

## IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE -PER LA RESISTENZA ALLE MALATTIE E LA QUALITÀ DEI MOSTI

Raffaele Testolin

Dipartimento di Scienze agrarie e ambientali, Università di Udine  
Istituto di Genomica Applicata (IGA), c/o Parco Scientifico e Tecnologico 'Luigi Danieli',  
Udine

A 200 anni dalla nascita di Charles Darwin (1809-1882), vale la pena di ricordare quanto diceva il padre della teoria dell'evoluzione a proposito degli organismi viventi e cioè che questi accumulano nel tempo mutazioni su cui opera la selezione naturale, favorendo la sopravvivenza degli individui 'più adatti'. La vite non fa eccezione e come altre specie è soggetta in natura ad una pressione selettiva naturale, legata all'evolversi dell'ambiente climatico e biologico che la circonda.

L'uomo tende a selezionare genotipi con caratteristiche superiori e a mantenerli in coltivazione quanto più a lungo possibile, soprattutto quando la moltiplicazione vegetativa - è il caso della vite - permette di superare il problema dell'eterozigosi. Il mantenere il coltura per tempi lunghi gli stessi genotipi crea tradizioni di grande interesse storico e culturale, ma dal punto di vista biologico impedisce a quei genotipi di riprodursi, di evolvere e di adattarsi alle mutate condizioni di vita.

Nel secolo appena concluso, la necessità di difendere le colture da parassiti e patogeni ha favorito lo sviluppo della chimica di sintesi al punto che attualmente nel mondo si stima vengano impiegati circa 10 milioni di tonnellate di presidi fitosanitari in agricoltura.

La situazione è considerata da tempo insostenibile e a partire dalla seconda metà del secolo scorso, per molte specie sono iniziati programmi di *breeding* miranti a introdurre nelle varietà coltivate resistenze a vari patogeni e parassiti, con l'intento di ridurre la pressione sull'ambiente e sulla salute umana dei pesticidi. La vite è forse l'unica specie agricola sulla quale il miglioramento genetico ha operato poco. I risultati sono che attualmente nell'Unione europea, la difesa della vite richiede il 65% di tutti i fungicidi impiegati in agricoltura, a fronte di una superficie investita a vite che rappresenta appena il 3,3 % della superficie agricola complessiva (Eurostat report 2007).

A dire il vero , alcuni programmi di *breeding* miranti ad introdurre resistenze alle tre malattie introdotte dalle Americhe nell'800 (peronospora, oidio e fillossera) sono attivi da oltre 100 anni in alcuni Paesi europei, USA e Canada. I risultati ottenuti finora sono interessanti per quanto riguarda alcune resistenze (Fisher et al 2004), ma meno interessanti per quanto riguarda la qualità dei mosti, a causa dell'elevata eterozigosi del genoma della vite e della conseguente imprevedibilità dei risultati degli incroci (Bavaresco 1990).

Le informazioni acquisite con i progetti di sequenziamento del genoma della vite appena conclusi (Jaillon et al 2007, Velasco et al 2007) sembrano aprire anche per la vite le nuove frontiere della selezione assistita da marcatori molecolari, che promettono di arrivare con poche generazioni di incrocio a risultati più interessanti di quelli ottenuti con le tecniche di selezione tradizionale usate per tutto il secolo scorso.

I risultati più interessanti si hanno per ora sul fronte delle resistenze. Sono stati identificati, mappati e, in alcuni casi, clonati tre geni/QTL di resistenza a peronospora, 2 geni e 4 QTL di resistenza a oidio, 1 gene di resistenza a *Xylella fastidiosa*, 1 QTL di resistenza a fillossera e 1 gene di resistenza a nematodi del genere *Xiphinema* (Testolin et al 2008). Sono già in atto programmi di piramidizzazione di alcune di queste resistenze, che permetteranno di rendere le stesse più durature nel tempo e i marcatori molecolari associati

Formattato: Centrato

Formattato: Tipo di carattere: Times  
New Roman

Formattato: Tipo di carattere: Times  
New Roman, Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Times  
New Roman

a tali resistenze sono già impiegati per la selezione precoce dei semenzali (Testolin et al 2008).

Per quanto riguarda la qualità dei mosti, il discorso è più complesso perché la qualità dei mosti è il prodotto di centinaia di composti che, in relazione con l'ambiente pedoclimatico, contribuiscono a creare quei binomi vitigno-*terroir*, che hanno fatto grandi alcune viticolture e dai quali non siamo disposti a staccarci se non con una giustificata apprensione.

Anche in questo caso i metodi di selezione stanno facendo rapidamente dei passi in avanti. Consideriamo, ad esempio alcune classi di composti, come gli antociani e i composti volatili.

A differenza di altre specie, in cui gli antociani sono sintetizzati con *pathway* biochimici relativamente semplici, la vite nel corso della sua evoluzione ha subito una esplosione della famiglia delle flavonoide idrossilasi, in particolare le F3'5'H, cioè quelle che convogliano la sintesi verso gli antociani che danno il colore più scuro al vino (delfinidine, malvidine, petunidine). In vite sono state identificate ben 16 copie diverse di questo gene, grazie al recente sequenziamento del genoma. Molte di queste hanno funzioni specializzate in relazione all'evoluzione della maturazione della bacca e delle caratteristiche climatiche (luce, temperature, stress idrico) (Falginella et al 2010). La conoscenza di queste isoforme permette una selezione mirata negli incroci, in funzione del tipo di antociani che si vogliono nel vino.

Un altro argomento affascinante è dato dai composti volatili, che contribuiscono all'aroma dei vini. Questi composti si trovano nell'uva, nel mosto e nel vino a concentrazioni molto basse e questo rende difficile il loro rilevamento con strumenti tradizionali; inoltre, questi composti sono spesso legati ad altri composti (zuccheri, amminoacidi) e ciò complica la loro estrazione dalla matrice in cui si trovano. Lo sviluppo di nuove tecniche di estrazione come la 'Solid Phase Micro Extraction' (SPME) e la 'Stir Bar Sorptive Extraction' (SBSE) così come l'introduzione di strumenti più sensibili come i gas cromatografi accoppiati a spettrometri di massa di nuova generazione hanno permesso di sviluppare metodiche adatte ad analizzare queste matrici complesse, estraendo informazioni su molti composti, in parte non ancora noti. I composti che si ottengono con un'unica estrazione e un'unica analisi sono dell'ordine di un centinaio o poco più, ma si prevede nel giro di qualche anno di arrivare a molte centinaia di composti analizzabili in una singola corsa.

Identificati i composti con metodi di determinazione rapida si aprono due strade: la prima riguarda la selezione degli incroci sulla base dei loro profili aromatici; la seconda, ancor più ambiziosa, riguarda lo studio del controllo genetico di questi composti e la selezione assistita da marcatori molecolari. In altre parole, conoscendo i determinanti genetici di una serie di composti chiave del profilo aromatico, è possibile attraverso marcatori molecolari, associati ai geni che controllano la sintesi di quei composti, operare una prima selezione precoce sui semenzali senza attendere la maturazione sessuale delle piante e la produzione di uva (Di Gasparo e Cattonaro 2009).

Abbiamo citato due esempi di selezione assistita per due componenti importanti della qualità dei vini, il profilo antocianico e il profilo aromatico. Gli esempi potrebbero continuare, parlando di classi particolari di aromi, come i terpeni o le metossipirazine, per le quali l'identificazione dei determinanti genetici è in fase avanzata (Mattivi et al 2008).

Per concludere, vorremmo sottolineare che la vite, che non ha goduto in passato grande attenzione da parte dei genetisti, sta vivendo un periodo di grande euforia scientifica, grazie al progetto di sequenziamento del genoma. Si stanno gettando le basi per un nuovo approccio alla selezione, basata non solo sul fenotipo (valutazioni agronomiche, analisi chimiche, microvinificazioni) ma basata innanzitutto sul genotipo, cioè su tutte quelle

informazioni sui geni e i fattori genetici che controllano la loro espressione, che derivano dal progetto di sequenziamento e di annotazione del genoma della vite.

Non è un percorso facile e il lavoro svolto finora è solo una parte molto piccola di quello che è possibile fare con i mezzi e le conoscenze a disposizione attualmente e con quelli che la comunità scientifica metterà a disposizione nei prossimi anni.

Formattato: Centrato

## GRAPE BREEDING FOR THE RESISTANCE TO DISEASES AND THE QUALITY OF MUSTS

*Raffaele Testolin*

*Department of Agriculture and Environmental Sciences, University of Udine  
Institute of Applied Genomics (IGA), Scientific & Technological Park 'Luigi Danieli',  
Udine*

**Formattato:** Tipo di carattere: Times New Roman

**Formattato:** Tipo di carattere: Times New Roman, Corsivo

**Formattato:** Tipo di carattere: Times New Roman

Two hundred years after the birth of Charles Darwin (1809-1882), it is worth remembering what the father of the evolution theory said about the living organisms, that is they accumulate over time mutations on which the natural selection operates by favouring the survival of the 'best adapted' individuals. Grapevine does not make exception and, like other species in nature, is subject to natural selection pressure, related to changing climate and biological environment that surrounds it.

The man tends to select genotypes with superior features and keep them growing for as long as possible, especially when the vegetative propagation - it is the case of the grapevine - helps overcoming the heterozygosity problem. Growing the same genotypes for long periods creates traditions of great historical and cultural interest, but from the biological point of view it will prevent those genotypes from reproducing, evolving and adapting to the changing conditions of life.

In the past century, the need to protect crops from pests and pathogens has prompted the development of synthetic chemistry so that nowadays about 10 metric tons of phytosanitary products are used in agriculture each year.

The situation has long been regarded as unsustainable and since the second half of the last century, breeding programs for introducing resistances to different pathogens and parasites have been initiated in many species, with the intent to reduce the pressure on the environment and human health caused by pesticides. Grapevine is one of the crops that has received less attention by plant breeders. As a result, grape protection within the European Union requires 65% of all fungicides used in agriculture, compared with an area occupied by grape that reach only 3.3% of total arable land (Eurostat report 2007).

Indeed, several breeding programs aimed at introducing resistance to the three diseases introduced from the Americas in the '80s (downy mildew, powdery mildew and *Phylloxera*) have been active over 100 years in some European countries, USA and Canada. Results achieved so far are interesting with regard to resistance (Fisher et al 2004), but less interesting as far as the quality of must is concerned, due to high heterozygosity of the grape genome and the consequent unpredictability of the results of cross breeding (Bavaresco 1990).

The information gained from grape genome sequencing projects just completed (Jaillon et al 2007, Velasco et al 2007) seem to open also for grape the new frontiers of the marker assisted selection, which promises to get in few cross generations more interesting results than those obtained by traditional breeding techniques used throughout the whole last century.

The most interesting results achieved right now deal with the resistance to pests and diseases. Three genes/QTL of resistance to downy mildew, two genes and four QTLs of resistance to powdery mildew, one gene of resistance to *Xylella fastidiosa*, one QTL of resistance to *Phylloxera*, and one gene of resistance to nematodes of the genus *Xiphinema* have been identified, mapped, and in some cases cloned so far (Testolin et al 2008). There are already programs aiming to pyramidize some of these resistances, that will make them

more durable over time and the molecular markers associated with those resistances are already routinely used for the early selection of seedlings (Testolin et al 2008).

Regarding the quality of musts, the story is more complex as the quality of must is the product of hundreds of compounds that, in connection with soil and climate, contribute to create those cultivar-*terroir* combinations, which have made great several viticultures and from which we are not willing to break away unless with a justified concern.

Even in this case, selection methods are making rapid steps forward. Consider, for example, some classes of compounds such as anthocyanins and volatile compounds.

Unlike other species, in which anthocyanins are synthesized by relatively simple biochemical pathways, the grape in the course of its evolution has experienced an expansion of the family of flavonoid hydroxylases, particularly F3'5'H, those ones that convey the synthesis towards the anthocyanins that give the darkest colours to the wine (delphinidins, malvidins, and petunidins). As many as 16 different copies of this gene have been identified in grape, thanks to the recent sequencing of the genome. Many of them have specialized functions in relation to the evolution of berry ripening and climatic characteristics (light, temperature, and water stress) (Falginella et al 2010). The knowledge of these isoforms allows for a targeted selection of seedlings, depending on the type of anthocyanins desired in wine.

Another fascinating topic is represented by the volatile compounds that contribute to wine aroma. Such compounds are found in berry, must and wine at very low concentrations and this makes it difficult to detect them with traditional instruments; moreover, these compounds are often bound to or interacting with other compounds (sugars, amino acids) and this make more tricky their extraction from the matrix where they are. The development of new extraction techniques such as 'Solid Phase Micro Extraction' (SPME) and 'Stir Bar Sorptive Extraction' (SBSE), as well as the introduction of more sensitive instruments like gas chromatographs coupled with new generation mass spectrometers allowed to develop suitable methods to analyze those complex matrices, extracting information on many compounds, some of which not yet known.

With current technologies, a few hundreds of compounds can be simultaneously extracted and analysed, but we could foresee that thousands of compounds can be analyzed in a single run within a few years, following a further refinement of instruments and the underlying chemistry. Once the compounds have been identified with such rapid analytical methods, two roads open: the first one deals with the selection of seedlings on the base of their aromatic profiles; the second one, even more ambitious, regards the study of the genetic control of those compounds and the molecular marker assisted breeding. In other words, knowing the genetic determinants of a number of key compounds of the flavour profile, an early selection of seedlings can be carried out by means of molecular markers associated to genes that control the synthesis of those compounds, without waiting for sexual maturity of plants and the production of grape clusters (Di Gaspero e Cattonaro 2009).

We cited two examples of assisted selection for two important components of wine quality, the anthocyanins and the aroma compounds. Another few cases are more focused on classes of flavour compounds that are already well characterised at the chemical level, such as terpenes or methoxypyrazines, for which the identification of genetic determinants is well advanced (Mattivi et al 2008).

To conclude we would like to point out that the vine, which did not enjoy great attention in the past by geneticists, is experiencing a period of great scientific excitement, thanks to the grape genome sequencing projects. We are paving the way for a new approach to the selection, based not only on the phenotype (agronomic evaluation, chemical analyses, microvinification), but first of all on the genotype, that is all information on genes and

genetic factors that control their expression, which come out from the project of sequencing and annotation of the grape genome.

It is not an easy task and the work done so far is only a very small part of what is possible to achieve with the resources and the knowledge currently available and those that the scientific community will make available in future years.