

## CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI UNA DELLE PIU' GRANDI COLLEZIONI DI PORTINNESTI DELLA VITE (NON-VINIFERA) DELL'UNIVERSITA' DI MILANO

**Gabriella De Lorenzis<sup>1\*</sup>, Daniele Migliaro<sup>2</sup>, Davide Bianchi<sup>1</sup>, Giovambattista Simone Di Lorenzo<sup>1</sup>, Barbara De Nardi<sup>2</sup>, Massimo Gardiman<sup>2</sup>, Osvaldo Failla<sup>1</sup>, Lucio Brancadoro<sup>1</sup>, Manna Crespan<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, Milano, Italy

<sup>2</sup> CREA – Centro di Ricerca per la Viticoltura ed l'Enologia, Conegliano, Italy

\* Autori corrispondenti: [gabriella.delorenzis@unimi.it](mailto:gabriella.delorenzis@unimi.it); [manna.crespan@crea.gov.it](mailto:manna.crespan@crea.gov.it)



Ricerca presentata all'Enoforum Web Conference.  
Tutti i video e gli articoli del congresso sono  
disponibili su [www.infowine.com](http://www.infowine.com)



### **Il germoplasma delle specie di non-vinifera: questo sconosciuto!**

A partire dalla fine dell'Ottocento, la vite è coltivata su portinnesti, rappresentati da un mix di viti non appartenenti alla *Vitis vinifera*, quali *Vitis berlanderi*, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* e ibridi di queste e di altre specie di *Vitis* spp. In primis, i portinnesti difendono la vite dagli attacchi letali della fillossera alle radici, inoltre contribuiscono a fronteggiare diverse condizioni ambientali (es. siccità e salinità) (Galet, 1998; Whiting, 2005). Attualmente nel mondo si utilizzano prevalentemente solo una decina di varietà di portinnesti (Keller, 2010), un numero davvero limitato. Inoltre, questi genotipi, rilasciati alla fine del 19° secolo, sembrano inadeguati a far fronte alle sfide emergenti per la viticoltura legate ai cambiamenti climatici (Huglin e Schneider, 1998).

Dal 1985, il gruppo di ricerca del DiSAA (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali) operante presso l'Università degli Studi di Milano (UNIMI) si sta occupando della selezione di nuovi portinnesti di vite. A questo scopo, sono stati già selezionati quattro portinnesti della serie M (M1, M2, M3 e M4) che nel 2014 sono stati iscritti al Registro Nazionale delle varietà di vite. Questi portinnesti hanno manifestato tolleranza a disponibilità di ferro limitata (M1 > M3) (Porro et al., 2013; Vannozzi et al., 2017), moderata resistenza alla salinità (M2 e M4) (Porro et al., 2013; Meggio et al., 2014), ed elevata tolleranza alla siccità (M4) (Porro et al., 2013; Meggio et al., 2014; Corso et al., 2015; Bianchi et al., 2020a).

Poiché siamo ancora lontani dal vincere le sfide del cambiamento climatico, c'è la forte necessità di costituire nuovi portinnesti in grado di fronteggiare condizioni ambientali sfavorevoli. Il nostro gruppo sta continuando a lavorare in questo senso. Al fine di selezionare i genotipi più promettenti per i futuri programmi di miglioramento genetico dei portinnesti della

vite, abbiamo istituito una delle più grandi collezioni di germoplasma di non-*vinifera* presso UNIMI, raccogliendo materiale vegetale proveniente da Italia, Spagna e Stati Uniti, e valutandone la variabilità genetica.

### **La metodologia utilizzata**

Il primo passo verso la selezione di nuovi materiali da utilizzare nei futuri programmi di miglioramento genetico è stato la genotipizzazione della nuova collezione di genotipi di non-*vinifera*. In collaborazione con il Centro di ricerca per la Viticoltura e l'Enologia (Conegliano, Italia), la collezione è stata genotipizzata utilizzando 22 marcatori SSR (Simple Sequence Repeat) (Migliaro et al., 2019). Parte di questi marcatori sono universalmente utilizzati per la caratterizzazione genetica del germoplasma di *Vitis vinifera* (Maul et al., 2012). I profili SSR sono stati utilizzati per individuare i profili unici, per indagare la diversità genetica della collezione e per estrapolare una *core collection*. Infine, i genotipi che sono entrati a far parte della *core collection* sono stati genotipizzati utilizzando anche i 18k marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphism) del nuovo *Vitis*18kSNP *array* (Laucou et al., 2018). I profili SNP sono stati utilizzati per confrontare la variabilità genetica tra il germoplasma di non-*vinifera* e quello di *vinifera* (Bianchi et al., 2020b).

### **La variabilità genetica della collezione di non-*vinifera* presso UNIMI**

La collezione di genotipi di vite di non-*vinifera* si trova nella zona viticola denominata Oltrepò Pavese (9°05'E; 44°58'N; 144 m slm) e, ad oggi, conta più di 400 accessioni. Di queste 400, 379 sono state genotipizzate con 22 marcatori SSR. Sono stati rilevati 232 genotipi unici, quindi circa il 39% delle accessioni rappresenta germoplasma ridondante. Dei 232 genotipi unici, solo 111 sono stati identificati in base alle informazioni disponibili in letteratura e al controllo incrociato con le informazioni presenti nelle banche dati, di conseguenza, più del 50% dei rimanenti genotipi unici sono risultati sconosciuti. È stata rilevata una grande diversità genetica, evidenziata dalla grande variabilità allelica riscontrata e facilmente spiegabile poiché la collezione ospita genotipi appartenenti a specie diverse e loro ibridi. Le analisi genetiche hanno individuato tre gruppi ancestrali principali: i) un primo cluster comprende principalmente i genotipi di *V. rupestris* e *V. riparia*; ii) un altro cluster raggruppa le progenie delle tre varietà più utilizzate in passato per i programmi di miglioramento genetico dei portinnesti della vite (*V. berlandieri* Ressayre 2, *V. riparia* Gloire de Montpellier e *V. rupestris* du Lot); iii) il terzo cluster raggruppa principalmente ibridi di *V. labrusca* e *V. vinifera*. Un quarto gruppo, che possiamo indicare come 'misto', è rappresentato da individui con pedigree complesso, nella cui genealogia sono coinvolte più di due specie (Migliaro et al., 2019).

### **Una *core collection* facilita la gestione di fenotipizzazioni complesse**

Le grandi collezioni di germoplasma risultano difficili da gestire quando si devono realizzare impegnative e accurate fenotipizzazioni di tutte le accessioni. Una selezione non casuale e non completamente arbitraria dei materiali sui quali focalizzarsi è una strategia utile per superare questo limite, per esempio estrapolando una *core collection* che cattura l'intera diversità genetica nel numero più piccolo possibile di genotipi (Brown, 1995). La nostra *core collection* conta 70 genotipi. Di questi, solo il 7% sono stati estrapolati dal gruppo *berlandieri* × *rupestris* e *berlandieri* × *riparia*, mentre la maggior parte degli individui della *core collection* sono genotipi sconosciuti, ossia genotipi con poche informazioni a livello ampelografico ed agronomico.

### **Gli SNP sono uno strumento utile per studiare la diversità genetica del germoplasma di non-vinifera**

Finora, l'*array* di genotipizzazione Vitis18kSNP è stato ampiamente utilizzato per studiare la diversità genetica del germoplasma di *V. vinifera* (De Lorenzis et al., 2015, 2019; Mercati et al., 2016; Ruffa et al., 2016; Laucou et al., 2018 ; Sunseri et al., 2018; D'Onofrio et al., 2021). L'*array*, istituito dal consorzio GrapeReSeq, contiene circa 18k marcatori SNP. La maggior parte (circa 13.5k, cioè il 75%) è stata ottenuta risequenziando 47 genotipi di *V. vinifera*, mentre il restante 25% (circa 4.5k) è stato rilevato nel genoma di specie di non-vinifera (*Vitis aestivalis*, *V. berlandieri*, *Vitis cinerea*, *Vitis labrusca*, *Vitis lincecumii* e *Muscadinia rotundifolia*) (Laucou et al., 2018). Recentemente, l'*array* è stato validato anche su genotipi di non-vinifera, utilizzando la *core collection* (Bianchi et al., 2020b). Più di 14k loci sono stati amplificati con successo, di questi il 61% è rappresentato da marcatori molecolari identificati nel genoma di *V. vinifera*, mentre circa il 39% è rappresentato da loci identificati nel genoma di altre specie di *Vitis*. Questi dati confermano l'utilità di questo *array* nella genotipizzazione del germoplasma di non-vinifera. L'unicità e la preziosità della *core collection* sono state dimostrate anche dalle analisi genetiche. Sono stati individuati quattro gruppi ancestrali: i) il gruppo 1 raggruppa solo tre genotipi conosciuti (*V. berlandieri* × *V. riparia*, *V. vinifera* × *V. rupestris* e *V. labrusca*); ii) il gruppo 2 raggruppa genotipi di *V. cordifolia*, *V. labrusca*, *V. rupestris* e *V. vinifera*; iii) il gruppo 3 raggruppa genotipi di *V. candicans*, *V. labrusca*, *V. longii* e *V. rupestris*; iv) il gruppo 4 raggruppa i genotipi di *V. riparia* e la maggior parte dei genotipi sconosciuti (Bianchi et al., 2020b). Inoltre, il confronto tra i profili SNP della *core collection* e quelli del germoplasma di *V. vinifera* ha evidenziato una netta differenziazione tra le due tipologie di campioni analizzati (Bianchi et al., 2020b).

## Nuovi genotipi promettenti per i futuri programmi di miglioramento genetico

La nuova collezione di non-*viniferae* presso UNIMI è stata istituita al fine di individuare nuovi genotipi da utilizzare nei futuri programmi di miglioramento genetico dei portinnesti della vite. La collezione ha mostrato un'elevata variabilità genetica, riassunta in una *core collection* di 70 genotipi. La cosa interessante è che da un lato la maggior parte di questa variabilità non è stata ancora esplorata dal punto di vista fenotipico, rappresentando quindi un interessante serbatoio di potenzialità; dall'altro, risultati preliminari hanno evidenziato che alcuni di questi genotipi sconosciuti hanno comportamenti promettenti nel fronteggiare la siccità, con prestazioni a volte migliori di quelle rilevate sui portinnesti di riferimento che tollerano la siccità (Bianchi et al., 2018). Si può dire che siamo sulla buona strada.

## Ringraziamenti

Questa ricerca è stata finanziata da Winegraft srl, SIV (Servizio per l'identificazione della vite del CREA Viticoltura ed Enologia di Conegliano) e dal progetto europeo intitolato "FREECLIMB - FRUIT CROPS ADAPTATION TO CLIMATE CHANGE IN THE MEDITERRANEAN BASIN" nell'ambito del Programma Partnership For Research And Innovation In The Mediterranean Area (PRIMA; call 2018).

## Bibliografia

- Bianchi, D., Caramanico, L., Grossi, D., Brancadoro, L., and De Lorenzis, G. (2020a). How do novel M-rootstock (*Vitis* spp.) genotypes cope with drought? *Plants* 9. doi:10.3390/plants9101385.
- Bianchi, D., Brancadoro, L., and De Lorenzis, G. (2020b). Genetic Diversity and Population Structure in a *Vitis* spp. Core Collection Investigated by SNP Markers. *Diversity* 12, 103.
- Bianchi, D., Grossi, D., Tincani, D. T. G., Simone Di Lorenzo, G., Brancadoro, L., and Rustioni, L. (2018). Multi-parameter characterization of water stress tolerance in *Vitis* hybrids for new rootstock selection. *Plant Physiol. Biochem.* 132, 333–340. doi:10.1016/j.plaphy.2018.09.018.
- Brown, A. H. D. (1995). "The core collection at the crossroads," in *Core Collections of Plant Genetic Resources*, eds. T. Hodgkin, A. H. D. Brown, T. J. L. van Hintum, and E. A. V. Morales (Chichester: A Wiley-Sayce Publication), 3–19.
- Corso, M., Vannozzi, A., Maza, E., Vitulo, N., Meggio, F., Pitacco, A., et al. (2015). Comprehensive transcript profiling of two grapevine rootstock genotypes contrasting in drought susceptibility links the phenylpropanoid pathway to enhanced tolerance. *J. Exp. Bot.* 66, 5739–5752. doi:10.1093/jxb/erv274.
- D'Onofrio, C., Tumino, G., Gardiman, M., Crespan, M., Schneider, A., Bignami, C., et al. (2021). Parentage Atlas Of Widely And Locally Cultivated Italian Grapevine Varieties As

- Inferred From SNP Genotyping. *Front. Plant Sci.* 11, 605934.
- De Lorenzis, G., Chipashvili, R., Failla, O., and Maghradze, D. (2015). Study of genetic variability in *Vitis vinifera* L. germplasm by high-throughput Vitis18kSNP array: The case of Georgian genetic resources. *BMC Plant Biol.* 15, 154. doi:10.1186/s12870-015-0510-9.
- De Lorenzis, G., Mercati, F., Bergamini, C., Cardone, M. F., Lupini, A., Mauceri, A., et al. (2019). SNP genotyping elucidates the genetic diversity of Magna Graecia grapevine germplasm and its historical origin and dissemination. *BMC Plant Biol.* 19, 7. doi:10.1186/s12870-018-1576-y.
- Galet, P. (1998). *Grape varieties and rootstock Varieties.* , ed. T. J. Smith Chaintré, France: Oenoplurimedia.
- Huglin, P., and Schneider, C. (1998). *Biologie et Écologie de la Vigne.* , ed. T. & D. Lavoisier Paris.
- Keller, M. (2010). Managing grapevines to optimize fruit development in a challenging environment: A climate change primer for viticulturists. *Environ. Sustain. Vitic. Pract. Pract.*, 259–292. doi:10.1201/b18226.
- Laucou, V., Launay, A., Bacilieri, R., Lacombe, T., Adam-Blondon, A.-F., Bérard, A., et al. (2018). Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs. *PLoS One* 13, 1–27.
- Maul, E., Sudharma, K.N., Kecke, S., Marx, G., Muller, C., Audeguin, L. et al. 2012. The European *Vitis* database ([www.eu-vitis.de](http://www.eu-vitis.de)) – a technical innovation through an online uploading and interactive modification system. *Vitis* 51, 79-86.
- Meggio, F., Prinsi, B., Negri, A. S., Simone Di Lorenzo, G., Lucchini, G., Pitacco, A., et al. (2014). Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 310–323. doi:10.1111/ajgw.12071.
- Mercati, F., De Lorenzis, G., Brancadoro, L., Lupini, A., Abenavoli, M. R., Barbagallo, M. G., et al. (2016). High-throughput 18K SNP array to assess genetic variability of the main grapevine cultivars from Sicily. *Tree Genet. Genomes* 12, 59.
- Migliaro, D., De Lorenzis, G., Simone Di Lorenzo, G., De Nardi, B., Gardiman, M., Failla, O., et al. (2019). Grapevine non-vinifera genetic diversity assessed by SSR markers as a starting-point for new rootstock breeding programs. *Am. J. Enol. Vitic.* in press.
- Porro, D., Pedò, S., Bertoldi, D., Bortolotti, L., Failla, O., and Zamboni, M. (2013). *Evaluation of new rootstocks for grapevine: Nutritional aspects.*
- Ruffa, P., Raimondi, S., Boccacci, P., Abbà, S., and Schneider, A. (2016). The key role of “Moscato bianco” and “Malvasia aromatica di Parma” in the parentage of traditional aromatic grape varieties. *Tree Genet. Genomes* 12, 50.

- Sunseri, F., Lupini, A., Mauceri, A., De Lorenzis, G., Araniti, F., Brancadoro, L., et al. (2018). Single nucleotide polymorphism profiles reveal an admixture genetic structure of grapevine germplasm from Calabria, Italy, uncovering its key role for the diversification of cultivars in the Mediterranean Basin. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24, 345–359. doi:10.1111/ajgw.12339.
- Vannozzi, A., Donnini, S., Vigani, G., Corso, M., Valle, G., Vitulo, N., et al. (2017). Transcriptional Characterization of a Widely-Used Grapevine Rootstock Genotype under Different Iron-Limited Conditions. *Front. Plant Sci.* 7, 1–17. doi:10.3389/fpls.2016.01994.
- Whiting, J. R. (2005). "Grapevine rootstocks," in *Viticulture, volume 1: Resources, 2nd Edition*, eds. P. R. Dry and B. G. Coombe (Ashford, Australia: Winetitles Pty Ltd), 167–188.