

Accademia Italiana della Vite e del Vino

Tornata Cortina del 14 luglio 2013

“La futura vite della vite”

Il genoma della vite come base della tipicità

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

RELAZIONE

La vite è una delle piante agrarie più antiche ed è praticamente coltivata in tutto il mondo. La grande variabilità morfologica e genetica caratterizzante il genere *Vitis* è uno dei problemi principali per l'identificazione varietale e la discriminazione clonale e spesso è alla base di confusioni e ambiguità nelle analisi. Infatti la vite, in particolare quella coltivata (*Vitis vinifera* L.), presenta un enorme numero di varietà; inoltre all'interno di ognuna di queste varietà vengono distinti vari biotipi e cloni (il Sangiovese, per esempio, conte più di 100 cloni registrati nel Catalogo Nazionale delle Varietà).

Appare chiaro come i tanti ambienti anche profondamente diversi in cui la vite è presente e coltivata contribuiscono in modo rilevante ad aumentare la variabilità all'interno di questa specie. La variabilità di una varietà è superiore quando la stessa può contare su una coltivazione lunga molti secoli o su una diffusione geografica molto ampia.

Con l'avvento delle biotecnologie è stato possibile creare nuovi mezzi per poter indagare questa variabilità della vite. In particolare un grande sviluppo hanno avuto negli ultimi venti anni i marcatori molecolari per la caratterizzazione del germoplasma della vite, pur rimanendo irrinunciabile le analisi tradizionali; sappiamo, tuttavia, che le caratteristiche morfologiche possono essere a vari livelli influenzate dall'ambiente di coltivazione e quindi non rappresentano uno strumento precisissimo. Lo sviluppo di marcatori microsatelliti (SSR) ha permesso di fare una volta per tutte chiarezza sulle diverse varietà di vite: viti con lo stesso profilo microsatellite appartengono alla medesima cultivar e varietà differenti presentano alleli SSR diversi agli stessi loci.

E' stato così possibile creare i primi database molecolari per identificare le diverse varietà ma anche le diverse specie del genere *Vitis*. Il sequenziamento del genoma della vite coltivata avvenuto nel 2007 ad opera di una collaborazione Italo-francese ha posto le basi per ulteriori approfondimenti a livello molecolare, con lo sviluppo di marcatori microsatelliti a passo lungo (tri-penta nucleotidici) come riportato in Figura 1.

VITIS GENOME

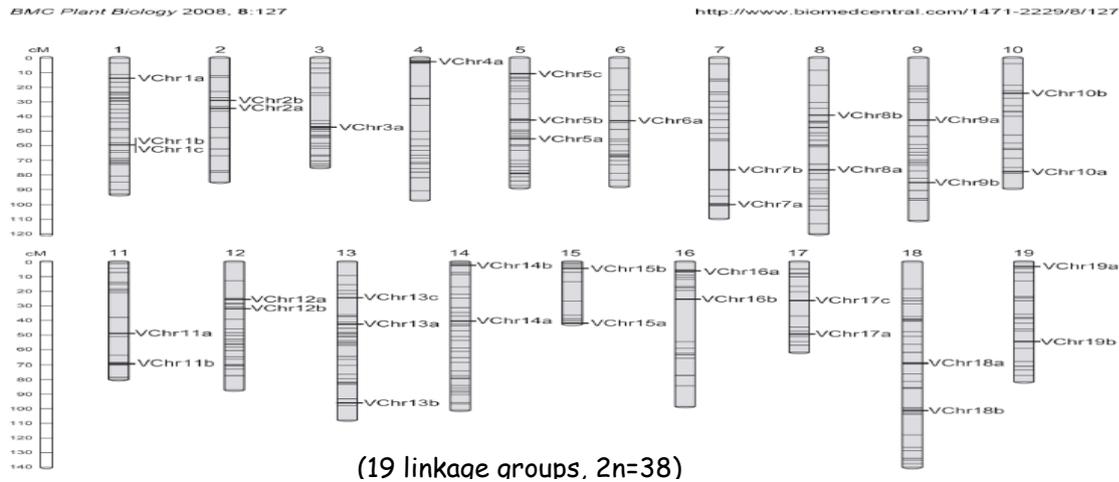


Figura 1: Rappresentazione dei 19 gruppi linkage di *Vitis vinifera* con la posizione e i nomi dei loci microsatellite a passo lungo.

E' possibile rappresentare la variabilità entro il genere *Vitis* analizzando i diversi profili SSR e costruendo un grafico cartesiano tridimensionale con le tre coordinate X, Y e Z che sottolineano la diversità o la vicinanza di tali profili microsatelliti. In tal caso punti vicini rappresentano varietà con simile profilo SSR, mentre punti lontani denotano una differenza sensibile nel profilo microsatellite tra le due cultivar in questione.

In Figura 2 ogni punto blu rappresenta una varietà di vite coltivata, in tutto circa 1500, mentre con altri colori sono riportate altre specie del genere *Vitis*.

Dal grafico in Figura 2 è possibile notare come le diverse cultivar della vite coltivata (*Vitis vinifera*, punti blu) quasi incredibilmente si dispongano in modo ordinato a formare una sfera occupandone anche tutto lo spazio interno.

Questo sottolinea la grande variabilità genetica presente nella vite coltivata anche solo soffermandoci ai polimorfismi microsatellite. Ovviamente ad ogni puntino dobbiamo poi associare i diversi cloni e biotipi di quella cultivar, che con gli SSR non sono discriminabili ma che sono ben presenti nel territorio e nei vini tipici. Inoltre in questo grafico si nota come la variabilità intra-specifica della vite coltivata (*V. vinifera*, puntini blu) sia di molto superiore alla diversità tra specie differenti di *Vitis* quali *V. Riparia*, *V. Rupestris* e *V. cinerea* (puntini rosso, giallo e verde); ne si deduce che la grande variabilità in *Vitis* è dovuta soprattutto ad una specie, *V. vinifera* appunto, la vite coltivata che infatti annovera numerosissime varietà a differenza delle altre *Vitis*.

SSR

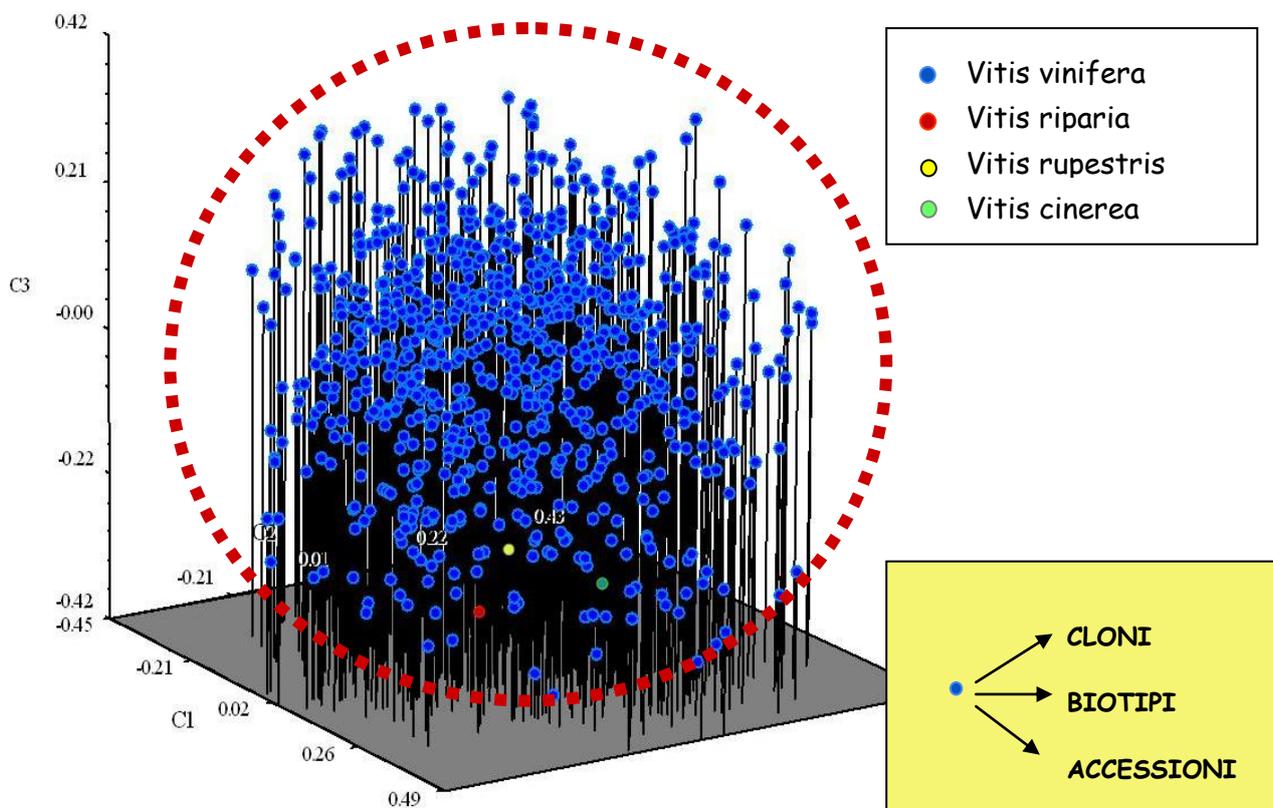


Figura 2: Rappresentazione tridimensionale della variabilità inter-varietale (in blu le cultivar di *Vitis vinifera*) e inter-specifica (colori diversi rappresentano specie diverse di *Vitis*); si nota che le diverse cultivar si dispongono a creare come una sfera occupando tutto lo spazio al suo interno, segno della grande variabilità genetica presente anche solo a livello di SSR. La variabilità intra-specifica della vite coltivata (*V. vinifera*, puntini blu) è molto superiore alla diversità tra specie diverse di *Vitis* usate nei portinnesti (*V. Riparia*, *V. Rupestris*, *V. cinerea*, puntini rosso, giallo e verde).

Per studiare la variabilità intra-varietale in *Vitis vinifera* è quindi necessario utilizzare marcatori diversi dagli SSR dell'identificazione varietale. Questa variabilità è la conseguenza di due diversi fenomeni: da una parte la presenza di diverse sotto-varietà in talune cultivar, dall'altra la variabilità clonale e dei biotipi. Inoltre tale variabilità riferita ad una cultivar specifica comprende due diversi livelli: la variabilità morfologica e la variabilità genetica. Facendo unicamente riferimento alle caratteristiche ampelografiche, ampelometriche e alle analisi chimiche sulle uve, in passato sono state fatte errate attribuzioni dei vitigni soprattutto a livello clonale. Per questo motivo le analisi condotte a livello della molecola del DNA risultano oggi essenziali per una precisa identificazione di materiali di vite e anche per indagare le differenze genetiche tra cloni e biotipi della stessa cultivar. Molti marcatori molecolari sono stati utilizzati per la differenziazione dei cloni viticoli

come gli inter-microsatelliti (I-SSR), i RAPD, gli AFLP, i SAMPL, gli SNP, gli S-SAP, gli M-AFLP, gli M-SAP fino a IRAP e REMAP e marcatori di polimorfismi cloroplastici.

In questa presentazione vengono riportati studi condotti su diverse varietà usando 5 tipologie di marcatori differenti, SSR, AFLP, SAMPL, M-AFLP e ISSR.

I microsatelliti, che si basano su polimorfismi a carico di precise regioni del genoma, sono fondamentali per confermare l'identità dei materiali studiati; le 4 categorie rimanenti di marcatori molecolari, invece, vanno ad analizzare tutto il genoma nel suo insieme permettendo di evidenziare molti più polimorfismi per singolo esperimento.

Con questo approccio molecolare è stato possibile discriminare dal punto genetico accessioni di Garnacha tinta spagnola da altre di Grenache noir francese e Cannonau italiano, tutti appartenenti alla medesima varietà (sinonimi), più precisamente quest' ultima presente come Alicante di Sicilia, Tocai rosso dei colli Vicentini, Gamay perugino del centro Italia, Cannonau della Sardegna (Figura 3). L'analisi molecolare permette non solo di discriminare tutte le accessioni dando per ognuna un profilo molecolare diverso, ma anche raggruppa tali accessioni in conformità con le diverse provenienze, non solo a livello nazionale. Infatti nomi diversi in questi materiali sottolineano provenienze diverse. In particolare appare netta la diversità dei materiali italiani con quelli francesi e spagnoli ma soprattutto nella differenziazione di 4 gruppi italiani per le 4 provenienze italiane, con l'ulteriore presenza di due sotto-gruppi per il Cannonau, uno relativo alla zona di Jerzu e l'altro alla regione più meridionale dell'isola.

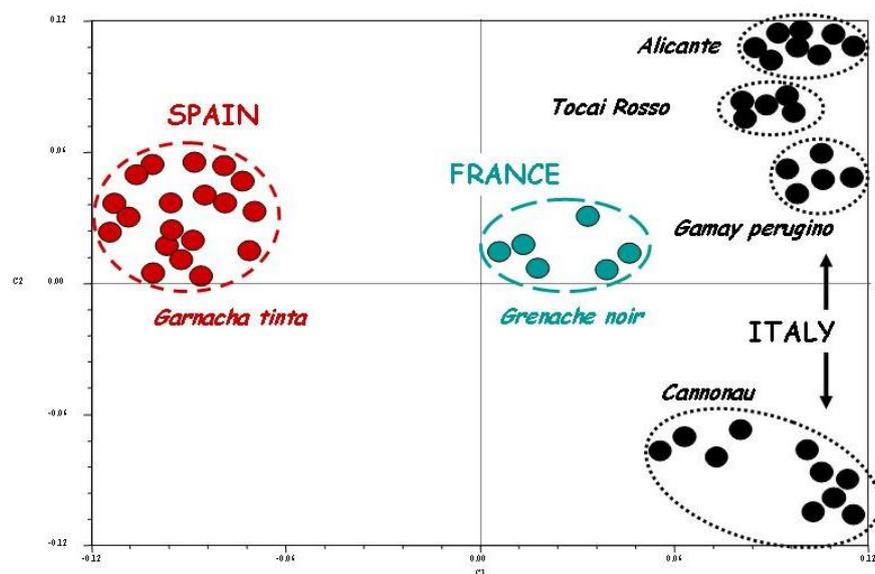


Figura 3: Centroidi su 19 accessioni di Garnacha tinta spagnola, 6 accessioni di Grenache noir francese e 28 accessioni di Cannonau italiano suddiviso in Alicante di Sicilia, Tocai rosso vicentino, Gamay perugino umbro-toscano e Cannonau sardo.

Lo stesso tipo di risultato è stato riscontrato analizzando tre cultivar pugliesi, il Negroamaro, il Primitivo e la Malvasia nera di Lecce-Brindisi. Per il Negroamaro, dove i diversi biotipi sono stati sempre propagati agamicamente all'interno di ogni azienda viticola seguendo la secolare tradizione di famiglia, è stato possibile raggruppare i materiali in gruppi in accordo con la differente origine dei materiali, evidenziando un gradiente sia longitudinale che altitudinale (Ceglie Messapica si trova in una zona più collinare rispetto alle altri paesi), come riportato in Figura 4. Anche per il Primitivo è stato possibile discriminare 5 diversi biotipi selezionati a Gioia del Colle (BA) differenziandolo molecolarmente da un clone proveniente dalla zona marittima di Pulsano (TA) e da due accessioni di Zinfandel statunitensi (Figura 5).

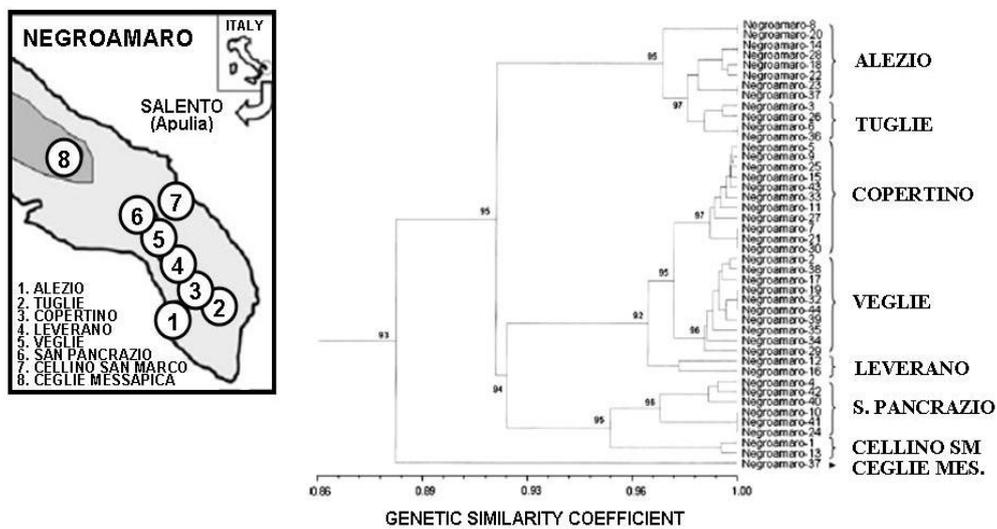


Figura 4: Dendrogramma di similarità genetica secondo il coefficiente di Dice delle accessioni di Negroamaro del Salento con a fianco la mappa delle otto provenienze geografiche.

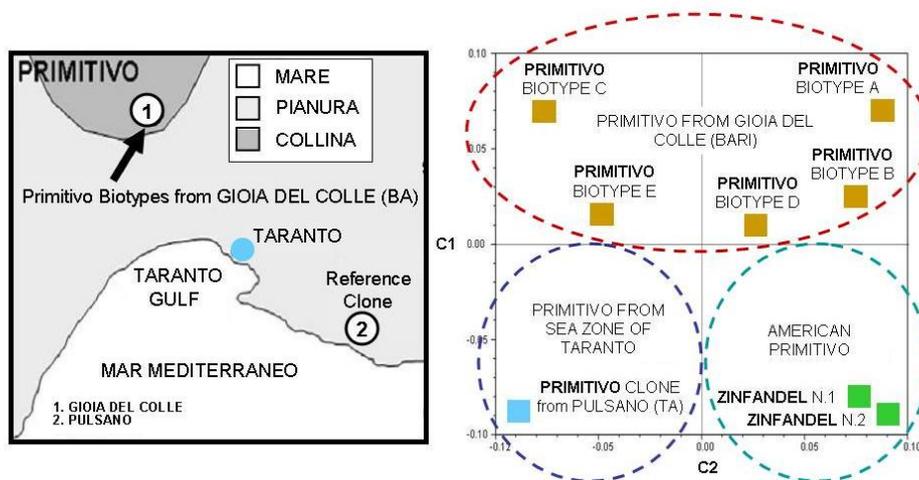


Figura 5: Centroidi relativi a 5 biotipi di Primitivo di Gioia del Colle (BA), un clone di Pulsano (TA) e due Zinfandel provenienti dagli USA, con a fianco la mappa delle provenienze italiane.

Analogo risultato è stato evidenziato dai materiali di Malvasia nera di Lecce-Brindisi con il dendrogramma di similarità genetica (non riportato) che ha discriminato i materiali provenienti dalle due province, sottolineando la correttezza delle affermazioni dei viticoltori locali che, nonostante i biotipi mostrassero lo stesso profilo molecolare SSR, hanno sempre tenuto distinte la Malvasia nera leccese da quella brindisina, selezionandole separatamente.

Altri esempi simili sono stati evidenziati nella Malvasia istriana italiana e croata, in cui è stato possibile separare i cloni italiani secondo la zona di origine del materiale di selezione originario e i biotipi croati in funzione della diversa area di origine (Figura 6). Stesso discorso per la Malvasia di Candia laziale in riferimento a biotipi con grappoli morfologicamente differenti e per tre cultivar autoctone maiorchine quali Moll, Callet e Manto Negro (figure non riportate).

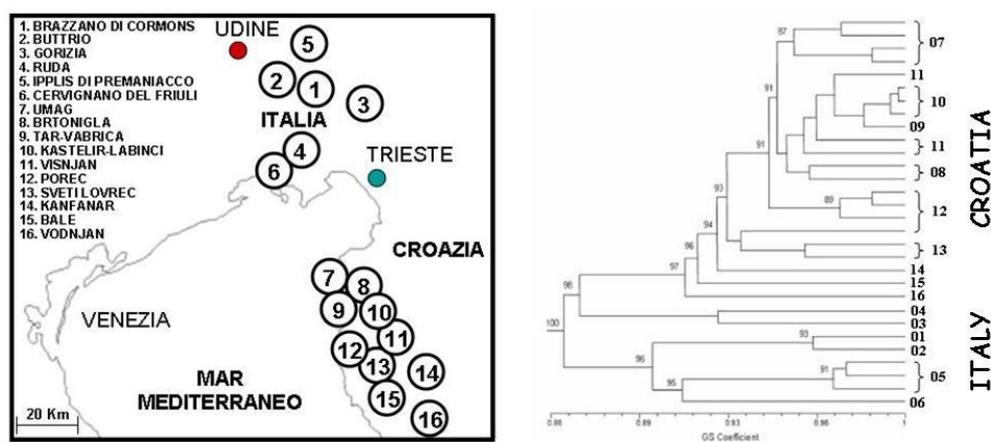


Figura 6: Dendrogramma relativo a materiali croati e italiani di Malvasia istriana in cui è possibile discriminare tutte le accessioni dal punto di vista molecolare e in particolare raggruppare geneticamente i materiali croati da quelli italiani. A sinistra è riportata la mappa geografica delle zone di reperimento con relativa numerazione.

Concludendo, la grande variabilità genetica presente in *Vitis* è dovuta principalmente ad una sola specie, la vite coltivata ovvero *Vitis vinifera*, che infatti annovera un numero di varietà nemmeno paragonabili con quelle presenti in tutto il resto delle specie afferenti a questo genere, perlopiù utilizzate a scopo ornamentale o come portinnesto ma non interessanti dal punto di vista della produzione di uva da vino o da tavola.

Le analisi molecolari condotte con i marcatori AFLP, SAMPL, M-AFLP e ISSR ha permesso per le cultivar oggetto di studio di separare i materiali in conformità con la zona geografica di origine degli stessi. In questo contesto appare quindi fondamentale sottolineare l'importanza della corretta scelta dei materiali di propagazione salvaguardando i materiali autoctoni in equilibrio con l'ambiente che infatti sono da considerarsi non solo un patrimonio dal punto di vista della salvaguardia delle risorse genetiche vegetali ma anche da quello strettamente economico visto che il comparto vitivinicolo è strettamente legato alla tipicità dei prodotti tipici legati al territorio.