RELAZIONI GENETICHE TRA VITI COLTIVATE E SELVATICHE IN TOSCANA

M. Di Vecchi Staraz [(*, 1)], T. Lacombe [(2)], V. Laucou [(2)], P. This [(2)], M. Boselli [(1)]

[(1)] Dipartimento di Scienze, Tecnologie e Mercati della Vite e del Vino – Università degli Studi di Verona, Villa Lebrecht, Via della Pieve, 70 – 37029 San Floriano (VR), Italia
[(2)] INRA, UMR Diversité et Génomes des Plantes Cultivées, Equipe "Génétique de la Vigne" – Place Viala, 2, 34060 Montpellier, France
*e-mail: mdvs@mdvs.it

RIASSUNTO - ENGLISH

This research was aimed at the analysis of the genetic relationship within the Tuscan cultivated and wild compartments of *Vitis vinifera* L. A particular attention has been given to the study of cultivar 'Sangiovese', considering the dominating role of this variety in the past and present of the viticulture in Tuscany and in Italy. We have studied some Tuscan varieties conserved at the ampelographic repository of San Felice (Castelnuovo Berardenga, Siena, Italy) and at the ampelographic repository of INRA at the Domaine de Vassal (Marseillan Plage, France). The wild compartment of the species, *V. vinifera* L. subsp. *silvestris* (G.) H., is also present in Tuscany, even if it is in risk of extinction. We have studied 10 wild individuals out of the 60 inventoried in Tuscany. The principal OIV-IPGRI descriptors have been used for a morphological analysis of this material, and a molecular characterisation using 12 microsatellite markers (SSR, Simple Sequence Repeats) have been realised. The markers nSSR are very polymorphs and codominants and therefore very useful in the study of varieties characterisation and in the research of parental relationships. The statistical analysis of the data will enable to characterise the genetic relationship of these 2 compartments. The genetic diversity of the Tuscan wild compartment is lesser than the cultivated. Perhaps because the wilds are in extinction and rare. The cv. 'Sangiovese' has only few alleles in common with the wild compartment. Nevertheless, 7 autochthonous Tuscan varieties have important genetic relationships with wild grapevines. These results demonstrate the possible contribution of wild grapevines to the genetic diversification of the cultivated compartment and also contributes to the understanding of grapevine evolution and history in Tuscany and in Italy.

RIASSUNTO - FRANCAIS

Dans ce travail de recherche, nous avons étudié les relations génétiques existantes entre le compartiment cultivé et sauvage de *Vitis vinifera* L., en Toscane. Nous avons focalisé le travail sur le cultivar 'Sangiovese', en considération de son importance dans la viticulture de la Toscane et de l'Italie. Nous avons étudié les cultivars de Toscane qui sont conservés dans la collection ampélographique de San Felice (Castelnuovo Berardenga, Siena, Italie) et dans celle de l'INRA au Domaine de Vassal (Marseillan Plage, France). Le compartiment sauvage, *V. vinifera* L. subsp. *silvestris* (G.) H., est présent en Toscane, mais il est en voie d'extinction. Nous avons étudié 10 vignes sauvages des 60 recensées en Toscane. Le matériel a été caractérisé en utilisant les principaux descripteurs ampélographiques OIV-IPGRI et en utilisant 12 marqueurs microsatellite (nSSR, *nuclear Simple Sequence Repeats*). Ces marqueurs sont très polymorphes, codominants et efficaces pour la caractérisation génétique de variétés de vigne et aussi pour réaliser des études de parenté. L'analyse statistique des données a mis en évidence les relations génétiques existantes entre ces 2 compartiments en Toscane. La diversité génétique des vignes sauvages est inférieure à celle des cultivars. Cela dépend probablement de l'extinction des vignes sauvages. Le cv. 'Sangiovese' possède seulement peu d'allèles en commun avec les vignes sauvages. Cependant, 7 cultivars autochtones de la région possèdent des affinités génétiques avec des vignes sauvages. Ces résultats montrent la contribution des vignes sauvages à la diversification génétiques des cultivars

en Toscane, en contribuant aussi à la compréhension de l'évolution et de la histoire de la vigne en Toscane et en Italie.

RIASSUNTO - ITALIANO

La presente ricerca ha l'obiettivo di analizzare le relazioni genetiche esistenti tra viti (*Vitis vinifera* L.) coltivate e selvatiche in Toscana. In particolare è stata studiata la cultivar 'Sangiovese', in considerazione del suo ruolo dominante nel passato e nel presente della viticoltura in Toscana e più in generale in Italia. Sono state studiate alcune varietà toscane di vite conservate presso la collezione ampelografica di San Felice (Castelnuovo Berardenga, Siena, Italia) e quella INRA presso il Domaine de Vassal (Marseillan Plage, France). Il compartimento selvatico della vite, *V. vinifera* L. subsp. *silvestris* (G.) H., è presente in Toscana anche se è in via d'estinzione. Sono state studiate 10 viti selvatiche delle 60 censite in Toscana. Il materiale è stato descritto utilizzando i descrittori ampelografici OIV-IPGRI e 12 marcatori molecolari (nSSR, *nuclear Simple Sequence Repeats*). Questi marcatori nSSR sono polimorfi, codominanti ed efficaci per lo studio della caratterizzazione genetica delle varietà di vite e per lo studio parentale. L'analisi statistica dei dati ha permesso la caratterizzazione delle relazioni genetiche esistenti tra i 2 compartimenti della specie in Toscana. La diversità genetica del compartimento selvatico è inferiore a quella del compartimento coltivato. Probabilmente è il risultato della rarità delle viti selvatiche. Il 'Sangiovese' possiede pochi alleli in comune con il compartimento selvatico regionale. Tuttavia, ben 7 cultivar autoctone toscane hanno significative affinità genetiche con alcune viti selvatiche. Questi risultati mettono in evidenza il probabile contributo delle viti selvatiche alla diversità genetica del compartimento coltivato regionale, contribuendo alla comprensione dell'evoluzione e della storia della vite in Toscana ed in Italia.

INTRODUZIONE

In seno alla specie endemica europea *Vitis vinifera* L. esistono due sottospecie: *sativa* e *silvestris*. La prima si stima sia costituita da circa 10000 cultivar (Alleweldt e Dettweiler, 1994), mentre *V. v. silvestris*, che è definita come la forma selvatica (mai coltivata) della specie, è in via d'estinzione. Infatti, recenti studi hanno censito poco più di 900 individui esistenti in Europa (Arnold, 1995; Di Vecchi, 2001; Di Vecchi Staraz, 2007a; Fregoni, 1991; Lacombe *et al.*, 2002 e 2003; Ocete *et al.*, 1995; Schneider, com. pers.). Dal 2001 è in corso un inventario di *V. v. silvestris* in Toscana, nell'ambito del quale sono stati censiti più di 60 individui.

L'interesse verso le viti selvatiche è giustificato principalmente perché si tratta di una sottospecie endemica europea, probabilmente la popolazione ancestrale di *V. vinifera* (McGovern, 2003), e pertanto costituisce un patrimonio genetico fondamentale per la specie. Non tutte le viti allo stato selvatico sono però individui della sottospecie *V. v. silvestris*, ed è difficile distinguerle da altre specie del genere *Vitis*, ma soprattutto da cultivar abbandonate di *V. v. sativa* (Levadoux, 1956; Fregoni, 1991; Di Vecchi, 2001; Lacombe *et al.*, 2003; Di Vecchi Staraz, 2007a).

La presente ricerca è volta ad individuare le eventuali relazioni genetiche esistenti tra il compartimento selvatico e quello coltivato presente in Toscana, tramite un'analisi genetica e parentale di un gruppo di viti selvatiche, selezionato ampelograficamente, ed alcune cultivar autoctone toscane.

MATERIALE E METODO

Tra le oltre 60 viti selvatiche (*V. v. silvestris*) censite in Toscana (Di Vecchi Staraz, 2007a), le 10 oggetto di questo studio (Tab. 1) sono state selezionate tramite analisi ampelografica e sono state reperite presso 3 località distinte del Sud-Ovest della Toscana (Provincia di Grosseto): Roselle (R), Tirli (T) e Mulino dell'Ampio (MT). Invece, per caratterizzare geneticamente il compartimento coltivato toscano sono state svolte le analisi su 29 cultivar (Tab. 1) conservate nella Collezione ampelografica dell'Università di Firenze presso Agricola San Felice (Castelnuovo Berardenga, Siena) e nella Collezione ampelografica INRA (*Institut de la Recherche Agronomique*) presso il

Domaine de Vassal (Marseillan Plage, Francia). Anche le cultivar sono state preventivamente selezionate ed identificate tramite studio ampelografico, per garantirne l'autenticità (*true-to-type*).

Tab. 1: Il materiale vegetale analizzato, diviso per compartimento (tra parentesi è indicata la provenienza; Univ. FI = Università degli Studi di Firenze).

10 viti selvatiche (*V. vinifera silvestris*)	**29 cultivar (*V. vinifera sativa*)**
silvestris MT1 (Mulino dell'Ampio), silvestris MT-B2 (Mulino dell'Ampio), silvestris R1 (Roselle), silvestris R3 (Roselle), silvestris R-E4 (Roselle), silvestris R5 (Roselle), silvestris R6 (Roselle), silvestris T1 (Tirli), silvestris T2 (Tirli), silvestris T-B1 (Tirli)	Abrostine (Univ. FI), Aleatico (INRA), Alicante Bouschet (INRA), Ancellotta (Univ. FI), Bonamico (Univ. FI), Canaiolo (INRA), Canina nera (INRA), Cannella (Univ. FI), Capibianchi (Univ. FI), Caprugnone (Univ. FI), Carraresa (Univ. FI), Ciliegiolo (INRA), Colorino (INRA), Insolia (Univ. FI), Lugliola rossa (Univ. FI), Malvasia bianca toscana (INRA), Malvasia nera (INRA), Mammolo di Siena (Univ. FI), Monferrato di Lucca (Univ. FI), Montepulciano (INRA), Moscadello (Univ. FI), Moscato giallo (INRA), Rapone (Univ. FI), Sangiovese (Univ. FI), Trebbiano (INRA), Vermentino nero (Univ. FI), Vernaccia di San Gimignano (INRA), Vernaccia nera (INRA), Zuccaccio (Univ. FI)

L'analisi genetica è stata condotta con marcatori microsatelliti (*nuclear Simple Sequence Repeats*, nSSR; *for a review see* Sefc *et al.*, 2001). I 12 *loci* microsatelliti (nSSR) utilizzati sono: VVMD21, VVMD24, VVMD25, VVMD27, VVMD28 (Bowers *et al.*, 1996 e 1999); VVIv37, VVIq52, VVIh54, VVIb01, VVIp31 (Merdinoglu *et al.*, 2005); VVS2 (Thomas e Scott, 1993) ed infine VMC1b11 (*Vitis Microsatellite Consortium*). L'estrazione del DNA, l'amplificazione tramite PCR, il sequenziamento e l'osservazione del polimorfismo allelico sono state eseguite come descritto in Di Vecchi Staraz *et al.* (2007b).

L'insieme dei dati ottenuti è stato oggetto di uno studio statistico teso a caratterizzare geneticamente i 2 compartimenti, nonché ad identificare le eventuali relazioni genetiche e di parentela. Tramite il programma Microsatellite Tools for Excel (Park, 2001), sono stati elaborati: indice di diversità genetica (Ni) (Nei, 1987), eterozigosi osservata (Ho) ed il numero medio di alleli per *locus* (MNA). Per l'analisi parentale e il calcolo delle relazioni genetiche dei 2 compartimenti, abbiamo utilizzato il software Kinship v.1.2 (Goodnight e Queller, 1999). Infine, la classificazione gerarchica *neighbor joining* (NJ) è stata costruita sulle distanze genetiche, secondo il metodo indicato da Sneath e Sokal (1973), con l'ausilio del software DarWin v. 5 (CIRAD, Francia).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per l'insieme degli individui, il numero medio di alleli per *locus* (MNA) è 8.3, quindi relativamente elevato in considerazione del numero di individui analizzati (Di Vecchi Staraz, 2007a). In totale, il compartimento selvatico possiede meno alleli per *locus* rispetto a quello coltivato (Tab. 2).

Tabella 2: L'indice di diversità genetica (Ni) (Nei, 1987), eterozigosi osservata (Ho) ed il numero medio di alleli per *locus* (MNA), relativi all'insieme del compartimento selvatico, di quello coltivato e di 10 gruppi aleatori di 10 coltivate.

Compartimento	**n. campioni**	**Ni**	**Ho**	**MNA**
Viti coltivate	29	0,77	0,80	7,60
Viti coltivate (media di 10 gruppi aleatori)	10	0,71	0,73	5,60
Viti selvatiche	10	0,70	0,69	5,40

L'indice di diversità genetica (Ni) e l'eterozigosi osservata (Ho) del compartimento coltivato hanno valori consueti per *V. vinifera* (Di Vecchi Staraz *et al.*, 2007b), rispettivamente 0.77 e 0.80. Per le selvatiche questi valori sono relativamente inferiori (Ni=0.70 e Ho=0.69), probabilmente a causa della similarità genetica del campione (Tab. 2). Infatti i 10 individui selvatici provengono soltanto da 3 siti, mentre le cultivar sono tutte di origine geografica presumibilmente differente.

Tuttavia, la dimensione del campione analizzato potrebbe aver influenzato questi risultati. Pertanto, per poter comparare i 2 compartimenti sulla base dello stesso numero di effettivi, sono stati calcolati Ni, Ho ed MNA medi per 10 gruppi di 10 viti coltivate scelte in modo aleatorio. A parità di effettivi, i valori di Ni, Ho ed MNA sono similari tra i 2 compartimenti (Tab. 2). I *loci* VVIh54, VVIv37, VVMD27 e VVMD7 possiedono un allele specifico del compartimento selvatico, mentre nel *locus* VVS2 ne sono stati osservati ben 2.

Lo studio realizzato utilizzando Kinship, ha permesso di distinguere chiaramente le relazioni esistenti tra i 2 compartimenti. Nessuna parentela diretta, del tipo genitore/figlio, è stata identificata tra i 2 diversi compartimenti. Tuttavia, tutte le viti selvatiche analizzate hanno da 4 a 12 alleli in comune con il 'Sangiovese'. Inoltre, ben 3 viti selvatiche ('silvestris MT-B2', 'silvestris R-E4' e 'silvestris T-B1') possiedono almeno un allele in comune con il 'Sangiovese', in 8 *loci* su 12. Le viti selvatiche del sito di Roselle (R) sono quelle con il maggior numero di alleli in comune con il 'Sangiovese', al contrario di quelle di Tirli (T). Le cultivar 'Abrostine', 'Aleatico', 'Capibianchi', 'Colorino', 'Rapone' e 'Zuccaccio' presentano valori significativi con singoli individui selvatici di differenti località. In particolare 'Capibianchi' e 'Rapone' con gli individui di Roselle (R), mentre 'Ancellotta' presenta valori significativi con 3 individui selvatici appartenenti ai diversi siti. Il 'Bonamico' ha valori significativi con 2 individui di Mulino dell'Ampio (MT) e con ben 3 delle 5 viti selvatiche di Roselle (R).

La classificazione gerarchica (*neighbor joining*) costruita sulle distanze genetiche (Fig. 1), confermerebbe questi risultati.

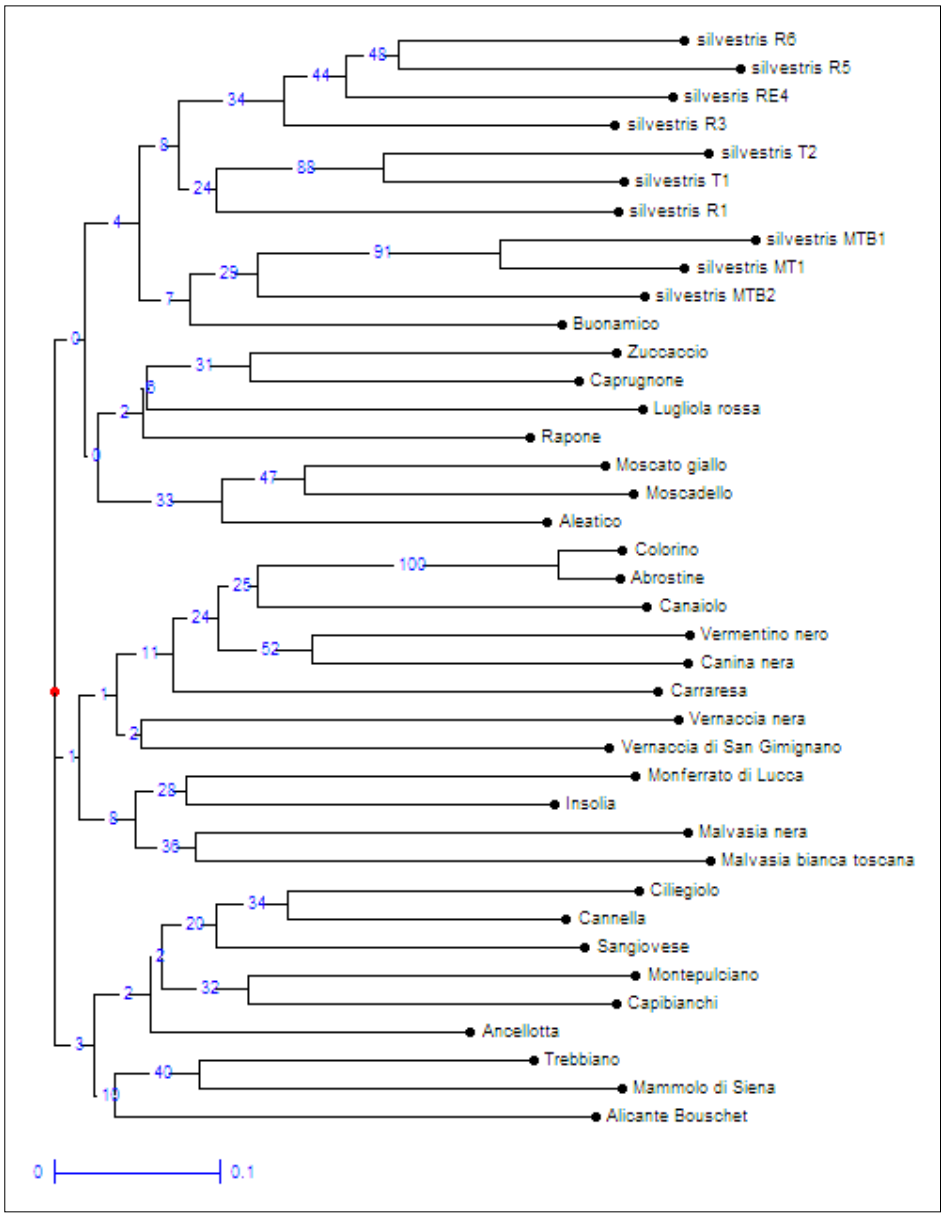

Figura 1: Classificazione *neighbor joining* (10.000 *bootstraps*; in % sulle ramificazioni) di 29 cultivar e 10 viti selvatiche, costruita sulla distanza genetica ASD (*Allele Sharing Distance*, in accordo a Sneath e Sokal, 1973) su 11 marcatori nSSR.

Infatti, nella classificazione gerarchica i due compartimenti sono classificati su 2 ramificazioni differenti ed in particolare le viti selvatiche sono tutte raggruppate insieme. La cultivar 'Bonamico' è classificata con il compartimento selvatico. Nella classificazione gerarchica, 3 principali ramificazioni sembrano strutturare il compartimento coltivato, all'interno della più numerosa è presente il 'Sangiovese' insieme ad alcune delle maggiori cultivar' coltivate in Toscana quali 'Trebbiano', 'Malvasia bianca toscana', 'Aleatico' e 'Ciliegiolo'.

CONCLUSIONI

I marcatori nSSR usati, sono risultati polimorfi ed efficaci per la caratterizzazione genetica dei 2 compartimenti presentata in questo studio. La rappresentatività quantitativa e qualitativa del materiale vegetale impiegato e l'applicazione di differenti tecniche di analisi hanno permesso di caratterizzare i 2 compartimenti, accertando le relazioni genetiche esistenti. Non è stato identificato alcun tipo di parentela diretta tra viti selvatiche e cultivar. Tuttavia è stato possibile apprezzare una differenziazione genetica locale tra il compartimento coltivato e quello selvatico, nonostante i 2 compartimenti siano interfertili. L'unica eccezione osservata è la cultivar 'Bonamico', di cui appare evidente la significativa similarità genetica con le viti selvatiche toscane, in particolare quelle del sito di Mulino all'Ampio (MT). Questa cultivar di origine incerta ed antica, è attualmente diffusa nelle colline pisane, ma in passato è stata coltivata in tutta la Toscana (Bachechi, 2003). Nonostante la differenziazione genetica dei 2 compartimenti, in generale i risultati ottenuti mettono in evidenza un probabile, anche se parziale, contributo delle viti selvatiche alla diversità genetica del compartimento coltivato regionale.

È intenzione degli autori approfondire lo studio utilizzando un maggior numero di campioni dei 2 compartimenti, per cercare di verificare quali cultivar abbiamo rapporti di parentela diretta con il compartimento selvatico.

La biodiversità genetica di *V. vinifera* è un patrimonio fondamentale, pertanto la preservazione di *V. v. silvestris* deve essere una priorità. La definizione di un programma europeo coordinato di protezione *in-situ*, potrebbe garantire la sopravvivenza delle stazioni botaniche già censite.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Alleweldt G. e Dettweiler E., 1994. The genetic resources of *Vitis*: world list of grapevine collections. 2nd ed. BAZ IRZ, Siebeldingen: Geilweilerhof.

Arnold C., Gillet F. e Gobat J.M., 1995. Situation de la vigne sauvage *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* en Europe. Thèse de Doctorat, Institut de Botanique, Université de Neuchâtel.

Bachechi E., 2003. Contributo alla conoscenza di tre antichi vitigni delle Colline Pisane: Grand Noir, Giacomino, Canina nera. Tesi di Laurea, Università degli Studi di Pisa.

Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R. e Meredith C.P., 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39: 628-633.

Bowers J.E., Dangl G.S. e Meredith C.P., 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50: 243-246.

Di Vecchi M., 2001. Reperimento e caratterizzazione di *Vitis vinifera* L. *silvestris* (Gmelin) Hegi in Francia. Tesi di Laurea. Università degli Studi di Firenze.

Di Vecchi Staraz M., 2007a. Recensement et caractérisation des ressources génétiques autochtones de *Vitis vinifera* L. subsp. *silvestris* (Gmelin) Hegi en Europe. Dottorato di Ricerca, INRA Montpellier e Università degli Studi di Firenze.

Di Vecchi Staraz M., Bandinelli R., Boselli M., This P., Boursiquot J.-M., Laucou V., Lacombe T. e Vares D., 2007b. Genetic structuring and parentage analysis for evolutionary studies in grapevine: kin group and origin of the cultivar Sangiovese revealed. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 132: 514-524.

Fregoni M., 1991. Origines de la vigne et de la viticulture, Contribution des peuples antiques. Edizioni Musumeci.

Goodnight K.F. e Queller D.C., 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, 8: 1231–1234.

Lacombe T., Laucou V., Di Vecchi M., Bordenave L., Bourse T., Siret R., David J., Boursiquot J. M., Bronner A., Merdinoglu D. e This P., 2003. Contribution à la caractérisation et à la protection *in-situ* des populations de *Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris* (Gmelin) Hegi, en France. Les Actes du IV Colloque National BRG "Le patrimoine génétique: la diversité et la ressource", 4: 381-404.

Lacombe T., Laucou V., Di Vecchi M., Bordenave L., Bourse T., Siret R., David J., Boursiquot J-M., Bronner A., Merdinoglu D. e This P., 2003. Invetory and characterization of *Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris* in France. Proceedings of the VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding, ISHS Acta Horticulturae, 603(2): 553-555.

Levadoux L., 1956. Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. *Annales de l'amélioration des plantes*, 6: 59-118.

McGovern P.E., 2003. Ancient Wine. Princeton University Press, USA.

Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A.F. e Decroocq S., 2005. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol. Breeding*, 15(4):349-366.

Nei M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY, USA.

Ocete R., Del Tio R. e Lara M., 1995. Les parasites des populations de la vigne silvestre, « *Vitis vinifera silvestris* (Gmelin) Hegi » des Pyrénées Atlantiques (France). *Vitis*, 34(3): 191-192.

Park S. D. E., 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. (Ph.D. thesis), University of Dublin.

Sefc K.M., Lefort F., Grando M.S., Scott K., Steinkellner H. e Thomas M.R., 2001. Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. *In:* Roubelakis-Angelakis KA (ed) Molecular biology and biotechnology of grapevine, Kluwer, Amsterdam: 433–463.

Sneath P.H. e Sokal R.R., 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W.H. Freeman and Company, USA.

Thomas M.R. e Scott N.S., 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86: 985-990.