



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

V Edizione

SUMMER SCHOOL SANGUIS JOVIS

**I FIGLI DEL SANGIOVESE NEL
MONDO:
STORIE, VINI, TERRITORI, MERCATI**

Il miglioramento genetico del Sangiovese per le resistenze

Alessandra Zombardo

CREA – Centro di Ricerca Viticoltura e Enologia, Arezzo

Montalcino, 13 luglio 2022



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

ARGOMENTI TRATTATI

- Malattie della vite ed input chimico
- La soluzione dei vitigni resistenti
- Varietà ibride e approccio ai geni di resistenza
- Esempi di vitigni resistenti
- I geni di resistenza in vite, resistenza a peronospora ed oidio
- Procedure «operative» per effettuare un incrocio in vite
- New breeding techniques (cisgenesi e genome editing)
- Conclusioni



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

MALATTIE DELLA VITE ED INPUT CHIMICO

- Viticoltura «moderna»:
difesa obbligata vs patogeni fungini

→ **OIDIO** (*Erysiphe necator*)

→ **PERONOSPORA** (*Plasmopara viticola*)

→ **MUFFA GRIGIA** (*Botrytis cinerea*)

VITICOLTURA in EUROPA:

3,5 mln ha di vigneti

→ 3,3% SAU

Fungicidi utilizzati: 70.000 tonnellate/anno

→ 65% del totale!!!



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

INTERVENTI POSSIBILI

Riduzione input chimici per un'agricoltura sostenibile tramite

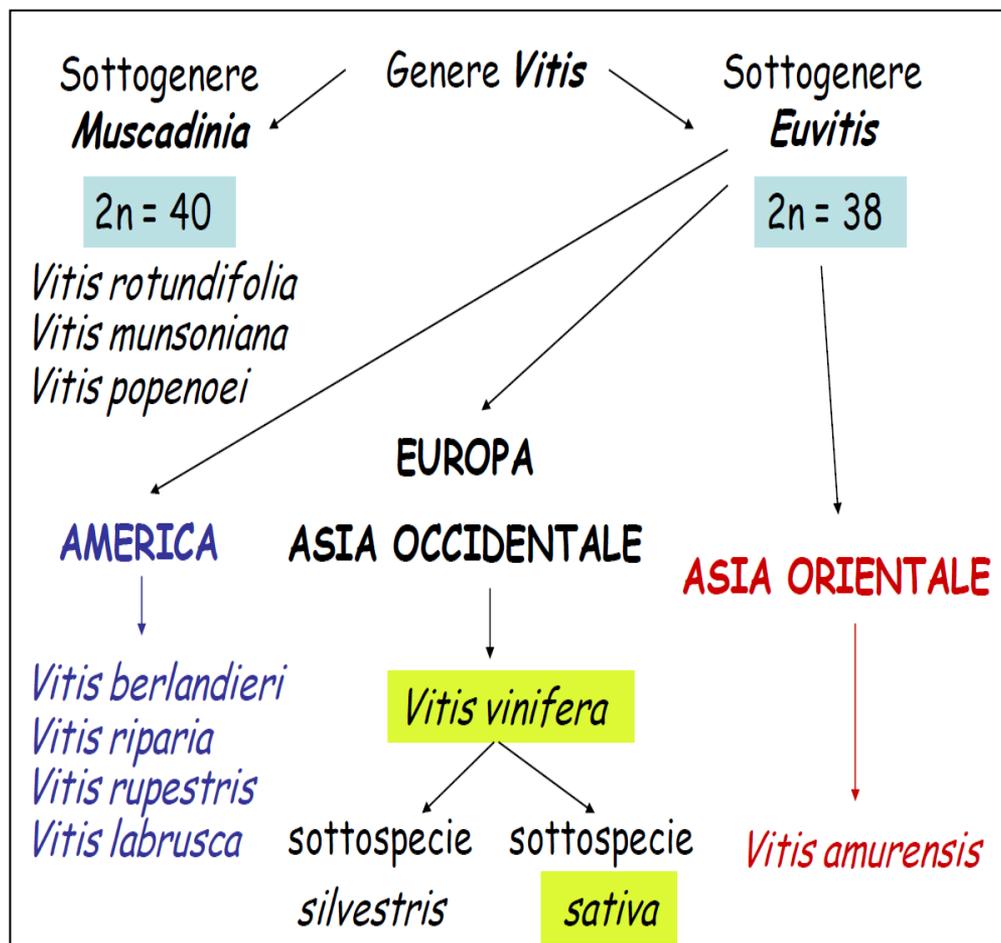
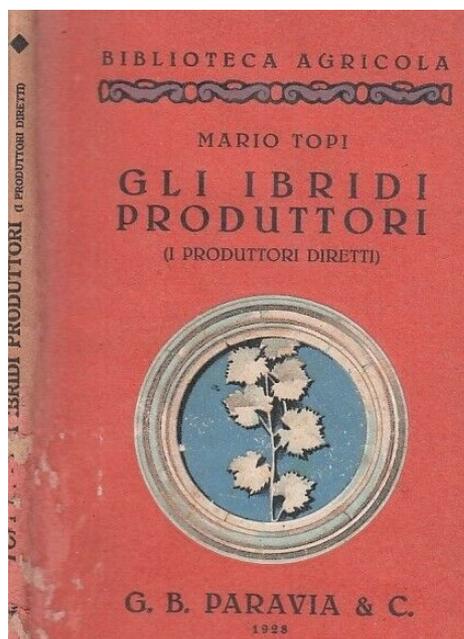
- Introduzione prodotti alternativi con basso impatto, biocontrollo, lotta integrata
- Utilizzo tecniche agronomiche di supporto, viticoltura di precisione, DSS
- **Usò vitigni resistenti:**
 - **Incroci di Vitis vinifera x varietà aventi geni di resistenza ai patogeni**
 - **New breeding techniques (NBT)**

OBIETTIVI PER LO SVILUPPO SOSTENIBILE



LA SOLUZIONE DELLA «RESISTENZA»

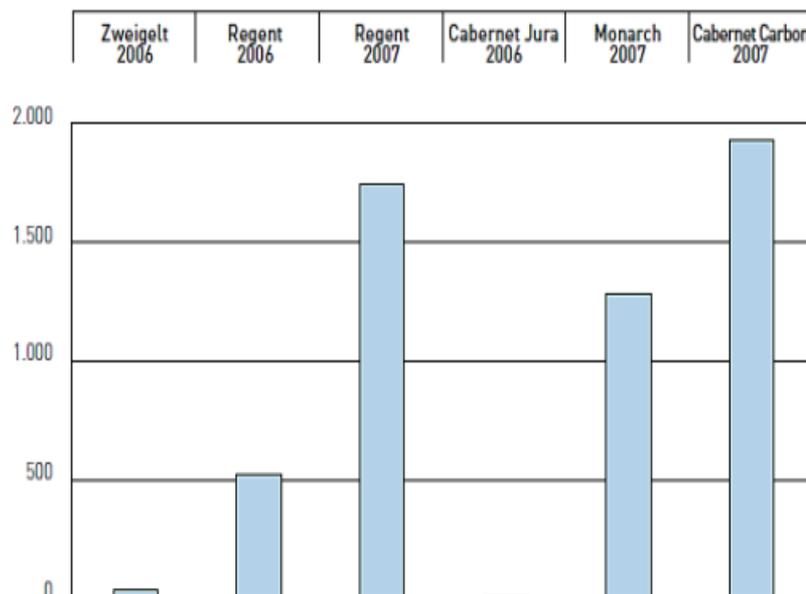
- XX secolo: costituzione di ibridi produttori diretti (prima generazione)
- incroci inter-specifici tra *Vitis vinifera* ed altre specie di *Vitis*



VARIETA' IBRIDE DI VITE

Scarso successo, caratteristiche organolettiche peggiori rispetto a *Vitis vinifera*

- Aroma foxy e fragolino (furaneolo e antranilati di etile e di metile)
- Produzione di alcol metilico in vinificazione (pectine metossilate)
- Alti contenuti di malvidina di-glucoside nelle uve a bacca nera



CEE, 1976 → proibizione dell'uso degli ibridi di vite nei nuovi vigneti!



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

APPROCCIO AI GENI DI RESISTENZA

Ricerche francesi '900

→ individuati **geni di resistenza*** a oidio in *Muscadinia rotundifolia*

Tentativi di incrocio con *Vitis vinifera* (\neq sottogenere, 40 cromosomi invece che 38)

SUCCESSO!

→ Base per moderni programmi di miglioramento genetico della vite

Incroci tradizionali mirati a passaggio di geni di resistenza

Germania, Austria e paesi dell'est → backcross = reincrocio su più generazioni

per mantenere nelle nuove viti «resistenti» ANCHE le caratteristiche enologiche (+) della vite europea, con sempre minore % DNA non-*vinifera*

* **Tolleranza, a diversi livelli**, mai vera e propria «immunità», sempre necessario tenere sotto controllo il patogeno

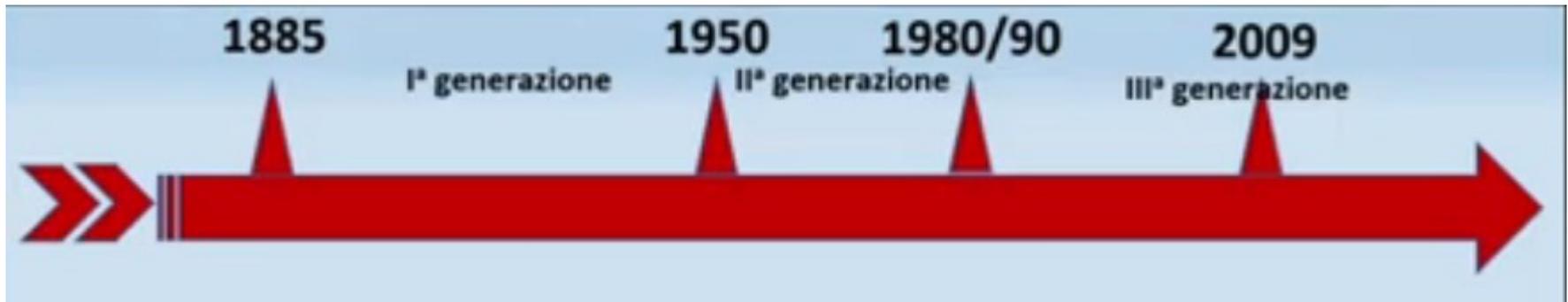
Incrocio interspecifico Ibrido	Cultivar 1: <i>V. vinifera</i> x <i>V. "selvatica"</i> 50% <i>V. vinifera</i> - 50% <i>V. "selvatica"</i>
	Reincrocio
Linea <i>V. Vinifera</i>	Cultivar 2: <i>Cultivar 1</i> x <i>V. vinifera</i> 75% <i>V. vinifera</i> - 25% <i>V. "selvatica"</i>
	Cultivar 3: <i>Cultivar 2</i> x <i>V. vinifera</i> 87,5% <i>V. vinifera</i> - 12,5% <i>V. "selvatica"</i>
	Cultivar 4: <i>Cultivar 3</i> x <i>V. vinifera</i> 93,75% <i>V. vinifera</i> - 6,25% <i>V. "selvatica"</i>
	Cultivar 5: <i>Cultivar 4</i> x <i>V. vinifera</i> 96,88% <i>V. vinifera</i> - 3,12% <i>V. "selvatica"</i>
	Cultivar 6: <i>Cultivar 5</i> x <i>V. vinifera</i> 98,44% <i>V. vinifera</i> - 1,56% <i>V. "selvatica"</i>



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

LE GENERAZIONI DI IBRIDI/VARIETÀ RESISTENTI



- Ibridi produttori diretti
(Isabella, Clinton, Noah, Baco)
- Sfruttamento geni di resistenza, nuovi incroci miglioratori con reincrocio
(Regent, Cabernet Cortis)
- Nuovi incroci con DNA *vinifera* preponderante, ottime qualità enologiche
(Cabernet Eidos, Sauvignon Nepis, Merlot Chorus)



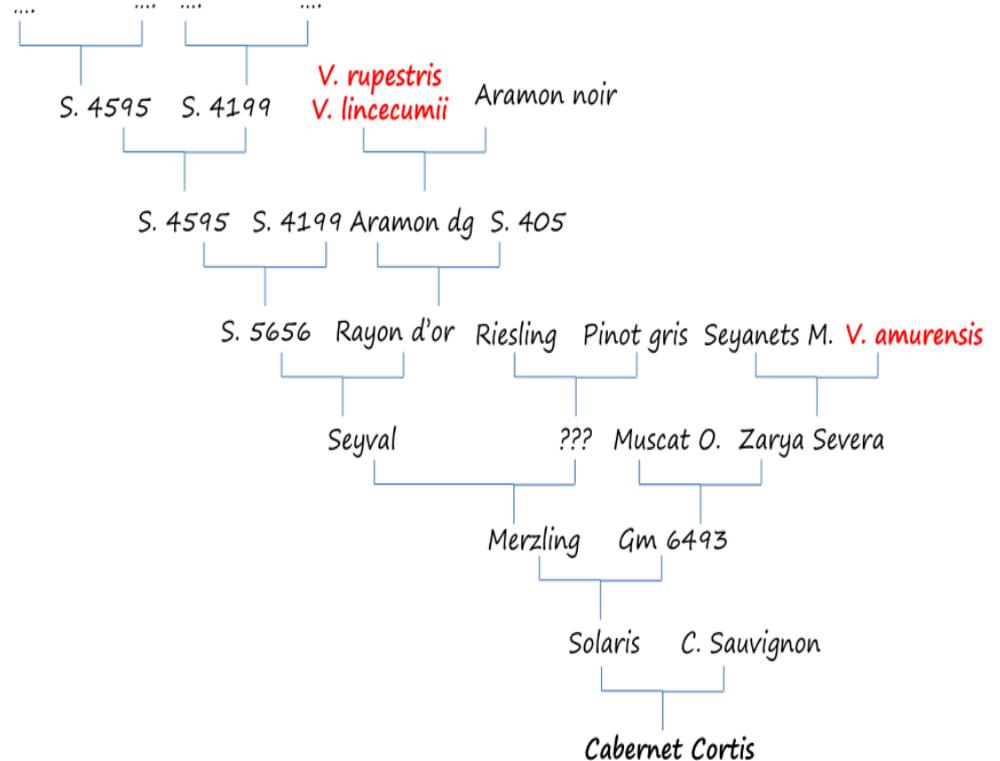
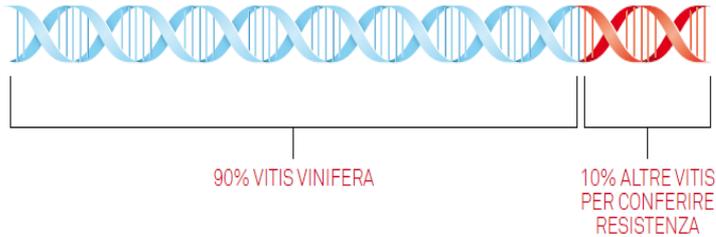
fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

I VITIGNI RESISTENTI

Viti con la quasi totalità di DNA di *Vitis vinifera* (fino a 98-99%) selezionati per la loro capacità di resistere a peronospora e oidio

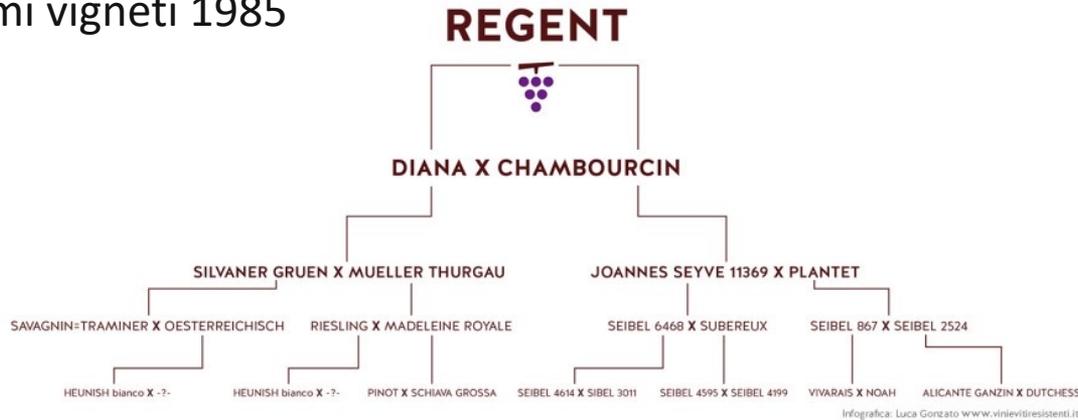
Esempio: PEDIGREE COMPLESSO DEL CABERNET CORTIS (Friburgo, 1982)



VARIETA' REGENT

Ottenuto nel 1967 in Germania (Geilweilerhof)

Primi vigneti 1985



→ qualità enologiche simili a *Vitis vinifera*

Produttivo, buon colore e aroma fruttato

«ricorda vini francesi»

→ elevata resistenza alle malattie fungine

→ Adatto ad ambienti freddi

→ Autorizzato ufficialmente in Germania (1996)

2000 ettari di superficie, primi anni 2000

→ Iscritto a RNVV da 2009



Marcatori per:

Ren2: oidio (LG15)

Rpv3: peronospora(LG18)



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

GENI DI RESISTENZA IN VITE

Individuati nel genoma di vite: circa 500 geni, non tutti effettivamente «utilizzabili»

Viti americane

V. Riparia

V. Rupestris

...

Muscadinia sp.

Vite europea

V. sylvestris

V. Vinifera var

sativa

Viti asiatiche

V. amurensis

....



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

Da Testolin, 2020

VITIS VINIFERA CON RESISTENZE

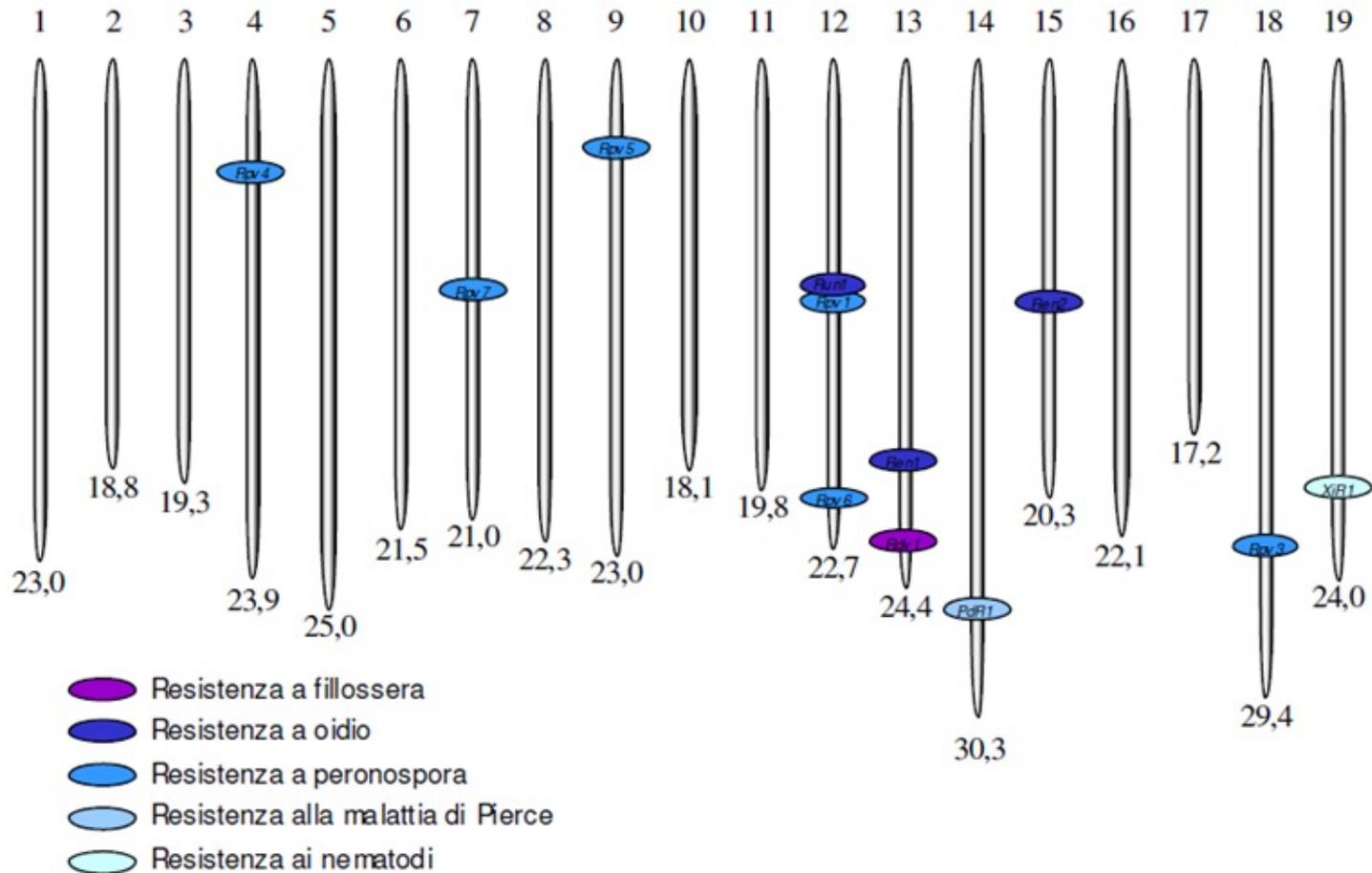
- Kishmish vatkana, Dzhandzhal kara (Uzbekistan)
→ resistenza a oidio, gene Ren1 (Hoffman, 2008)
- Mgaloblishvili (Georgia)
→ resistenza a peronospora, gene Rpv 31 (Toffolatti, De Lorenzis 2018)



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

REGIONI CROMOSOMICHE PIU' SIGNIFICATIVE PER LE RESISTENZE



Da Velasco, 2014



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

GENI DI RESISTENZA IN VITE

3 ≠ classi:

1) Riconoscimento specifico ospite-patogeno es. Rpv3

→ Morte programmata cellula in caso attacco:

 riconoscimento patogeno, formazione di piccole necrosi

→ Preciso, specifico, ma resistenza facilmente superabile!

2) Riconoscimento generico ospite-patogeno es. Ren1

→ Controllo non completo del patogeno, diversi livelli tolleranza

→ Ampio spettro d'azione, non specifico, resistenza difficilmente superabile!



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

GENI DI RESISTENZA IN VITE

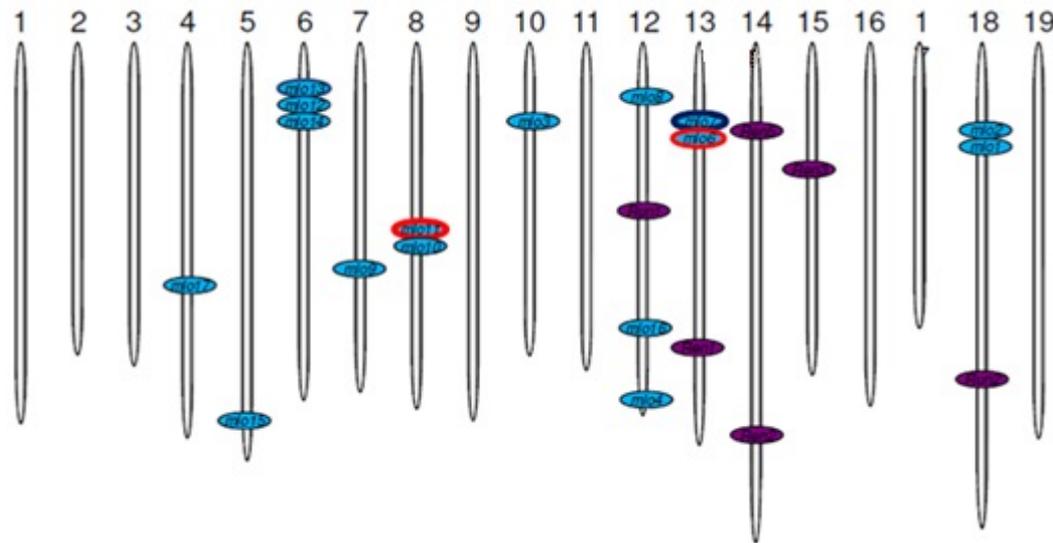
3) Non riconoscimento/Suscettibilità es. MLO6/MLO7/MLO11

pianta produce composti che patogeno deve trovare per poter attaccare ospite

→ Se non prodotti, ospite non riconosciuto → impossibile infezione!

→ Non specifico, difficilmente superabile! Meccanismo ok per genome editing

Mlo gene family in grapevine – distribution along the 19 chromosomes



Brachetto vite suscettibile



Brachetto-mlo07 mutato



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

RESISTENZA A PERONOSPORA

Attualmente identificati 31 geni/QTL Rpv (Toffolatti, 2020),

Pochi effettivamente utilizzati (Stefanini, 2016)!

Rpv 1 e 2: *M. rotundifolia*

Rpv 3: *V. rupestris*, *V. linsecumii*

Rpv 5 e 9: *V. riparia*

Rpv 8, 10 e 12: *V. amurensis*

Rpv 14: *V. cinerea*

+ **Rpv22, Rpv25, Rpv26:** *V. amurensis*



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

RESISTENZA A OIDIO

Attualmente identificati 14 geni/QTL: Ren, Run, MLO (Toffolatti, 2020)

Pochi effettivamente utilizzati (Stefanini, 2016)!

Run 1, 2.1 e 2.2: *M. rotundifolia*

Ren 1: *V. vinifera!*

Ren 2: *V. cinerea*

Ren 3: *V. rupestris?* (in Regent)

Ren 4 e 5: *V. romanetii*

Ren 6 e 7: *V. piasezkii*

Ren 9: *V. rupestris?* (in Regent)

+ **MLO-LIKE:** *V. vinifera*



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

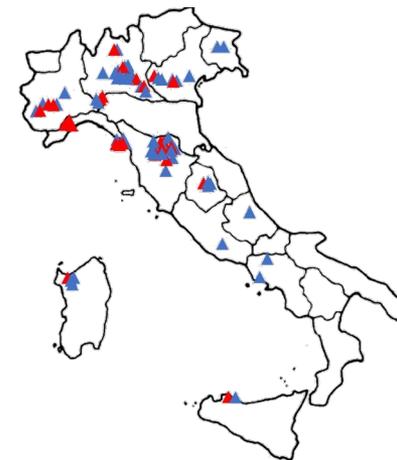


PROBLEMA: SUPERAMENTO RESISTENZA

Continue mutazioni genetiche, evoluzione nei patogeni

Es. ceppi peronospora → grande variabilità genetica,

in Italia 106 ceppi diversi, 2 sottopopolazioni (Fontaine et al., 2020)



INSORGENZA CEPPI CHE SUPERANO RESISTENZE!

Già selezionati ceppi di peronospora che bypassano Rpv3-1
(Zona: Repubblica Ceca, cv Bianca)

→ Causa: coltivazione intensiva, monovarietale

→ Necessaria difesa fitosanitaria preventiva per abbattere carica del patogeno,
pochi trattamenti/anno

→ Necessaria piramidazione dei geni di resistenza

Ideale almeno 2+2, meglio 3+3

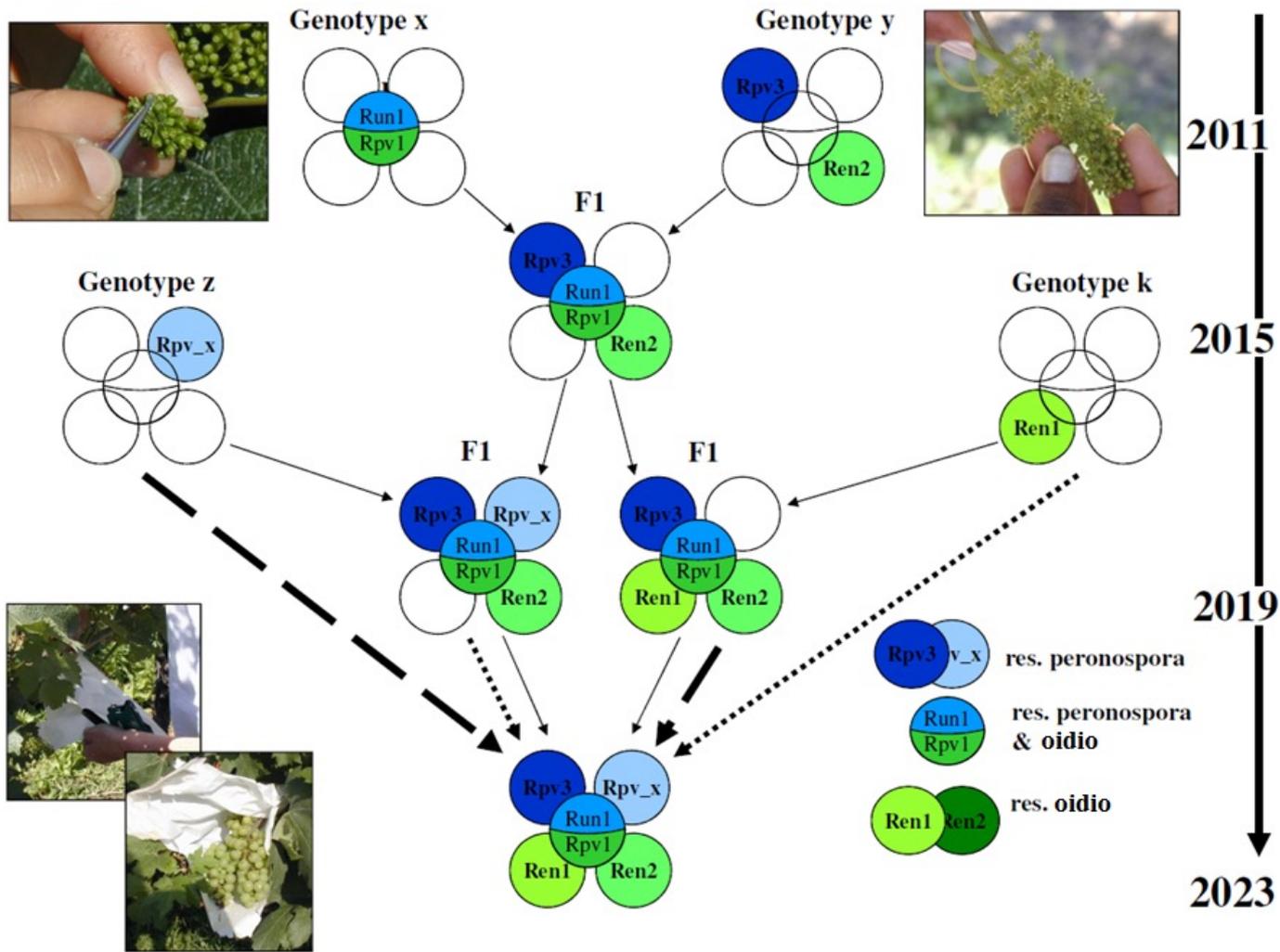
Durevolezza resistenza MA attività complessa,
ereditabili anche caratteri indesiderati!



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

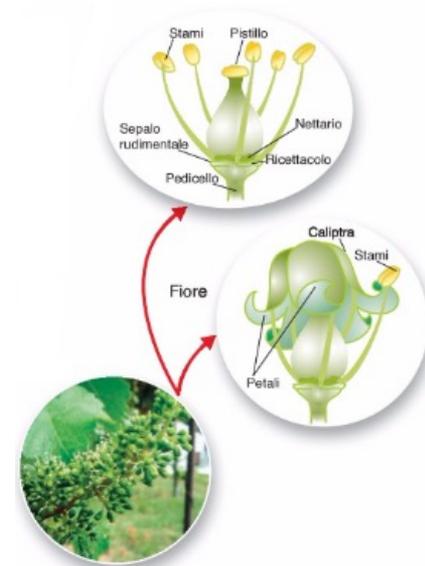
SCHEMA DI PIRAMIDAZIONE GENI RESISTENZA (FEM)



PROCEDURE «OPERATIVE» PER EFFETTUARE L'INCROCIO

Castrazione manuale

Impollinazione



fondazione banfi
SANGUIS JOVIS

PROCEDURE «OPERATIVE» PER EFFETTUARE L'INCROCIO



Copertura e protezione grappoli

Controlli durante la stagione, raccolta



fondazione banfi

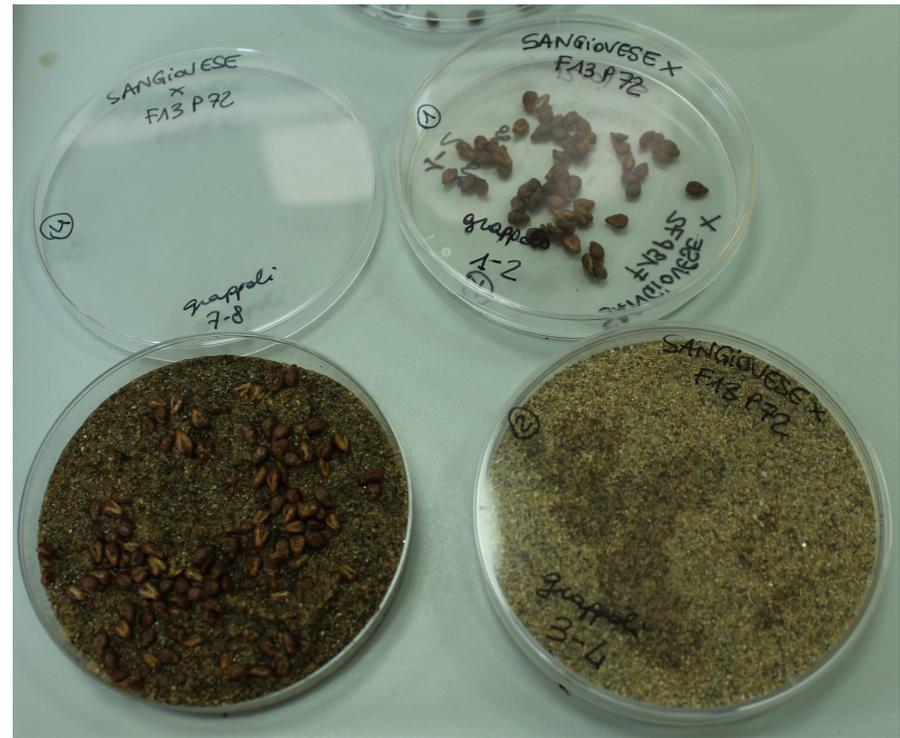
SANGUIS JOVIS

PROCEDURE «OPERATIVE» PER EFFETTUARE L'INCROCIO



Raccolta dei grappoli, separazione dei semi

Vernalizzazione



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

PROCEDURE «OPERATIVE» PER EFFETTUARE L'INCROCIO

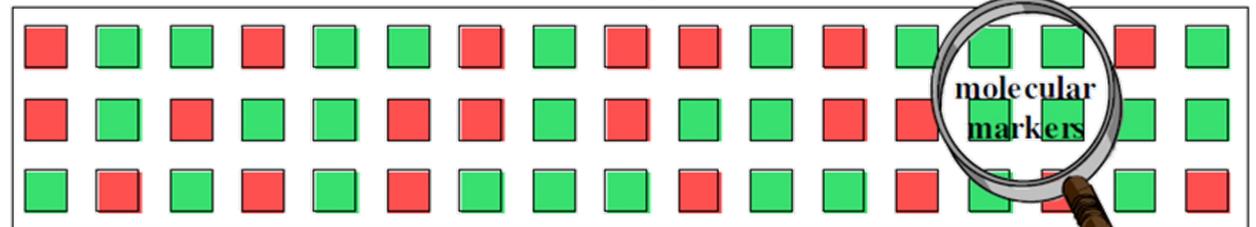


Germinazione semi

Screening per resistenze

Separazione sementali «resistenti»

Selezione fenotipica + Selezione genotipica



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

PROCEDURE «OPERATIVE» PER EFFETTUARE L'INCROCIO



Conservazione semenzali resistenti

Messa a dimora in vigneto

Valutazioni fenotipiche...

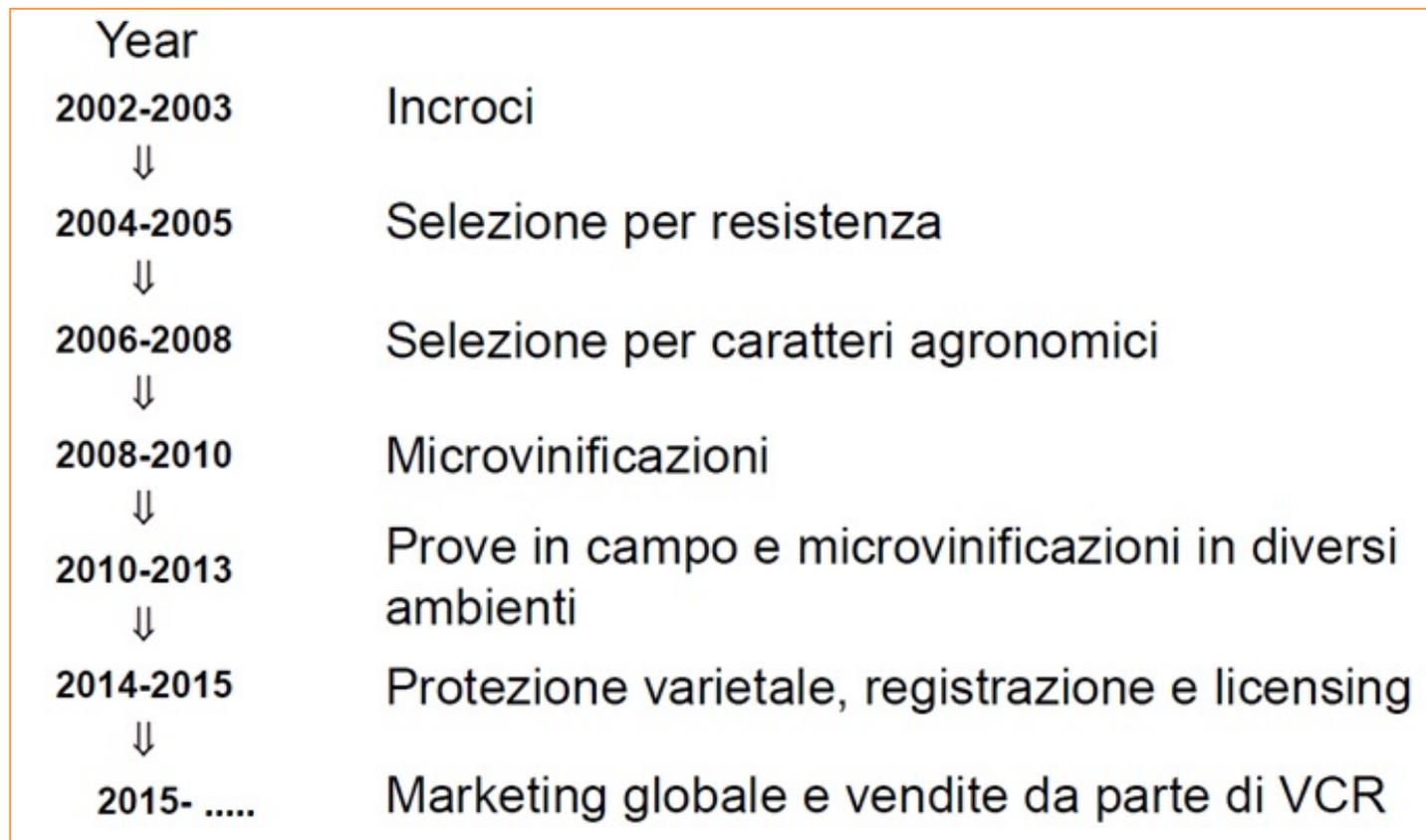


fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

VARIETA' RESISTENTI: TEMPI NECESSARI

Esempio di cronoprogramma – Attività UNIUD/IGA/VCR, primi 10 vitigni resistenti licenziati



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

NEW BREEDING TECHNIQUES (NBT)

Tecnologie di manipolazione genetica di ultima generazione:

→ cisgenesi, genome editing



Oltre OGM, ottenuti per trasformazione «classica» (es. *Agrobacterium tumefaciens*)

PROBLEMA: Sentenza Corte di giustizia europea (documento del 25 luglio 2018)

Genome editing = OGM

Cisgenesi

Trasferimento di porzioni ben precise di DNA tra due piante di = genere/specie

No piante transgeniche, specie sessualmente compatibili

Es. vite: inserimento in cv di *Vitis vinifera* geni di resistenza provenienti da specie «selvatiche»

→ aggiungo gene che potrebbe entrare nel patrimonio genetico anche in maniera casuale, mediante incrocio naturale!



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

NEW BREEDING TECHNIQUES (NBT)

Genome editing (CRISPR/Cas9)

Sistema che può essere utilizzato per indurre modifiche mirate nel genoma nelle piante

- «forbici molecolari», «microchirurgia genetica»

Complesso proteico Cas9 → guidato da una molecola di RNA progettata artificialmente (8-12 bp)

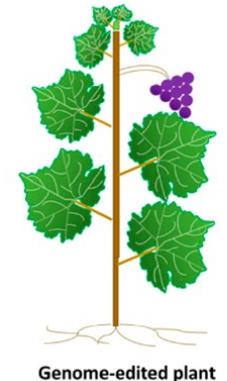
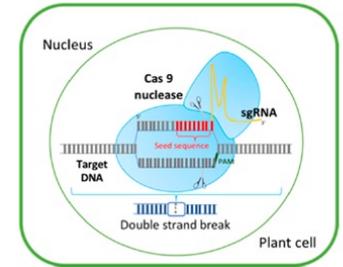
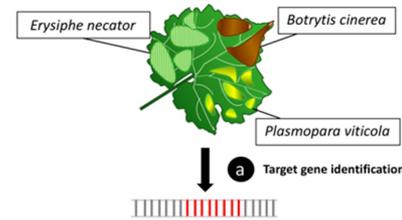
sequenza complementare a gene target

→ porta a rotture del doppio filamento di DNA in corrispondenza del gene target

- NO inserimenti DNA esogeno

→ Necessario supporto della genomica funzionale: individuazione geni target da editare

Es. in vite: silenziamento geni di suscettibilità MLO-like vs oidio



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

CONCLUDENDO...

Obiettivi del Miglioramento Genetico in vite:

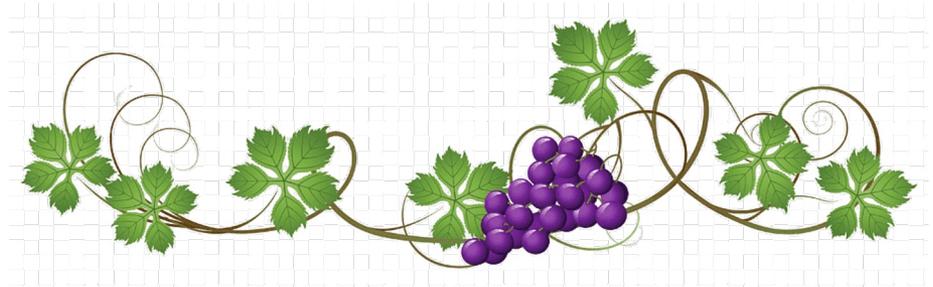
- realizzare e selezionare piante con resistenza ai patogeni
 - + caratteristiche viticole ed enologiche ottimali
 - + capacità di adattamento a stress abiotici

Vitigni resistenti: NON SONO SOLUZIONE DEFINITIVA

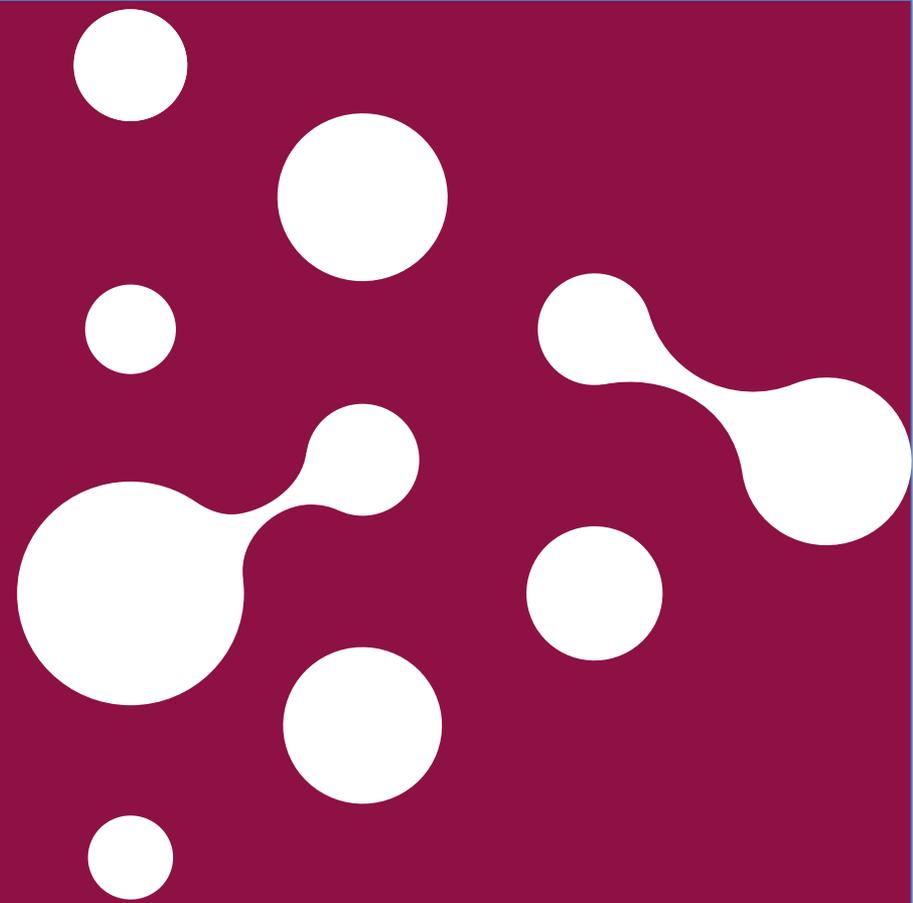
- Necessaria costante ricerca!
- Necessaria selezione di vitigni autoctoni resistenti
- Necessario poter utilizzare NBT!



fondazione banfi
SANGUIS JOVIS



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!



alessandra.zombardo@crea.gov.it



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

fondazionebanfi.it