

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE



B026435 - STATISTICA E GENETICA VEGETALE

MODULO: GENETICA VEGETALE E MIGLIORAMENTO GENETICO

2020/2021

STORIA DEL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE

GIULIO PETRI

7016073

Caratteristiche della Vite;

Il genere *Vitis* L. identifica 76 specie riconosciute (plantsoftheworldonline.org) di piante rampicanti che producono bacche riunite in grappoli, derivanti da un progenitore ancestrale che ha probabilmente iniziato a differenziarsi in sottogeneri e specie nell'Eocene (Galet, 1988).

La specie più diffusa e più importante da un punto di vista enologico è la vite eurasiatica (*Vitis vinifera* L.), del sottogenere *Euvitis*, che produce uva dalle notevoli caratteristiche organolettiche impiegata per la produzione di vino.

Il diritto europeo considera vino esclusivamente il prodotto ottenuto dalla fermentazione di uve provenienti da vitigni della specie *Vitis vinifera* e di alcuni incroci fra *Vitis vinifera* e altre specie (UE 1308/2013).

La *Vitis vinifera* ha un corredo cromosomico diploide costituito da 19 coppie di cromosomi ($2n = 38$) e si distingue in due sottospecie:

- *Vitis vinifera sylvestris*, che rappresenta la Vite eurasiatica spontanea, dioica e quindi allogama obbligata nella maggior parte dei casi. Sono comunque presenti nelle popolazioni naturali individui con fiori ermafroditi in quota del 2-3% circa.
- *Vitis vinifera sativa*, che rappresenta la sottospecie che comprende le varietà coltivate (vitigni), caratterizzata da fiori ermafroditi e la prevalenza dell'autogamia.

In entrambi i casi il polline è vettorato prevalentemente dal vento (impollinazione anemofila) e i fiori sono riuniti in un'infiorescenza a racemo, inserita sul nodo in posizione opposta alla foglia (Fregoni, 1998). Il sesso dei fiori è determinato da 3 alleli di uno stesso locus, per i quali la dominanza è così ordinata: Maschile > Ermafrodita > Femminile (Huglin, 1986).

Il metodo da sempre più utilizzato per la propagazione della vite consiste nello sfruttare la sua capacità di rigenerare un individuo da talee (propagazione vegetativa o agamica), o più recentemente da barbatelle innestate.

Molto studiate da un punto di vista agronomico sono anche le specie di vite asiatiche e americane, quest'ultime soprattutto per il ruolo fondamentale che hanno assunto nella viticoltura moderna per la costituzione dei portinnesti.

I vitigni esistenti al mondo sono migliaia (OIV, 2013) e sono andati ad aumentare nel corso del tempo, sia per la costituzione di nuove varietà sia per la comparsa di nuovi mutanti (Fregoni, 1998). Inoltre nonostante per le varietà di vite si parli di cloni (propagazione vegetativa) esiste una buona dose di variabilità intravarietale dovuta prevalentemente all'insorgere di mutazioni spontanee nel patrimonio genetico delle cellule meristematiche delle gemme, a cui la vite è molto soggetta. Un'altra fonte di variabilità intravarietale è la coesistenza di genotipi differenti all'interno di un vitigno, dovuti alla riproduzione per seme, frutto di autofecondazione o di incroci del genotipo capostipite con altri vitigni. Infine vanno annoverate fra le cause di variabilità anche le differenziazioni epigenetiche, che non comportano modifiche del codice genetico ma possono determinare una variazione fenotipica. In alcuni vitigni più antichi come ad esempio il *Sangiovese*, la variabilità intravarietale è tale da poter parlare di "vitigni popolazione" (materiale didattico).

Storia del miglioramento genetico della Vite;

L'essere umano ha probabilmente iniziato a coltivare la vite circa 12.000 anni fa nel momento in cui è passato dall'essere nomade a vivere in popolazioni stanziali, contestualmente ha cominciato la sua attività di selezione di piante e animali basandosi sulle proprie esigenze e sostituendosi per la prima volta alla selezione naturale.

Secondo l'ipotesi ermafrodita la comparsa della sottospecie coltivata della Vite eurasiatica (sativa) sarebbe stata veicolata dalla selezione artificiale. In particolare si ritiene possibile che i nostri antenati abbiano selezionato quei rari individui di Vite eurasiatica selvatica che presentavano fiori ermafroditi per poter avere un raccolto garantito ogni anno (lastoriaviva.it).

Il primo metodo di miglioramento genetico artificiale messo in pratica sulla vite è stato la selezione massale su base fenotipica. Questo metodo consiste nel ricercare un miglioramento dei caratteri di interesse in una popolazione selezionando gli individui migliori (selezione positiva) e/o scartando quelli peggiori (selezione negativa). I primi caratteri di pregio che l'essere umano ha cercato di selezionare erano probabilmente di tipo quantitativo, ad esempio l'abbondanza e la costanza delle rese al raccolto e un buon livello di zuccheri negli acini. Vista la capacità di propagazione vegetativa della vite perpetuare il genoma selezionato ai nuovi impianti non è stato un problema (creazione di cloni), tuttavia si trattava pur sempre di espressioni fenotipiche sulle quali aveva una forte influenza l'ambiente.

Ipotizzando una distribuzione statistica di tipo Normale per un determinato carattere quantitativo all'interno di una popolazione, con la selezione massale positiva si selezionano unicamente gli individui che si collocano alla destra della media e a una certa deviazione standard da essa (stabilita a priori), con la selezione massale negativa si scartano gli individui alla sinistra della media, sufficientemente distanti da essere ritenuti indesiderabili. In entrambi i casi si pratica una selezione direzionale che comporta uno spostamento verso destra della media, ovvero il picco di maggior frequenza della Gaussiana. Nel caso della selezione positiva si ha un "guadagno" genetico più intenso, tanto più marcato quanto più rigidi sono stati i criteri di selezione. Contestualmente si ha un depauperamento della biodiversità, anch'esso direttamente proporzionale alla rigidità della selezione (materiale didattico). La selezione di determinati caratteri da parte dei nostri antenati ha comportato con ogni probabilità la scomparsa di altri, non ritenuti importanti all'epoca ma plausibilmente interessanti oggi o in futuro.

Vista la facilità con cui è possibile creare interi vigneti di cloni per via vegetativa ben presto si è passati ad una vera e propria selezione clonale. La selezione clonale rappresenta l'individuazione e l'isolamento di ceppi di vite con caratteristiche migliori rispetto alla media del vitigno di appartenenza (materiale didattico). Questi biotipi che hanno particolare interesse da un punto di vista agronomico ed enologico sono frutto dell'insorgenza di mutazioni gemmarie, frequenti in viticoltura ma molto spesso instabili (retromutazione) (Fregoni, 1998). La selezione naturale e antropica hanno agito e continuano ad agire sulle mutazioni selezionando e conservando solo quelle favorevoli (es. Pinot grigio, Malvasia rosa).

Per la creazione di nuove varietà il metodo più comune e più a lungo usato è la riproduzione sessuata. Questa può essere praticata per autofecondazione, se i gameti appartengono allo stesso individuo o alla stessa varietà, per ibridazione intraspecifica, se i gameti appartengono a varietà diverse ma alla stessa specie, oppure per ibridazione interspecifica, se i gameti provengono da specie diverse ma interfertili. Nella sottospecie sativa l'ibridazione intraspecifica non è semplice per la presenza di fiori ermafroditi e prevalenza dell'autogamia. Si deve procedere alla demascolazione degli organi floreali della varietà scelta come madre e al loro insacchettamento per evitare la fecondazione da parte di polline indesiderato, dopo di che occorre portare il polline della varietà

scelta come padre all'interno del sacchetto. Il metodo classico consiste nell'utilizzare un pennello intinto di polline per trasferire i granuli originati dalle antere del padre sullo stigma del pistillo della madre. È difficile dire quanti vitigni siano stati anticamente ottenuti con l'ibridazione controllata, i primi dati certi disponibili ci dicono che intorno al XVII secolo con questa modalità sono state ottenute numerose varietà di uva da tavola impiegate ancora oggi, ad esempio la Perla di Csaba (Fregoni, 1998).

Fra il XVII e il XIX secolo la viticoltura si è diffusa in tutto il mondo divenendo una delle vocazioni agrarie di maggior pregio, contemporaneamente gli spostamenti del materiale di propagazione (talee, sarmenti) da una parte del mondo all'altra sono divenuti più frequenti ed abbondanti. Nel XIX sono comparse alcune gravi fitopatie che hanno messo in seria crisi la viticoltura, fra tutte la fillossera (*Daktulosphaira vitifoliae*), un insetto Rincote proveniente dagli Stati Uniti che fra il 1863 e il 1890 determinò la distruzione di una buona parte dei vigneti europei. La Fillossera causa danni nefasti all'apparato radicale della Vite eurasiatica e altri trascurabili sull'apparato aereo, al contrario sulle specie di Vite americana il danno maggiore è sull'apparato aereo mentre è limitato quello sulle radici (Ferrari – Marcon – Menta, 2006). La risposta dei vivaisti alla Fillossera fu quella di propagare in larga scala specie di Vite americana, in particolare *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri*, al fine di utilizzarle come portinnesti su cui innestare *Vitis vinifera*. Da questo momento in poi il miglioramento genetico della vite si è diviso in due categorie, il miglioramento dei portinnesti e il miglioramento clonale. Al fine di migliorarne le caratteristiche i portinnesti sono stati spesso incrociati con *Vitis vinifera* in modo da creare ibridi insensibili alle punture di Fillossera. Visto il costo in termini economici e tempistici di innestare le viti, i vivaisti hanno tentato anche di ibridare *Vitis vinifera* con specie americane per ottenere individui da mettere a dimora a "piede franco", tuttavia non sono riusciti nell'intento di ottenere piante resistenti alla Fillossera e al contempo soddisfacenti le esigenze enologiche del mercato europeo. Ancora oggi ad eccezione di piccole microaree, in Europa si utilizzano unicamente viti innestate su "piede americano". La selezione effettuata sulle specie americane permette oggi di scegliere fra decine di portinnesti da individuare in base alle caratteristiche del clima, del microclima e del suolo, mentre per quanto riguarda la scelta dei cloni le possibilità sono ancora più ampie; ad esempio prendendo in considerazione soltanto il Sangiovese si contano oltre 100 cloni omologati (Morando – Lavezzaro – Ferro – Morando, 2017).

Dalla seconda metà del Novecento sono stati condotti alcuni studi per valutare la possibilità di indurre mutazioni del corredo genetico della vite somministrando in modo controllato agenti mutageni. Si è fatto ricorso sia a mutageni fisici come le radiazioni ionizzanti che a mutageni chimici, ad esempio colchicina e metasulfonato di etile (Fregoni, 1998). Lo studio delle mutazioni indotte tuttavia non è mai stato condotto su larga scala e non ha prodotto risultati convincenti, pertanto oggi è ormai quasi completamente abbandonato (materiale didattico).

Negli anni Novanta del Novecento l'ingegneria genetica ha iniziato a interessare il mondo della viticoltura e sono stati ottenuti i primi portinnesti transgenici, sebbene gli esperimenti siano stati condotti in modo molto più cauto rispetto ad altre colture (es. soia) (Fregoni, 1998). La transgenesi consiste nel trasferimento di uno o più geni da una specie ad un'altra, questo può avvenire tramite metodi diretti (agenti fisici o chimici) o metodi indiretti (vettori batterici o virali). Nel caso della vite i geni sono trasferiti prevalentemente con *Agrobacterium tumefaciens* (nome aggiornato: *Rhizobium radiobacter*, Young et al. 2001), *Agrobacterium rhizogenes* (*Rhizobium rhizogenes*, Young et al. 2001) o tramite l'utilizzo della tecnica biolistica (metodo diretto). *A. tumefaciens* è un batterio gram negativo che agisce su diverse piante dicotiledoni trasferendo ad esse geni che codificano per enzimi responsabili della produzione di opine, dei particolari amminoacidi usati dal batterio come nutrimento. Così facendo il batterio induce la patologia nota come "tumore del colletto". *A. tumefaciens* può trasferire i geni solo in presenza di una ferita nella pianta che viene segnalata involontariamente dal vegetale tramite il rilascio di polifenoli, quest'ultimi vengono percepiti dal

batterio tramite un complesso sensoriale proteico (VirA e VirG). Il plasmide di *A. tumefaciens* è dotato di T-DNA (DNA di trasferimento) e viene tagliato in un frammento di 25 paia di basi dalla proteina VirD2 che lo guida all'interno della cellula vegetale sfruttando un canale di collegamento anch'esso di natura proteica. Il T-DNA arriva quindi in prossimità del nucleo vegetale e riesce ad entrare in esso dal poro nucleare coadiuvato da proteine traghettatrici dette carioferine (materiale didattico). La cellula dell'ospite integra quindi il T-DNA batterico nel proprio DNA e lo trasferisce alle cellule figlie e quindi alle piante derivate. *Bacterium rhizogenes* agisce in modo simile con il T-DNA ma anziché provocare un tumore causa una radicazione anomala della pianta (Fregoni, 1998). La tecnica biolistica è un metodo fisico diretto consistente nello sparare microproiettili di oro o tungsteno ricoperti di DNA contenente il gene di interesse all'interno della cellula da modificare (materiale didattico).

All'inizio del XXI secolo la ricerca per la costituzione di piante geneticamente modificate ha subito una frenata a causa delle problematiche riguardanti la bioetica e la negativa opinione pubblica europea riguardo gli OGM, che hanno portato all'emanazione di normative limitanti in Europa (18/2001/CE) e in particolare in Italia (es. "Decreto Amato", 2000).

Nel 2002 i ricercatori dei principali paesi viticoli hanno promosso l'International Grape Genome Program (IGGP) con l'obiettivo di non sovrapporre gli sforzi della ricerca e favorire lo scambio di informazioni per comprendere le basi genetiche e molecolari della specie coltivata (materiale didattico).

Il 26/08/2007 è stato sequenziato per la prima volta l'intero genoma di *Vitis vinifera*, un risultato importante per lo studio dell'origine della specie e del miglioramento genetico (Nature, 2007).

Successivamente per lo studio dei geni alla base dei caratteri di interesse sono state generate mappe genetiche in cui sono stati localizzati i primi QTL (Quantitative Trait Loci). I QTL sono i loci che contengono i geni associati a caratteri quantitativi (caratteri misurabili e poligenici), per i quali è difficile effettuare miglioramento genetico efficiente sfruttando i metodi classici. L'individuazione dei QTL è fondamentale perché apre la strada alla selezione assistita da marcatori (MAS – Marker Assisted Selection). L'obiettivo è quello di trovare un'associazione fra un marcatore genetico e un fenotipo che si può misurare e quantificare. Un marcatore è un pezzo di DNA strettamente associato a un QTL, tanto più valido quanto più forte è questa associazione (vicinanza). Se il crossing over non è in grado di spezzare l'associazione marcatore-QTL, allora questi saranno ereditati insieme. Poiché il QTL è sede di geni associati a caratteri quantitativi, corrisponde alla sua presenza nel genoma la manifestazione di un certo fenotipo. Per eseguire un mappaggio QTL in specie prevalentemente autogame si usano generazioni F2 o RIL (linee inbreed ricombinanti), caratterizzate con marcatore molecolare e "fenotipizzate" (provate in diversi ambienti) per il carattere di interesse. Tramite analisi statistica (es. t test) si determina se la presenza del marcatore nelle generazioni è associata ad una più alta media del carattere quantitativo di interesse rispetto alle generazioni in cui il marcatore è assente (materiale didattico). Una volta effettuato il mappaggio QTL si può selezionare un fenotipo sulla base di un marcatore molecolare (MAS), con risparmio di tempo, risorse e lavoro rispetto ai metodi classici. Diversamente dalla transgenesi, la MAS non consiste nell'inserimento di geni in una specie che non li possiede ma nello sfruttare la variabilità intraspecifica naturalmente presente in modo efficiente.

Negli ultimi anni la ricerca sulla vite si è rivolta molto verso la cisgenetica, che consiste nel trasferimento di uno o più geni fra piante appartenenti alla stessa specie. Un trasferimento di questo tipo potrebbe quindi avvenire anche con la semplice ibridazione, tuttavia con la cisgenetica è possibile trasferire solo e soltanto i geni di interesse. Per esempio sarebbe teoricamente possibile trasferire il gene della resistenza all'Oidio (*Oidium tuckeri*) dalla *Vitis rotundifolia* alla *Vitis vinifera*, senza intaccare in alcun modo le caratteristiche del vitigno europeo scelto come ricevente.

L'ultimo traguardo della ricerca sul DNA è rappresentato dal "genome editing", categoria con cui si raggruppano tutte le nuove tecniche di ingegneria genetica con cui è possibile inserire miratamente dei geni in una determinata posizione del genoma, senza coinvolgere DNA estraneo. In questo modo si possono originare artificialmente individui che la natura potrebbe potenzialmente originare da sola in futuro (Berger – Letschka – Raifer – Oberhuber, 2018). Sebbene non vi sia il coinvolgimento di DNA esogeno gli organismi ottenuti da Genome Editing sono stati equiparati agli OGM dalla sentenza del 25/07/2018 della Corte di Giustizia dell'Unione Europea, pertanto devono anch'essi sottostare alle medesime normative.

Nonostante i progressi tecnologici dell'ultimo secolo il metodo più utilizzato per il miglioramento genetico della vite è ancora oggi la selezione clonale, questa è stata normata in Italia e in Europa a partire dalla fine degli anni Sessanta e deve seguire degli step specifici volti a garantire la sicurezza del materiale di propagazione. Fino a non molti anni fa la selezione clonale veniva eseguita mediante una strategia definita di "Pressione selettiva forte", consistente nell'individuare un numero estremamente ristretto di individui con un altissimo tasso di caratteri ritenuti positivi. Questa strategia ha portato alla selezione di "super cloni" che rappresentano solo una piccola parte della variabilità genetica disponibile, scarsamente adattabili a condizioni e esigenze diverse rispetto a quelle per cui sono stati selezionati. Per evitare il depauperamento della variabilità genetica e aumentare la capacità di adattamento dei vitigni a cambiamenti delle condizioni pedoclimatiche e del mercato del vino, oggi si opta per protocolli di selezione clonale che adottano una strategia di "Pressione selettiva debole", basata sulla individuazione e conservazione di gruppi di cloni e non più singoli individui, che complessivamente apportino un miglioramento rispetto alla popolazione di partenza. Questi individui presi singolarmente non necessariamente hanno caratteristiche superiori alla media della popolazione di partenza ma esprimono risultati migliori se valutati in gruppo, poiché ciascun selezionato non deve avere tutti i possibili caratteri favorevoli desiderati (materiale didattico).

È attualmente in vigore per la selezione clonale il DM del 24/06/2008 che prevede 3 diversi protocolli di selezione per uve da vino, da tavola e per i portinnesti. In ogni caso è prevista una stringente selezione sanitaria da attuare parallelamente alla selezione clonale con lo scopo di eliminare agenti patogeni.

Per le uve da vino è necessario prima di arrivare all'omologazione del clone derivante dalla piante selezionate, impiantare vigneti di confronto e rilevare i caratteri viticoli generali (epoche fenologiche, peso/dimensioni grappoli, produttività, fertilità gemme, caratteristiche campioni di mosto ecc...) e effettuare delle micro-vinificazioni di prova per almeno due anni a partire dal quarto anno di età del vigneto.

31/03/2021

BIBLIOGRAFIA

- Berger J., Letschka T., Raifer B., Oberhuber M., *Metodi innovativi di miglioramento genetico per la viticoltura altoatesina*, Frutta e Vite 4/2018.
- Ferrari M., Marcon E., Menta E., *Fitopatologia, entomologia agraria e biologia applicata*, Milano, Edagricole, 2006.
- Fregoni M., *Viticultura di qualità*, Piacenza, Stampa Grafiche Lama, 1998.
- Galet P., *Cepages et vignobles de France – Tome II – Les vignes americaines*, Montpellier, Dehan, 1988.
- Huglin P., *Biologie et ecologie de la vigne*, Parigi, Payotte Lausanne, 1986
- Morando A., Lavezzaro S., Ferro S., Morando D., *Vigna in Tasca 3.0*, Calosso (AT), Vit.En., 2017
- Materiale didattico: slides GENETICA VEGETALE E MIGLIORAMENTO GENETICO 2020/2021 2020-2021 e estratti libri collana Coltura e Cultura.

SITOGRAFIA

[oiv-world-vitivinicultural-statistics-2013-2014-en.pdf](#) :

<https://www.oiv.int/public/medias/6292/oiv-world-vitivinicultural-statistics-2013-2014-en.pdf>

[Storia della vite e del vino dalla Preistoria a Roma | La Storia Viva archeologia, rievocazione, divulgazione, eventi](#) :

[https://lastoriaviva.it/storia-della-vite-e-del-vino-dalla-preistoria-a-roma/#:~:text=L%27ipotesi%20ermafrodita&text=La%20caratteristica%20in%20cui%20la,\)%20o%20pistillati%20\(femminili\).](https://lastoriaviva.it/storia-della-vite-e-del-vino-dalla-preistoria-a-roma/#:~:text=L%27ipotesi%20ermafrodita&text=La%20caratteristica%20in%20cui%20la,)%20o%20pistillati%20(femminili).)

[The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla | Nature](#) :

<https://www.nature.com/articles/nature06148>

[Vitis L. | Plants of the World Online | Kew Science](#) :

<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325876-2>