analisi [7].

Tutto ciò apre certamente un'interessante via all'approfondimento scientifico per quanto concerne, per esempio, l'interazione genetica pianta-ambiente e relativi equilibri; l'azione antropica esercitata sulle varie scelte...

Dal punto di vista pratico può avere un'importante ricaduta su una migliore identificazione dei materiali di moltiplicazione della vite (con eventuale aggiornamento della legge vivaistica) e può finalmente spiegare anche con una base genetica la "tipicità territoriale", basata su una scelta identificabile e più consapevole dell'unicità dei biotipi locali.

Bibliografia

1. Tratto da libro III, 9, 1 del *De re rustica* di L. Junii Moderati Columellae edizione curata da Johann Matthias Gesner nel 1781.
2. Cretazzo E., Meneghetti S., De Andrés M.T., Frare E., Gaforio L., Cifre J. (2010): Clonal differentiation and varietal identification by means of SSR, AFLP, SAMPL and M-AFLP in order to assist the clonal selection of grapevine. The case of study of manto Negro, Callet and Moll, autochthonous cultivar of Majorca. *Annals of Applied Biology*. *Annals of Applied Biology*, 157 (2), p. 213-227.
3. Meneghetti S., *Vitis* intra varietal analysis protocol. *In litteris*.
4. Meneghetti S., Costacurta A., Frare E., Morreale G., Crespan M., Sotés V., Calò A. (2010): Clonal identification and genetic characterization of Garnacha grapevine by means of different PCR-derived marker systems. *Molec. Biotechnol.* *In press*.
5. Meneghetti S., Costacurta A., Morreale G., Calò A. (2010): Study of intra-varietal genetic variability in grapevine cultivars (Malvasia of Lecce and Brindisi, Negroamaro and Zinfandel) by PCR-based molecular markers and correlations with clones origins. *Submitted*.

6. Meneghetti S., Costacurta A., Frare E., Morreale G., Crespan M., Sotés V., Calò A. (2010): Molecular clones identification and intra-varietal genetic variability in Malvasia istriana grapevine. *Submitted*.

7. Calò A., Masi G., Tarricone L., Costacurta A., Meneghetti S., Crespan M., Carraro R. (2008): Search for Primitivo (*V. vinifera* L.) variability in Apulia. *Riv. Vitic. Enol.* 1: p. 3-13