

Giornata di studio:

Eccellenza del vino e territorio

Firenze, 6 novembre 2013

MARIO PEZZOTTI*, SILVIA DAL SANTO*, SARA ZENONI*, GIOVANNI BATTISTA
TORNIELLI*, MARIANNA FASOLI*, FLAVIA GUZZO*, MASSIMO DELLEDONNE*,

Il *terroir* interpretato attraverso l'espressione del genoma della vite

INTRODUZIONE

Vitigno, annata e *terroir* insieme alla denominazione di origine definiscono sinteticamente un vino. Il disciplinare di produzione esplica analiticamente i dettagli di coltivazione e vinificazione secondo un protocollo derivato sia dalla conoscenza tecnica che dalla tradizione locale. Il vino è la risultante di un complesso processo biologico che deriva dalla profonda interazione della pianta vite con il suo ambiente. Il vitigno è un'entità genetica unica, generalmente rappresentata da uno o pochi individui perfettamente adattati a un territorio e moltiplicati vegetativamente per migliaia o milioni di talee, ovvero, geneticamente parlando, un clone o più cloni. L'uomo ha da secoli capito che per mantenere inalterate le combinazioni genetiche tipiche di un unico individuo, si deve evitare la ricombinazione dei caratteri e quindi la sessualità. La combinazione vite e ambiente è quindi sicuramente unica, cioè, in termini genetici, un'interazione genotipo-ambiente che esprime un particolare e unico fenotipo. L'ambiente in senso lato è l'insieme dei fattori naturali (pedo-climatici, microbici) e antropici (es: tecniche colturali) che influenzano l'espressione dei caratteri.

Il ruolo fondamentale dell'ambiente nella coltivazione della vite e nella produzione di vino era già chiaro agli Egizi, che nel 3000 a.C. riportavano sui recipienti i dati relativi all'annata di produzione, al nome delle aziende produttrici, alla loro ubicazione e al tipo di vino. I romani definivano *Ager Falernum* il luogo di produzione del Falerno, e specificavano nel *Pittacium* (etichetta), apposto sulle anfore, la zona del Falerno, l'annata e il vitigno con cui

* Università di Verona, Dipartimento di Biotecnologie

era stato prodotto il vino, per stabilirne di conseguenza il valore di mercato.

La biologia molto recentemente ha sviluppato conoscenze che hanno consentito la nascita della genomica, una branca della genetica che studia la struttura, la funzione e l'evoluzione dei genomi dei viventi. Il genoma rappresenta il potenziale di una cellula, di un individuo, di una specie, la cui manifestazione dipende dalle complesse interazioni tra le componenti genetiche e ambientali. Nel 2007 sono stati pubblicati i risultati del sequenziamento e dell'analisi dettagliata del genoma della vite (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007). Le due iniziative, una italo-francese e l'altra italo-americana, hanno decodificato rispettivamente il genoma di PN 40024, un clone sperimentale non coltivato di Pinot Nero, e di ENTAV 115, clone largamente diffuso di Pinot Nero. Questi risultati, di grande valenza internazionale e motivo di orgoglio, costituiscono la base di partenza per gli studi futuri e consentiranno l'adozione di metodologie innovative di genomica applicata per sviluppare e rafforzare la viticoltura italiana del XXI secolo.

Inoltre, recentemente, è stato decodificato il genoma della varietà autocotona Corvina, attraverso l'analisi della sequenza del suo clone più diffuso nell'areale veronese (clone 48), per identificarne e studiarne le caratteristiche di tipicità e unicità (Venturini et al., 2013).

Dalla conoscenza del genoma della vite e di tutte le sue varietà coltivate possono essere sviluppati strumenti tecnologici e realizzate applicazioni importantissime, quali: riclassificare con precisione il germoplasma coltivato e selvatico; caratterizzare e identificare con certezza i cloni delle varietà coltivate; individuare i tratti genetici responsabili di caratteristiche di qualità e resistenza; effettuare il miglioramento genetico assistito in tempi brevi e studiare nei dettagli il rapporto genotipo-ambiente. Quest'ultimo punto è di basilare importanza nella viticoltura moderna perché ci consente, attraverso lo studio del genoma e soprattutto della sua attività, di interpretare scientificamente il concetto di *terroir*, cioè definire con esattezza gli elementi genetici che un organismo (es.: clone di una varietà di vite) mette in gioco quando coltivato in un determinato ambiente e come questi elementi partecipino alla definizione qualitativa delle proprietà organolettiche di un vino. Inoltre, attraverso la conoscenza del genoma, si possono delineare le relazioni tra geni e metaboliti di una bacca e successivamente del vino e studiarne le variazioni legate alla stagionalità, all'ambiente e all'opera dell'uomo.

La genomica, quindi, deve servire a definire scientificamente i parametri che compongono il *terroir* e che determinano la tipicità dei prodotti alimentari, per fornire un supporto di comprensione e di rigore scientifico a ciò che l'uomo fino a ora ha solo intuito e applicato con successo.

La plasticità fenotipica si definisce come l'abilità di un organismo con un dato genotipo di cambiare il proprio fenotipo in risposta ad ambienti differenti. Gli organismi vegetali, a causa del loro stile di vita sessile, mostrano una plasticità fenotipica particolarmente ben sviluppata. Molti degli aspetti della biologia dei vegetali che possono essere definiti plastici sono, altresì, di grande importanza ecologica e agronomica come vari tratti morfologici, fisiologici e anatomici, il periodo di sviluppo, di morfogenesi e di riproduzione, il "*bree-ding system*" fino ad arrivare al sistema per il corretto sviluppo della progenie. Studi di carattere molecolare e di genetica quantitativa e comparativa hanno rivelato il carattere precipuamente adattativo della plasticità fenotipica negli organismi vegetali e la sua importanza nella diversificazione ecologica ed evolutiva delle piante (Aubin-Horth and Renn, 2009; Kramer and Havens, 2009; Nicotra et al., 2010; Schlichting and Smith, 2002).

In questo studio la plasticità fenotipica della cultivar Corvina di *Vitis vinifera* è stata analizzata tramite approcci "omici", principalmente trascrittomici e metabolomici. La cultivar Corvina, assieme a Rondinella e Molinara, costituisce la principale componente per la produzione del vino Amarone. Questo vino, oltre al Recioto, rappresenta la tipicità per eccellenza della produzione vinicola della provincia Veronese. Il presente studio era rivolto all'analisi della relazione che intercorre tra il genotipo del clone 48 di Corvina, clone più utilizzato nella pratica viticola locale, e il territorio veronese stesso, le sue caratteristiche fisico-chimiche e le peculiari pratiche agronomiche in esso utilizzate.

RISULTATI

Al fine di studiare la plasticità fenotipica in *Vitis vinifera*, sono state raccolte bacche di uva Corvina a tre diversi stadi di sviluppo durante tre stagioni produttive consecutive (2006, 2007, 2008). Il primo stadio, corrispondente all'invasitura (*veraison*), è il periodo durante il quale la bacca subisce i cambiamenti maggiori, diventando più morbida e dolce, perdendo acidità e assumendo colore e aromaticità. Il secondo e terzo stadio di sviluppo presi in esame corrispondono agli stadi fenologici della pre-maturazione e maturazione. In queste fasi si verifica, nella bacca, un flusso di tipo floematico e l'accumulo di composti volatili e altri metaboliti secondari, determinanti per la formazione dell'aroma, del sapore e del profumo caratteristici di un vino quali i terpenoidi e i polifenoli (Coombe and McCarthy, 2000).

Le bacche raccolte provenivano da undici aziende viti-vinicole presenti nel territorio veronese. Le imprese agricole prese in esame, tutte coltivanti il

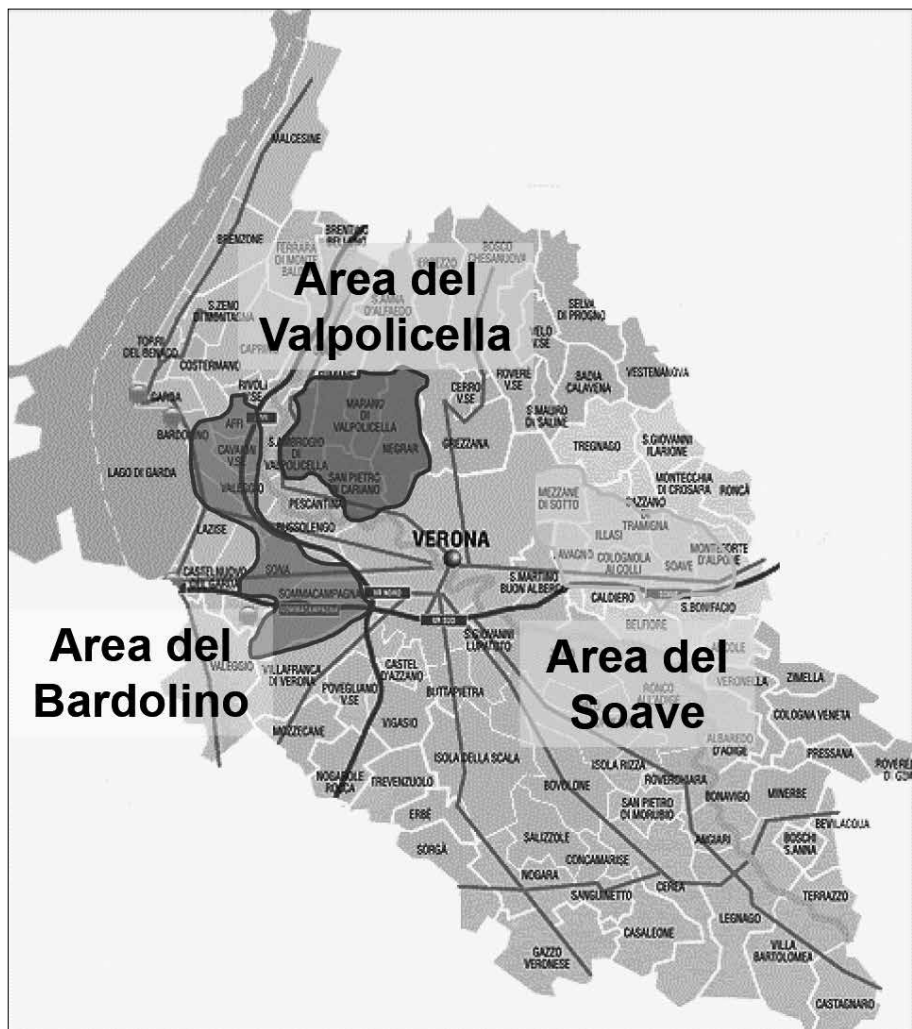


Fig. 1 *Rappresentazione schematica delle aree viti-vinicole del territorio veronese interessate dal campionamento di bacche di Corvina*

clone 48 di Corvina, si distribuiscono su tre macro-aree geografiche: Soave, Bardolino e Valpolicella, le più importanti per la produzione di vino locale (fig. 1). Si è proceduto alla caratterizzazione delle aziende viticole sulla base di attributi ambientali e pratiche agronomiche utilizzate. Le caratteristiche prese in esame per questo studio sono state: l'altitudine del vigneto (da 100 a 450 metri sul livello del mare), il tipo di suolo (da sabbioso ad argilloso e da poco ad altamente calcareo), l'età del vigneto (da 6 a 18 anni). Per quanto

riguarda le pratiche agronomiche e di allevamento si è deciso di considerare, per ogni azienda, la forma di allevamento utilizzata (spalliera Guyot o forme a pergola), la direzione dei filari (nord-sud o est-ovest), il sesto d'impianto, e il particolare portainnesto utilizzato (K5BB, 420A, 41B, SO4).

Il campionamento delle bacche è stato effettuato raccogliendo, in un'unica data per tutte le 11 diverse aziende, circa 20-30 grappoli lungo tutto il filare, per ottenere un campione più omogeneo e rappresentativo; per ogni grappolo, si sono selezionate circa 100 bacche, scartando quello che manifestavano chiari segni di danni dovuti ad agenti esterni. Per ogni pool di bacche campionato, circa la metà delle bacche è stata usata per un'analisi fisico-chimica delle bacche stesse e per analisi enologiche sul succo derivante. Inoltre, sono state eseguite analisi enologiche anche sui mosti e i vini, ottenuti mediante tecniche di micro-vinificazione.

La parte restante delle bacche campionate è stata congelata in azoto liquido e conservata a -80°C , al fine di mantenere inalterate le caratteristiche fisiologiche delle bacche stesse. Da queste bacche, private dei semi, sono stati estratti i metaboliti, successivamente analizzati tramite spettrometria di massa e i trascritti. In particolare, per lo studio del trascrittoma, è stato deciso di utilizzare la piattaforma NimbleGen e di ibridare i trascritti estratti dai vari campioni sul microarray *NimbleGen 090918_Vitus_exp_HX12*, il cui design è basato sulla nuova annotazione V1 del genoma di vite. In totale sono state effettuate 171 ibridazioni.

Attraverso lo studio dell'espressione genica globale delle bacche della cultivar Corvina, si è potuto evincere che il trascrittoma di vite è altamente plastico durante le varie annate prese in esame e che esso può caratterizzare annate con un andamento meteorologico standard da un'annata con un andamento significativamente diverso e più sfavorevole. L'annata 2007, infatti, è stata caratterizzata in tutta la regione da un periodo eccezionalmente caldo specialmente nel mese di aprile (Tomasi et al., 2011), quando la vite si trova nella sua fase fenologica di germogliamento (fig. 2A). L'analisi trascrittomica, effettuata per i tre anni su di un numero ristretto ma ugualmente significativo di aziende, durante i tre stadi di sviluppo della bacca sopra descritti, ha evidenziato come l'effetto di questa variabilità meteorologica sia più evidente rispetto alla variabilità esistente tra le singole aziende. Infatti, il dendrogramma derivante da un'analisi di correlazione (Distanza di Pearson, $p < 0,01$) riportato in figura 2B mostra chiaramente che il trascrittoma delle bacche prelevate nel 2007 si distanzia in modo significativo dal trascrittoma delle bacche prelevate nelle annate 2006 e 2008, in maniera indipendente dal sito (azienda) di campionamento. Questo risultato indica

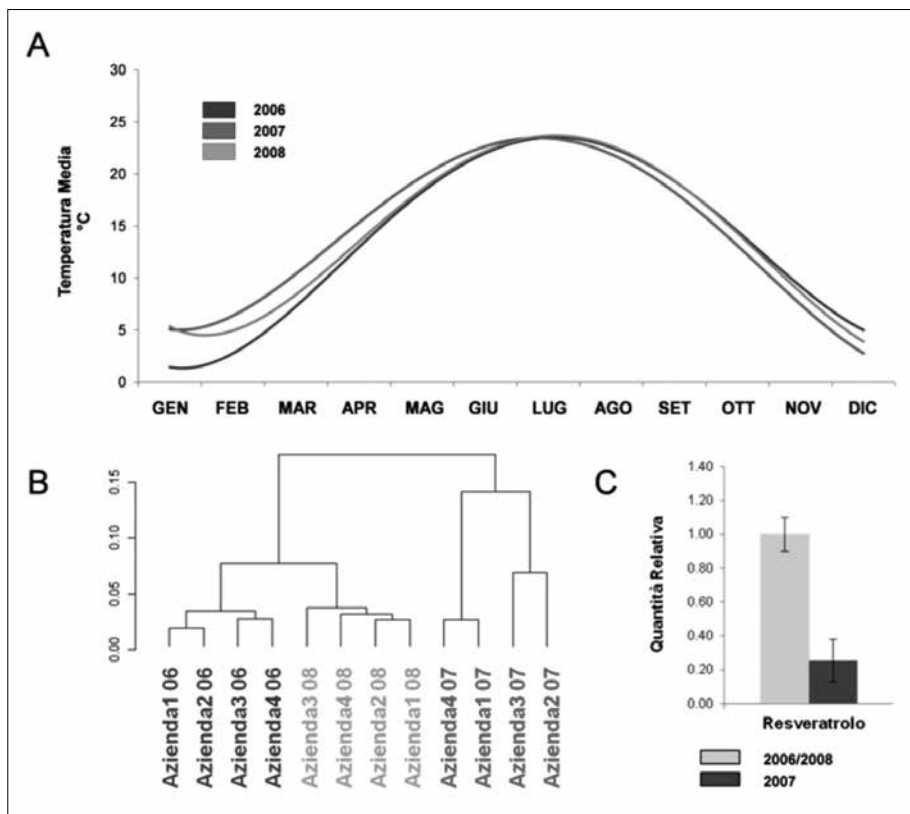


Fig. 2 (A) Andamento tendenziale della temperatura media registrata nelle aree interessate dal campionamento di bacche di Corvina nelle annate 2006, 2007 e 2008. (B) Dendrogramma dei trascrittomi di bacche di vite prelevate da 4 aziende diverse durante tre annate. I valori di correlazione di Pearson sono convertiti in coefficienti di distanza per definire l'altezza del dendrogramma. (C) Contenuto relativo in Resveratrolo di bacche di vite prelevate nelle annate 2006 e 2008 (average) and 2007

chiaramente che piante di vite esposte a variazioni meteorologiche attivano un sistema di risposta plastico che può essere sfruttato dal produttore per ottenere una standardizzazione della qualità del prodotto finale. Non a caso, i geni che presentano una variazione trascrizionale più ampia tra annate meteorologicamente standard – 2006/2008 – e un'annata tendenzialmente più calda – 2007 – sono geni coinvolti nella produzione dei metaboliti secondari importanti perché caratterizzano il vino a livello qualitativo e sensoriale. Molti membri della famiglia genica delle stilbene sintasi, ad esempio, sono caratterizzati da espressione genica significativamente diversa fra i due tipi di annata. Questo enzima è coinvolto nella biosintesi dei fenilpropanoidi, e

in particolar modo nella sintesi del resveratrolo, un particolare fenolo molto noto per le importanti proprietà benefiche per la salute dell'uomo (Gatto et al., 2008).

La over-espressione dei geni codificanti le stilbene sintasi in annate meteorologicamente standard rispetto ad annate più calde è stata verificata analizzando a livello metabolico il contenuto di resveratrolo del succo di uve campionate nei rispettivi tipi di annata (fig. 2C), trovando una evidente correlazione tra risultati ottenuti con approcci diversi, trascrittomico e metabolico, partendo dallo stesso materiale biologico.

Per la seconda parte del progetto è stata presa in considerazione un'annata dall'andamento meteorologico standard, quale il 2008, ampliando il numero di aziende studiate a 11. Dall'analisi trascrittomico di questi campioni si è potuto notare come la plasticità fenotipica sia un fenomeno ben rappresentato in vite: circa il 5% del totale dei trascritti, infatti, è utilizzato dal genoma del clone 48 per risposte e arrangiamenti plastici. Durante lo sviluppo della bacca, cioè, circa 1500 geni mostrano una modulazione significativamente diversa nelle varie aziende, dipendente cioè unicamente dal sito di allevamento delle vigne (Analisi non parametrica Kruskal-Wallis, $p < 0,01$).

Inoltre, utilizzando approcci statistici di tipo multivariato, sono state studiate le relazioni che intercorrono tra gli 11 siti di prelevamento del materiale biologico. I trascrittomi delle bacche provenienti dalle varie aziende si separano in 5 gruppi principali, quando analizzati con l'analisi statistica della O2PLS-DA (*Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*). Ciò indica che l'allevamento della cultivar Corvina in aziende con caratteristiche diverse può provocare risposte simili a livello trascrizionale (fig. 3). Alcuni gruppi di geni plastici, difatti, potrebbero essere impiegati dalla pianta in modo uguale come reazione ad ambienti diversi. In particolare, le aziende facenti parte di ogni singolo gruppo statistico sono caratterizzate dall'uso di diverse combinazioni di pratiche agronomiche: la forma di allevamento utilizzata (spalliera Guyot o forme a pergola), la direzione dei filari (nord-sud o est-ovest) e il particolare portainnesto utilizzato (K5BB, 420A, 41B, SO4). Questo risultato suggerisce che la plasticità fenotipica di vite sarebbe influenzata più dalle pratiche agronomiche, da scelte e tecniche apportate dall'uomo, piuttosto che dagli attributi ambientali del sito ove sorge la particolare azienda viti-vinicola. Quest'ultimi, infatti, non risultano significativi all'analisi statistica.

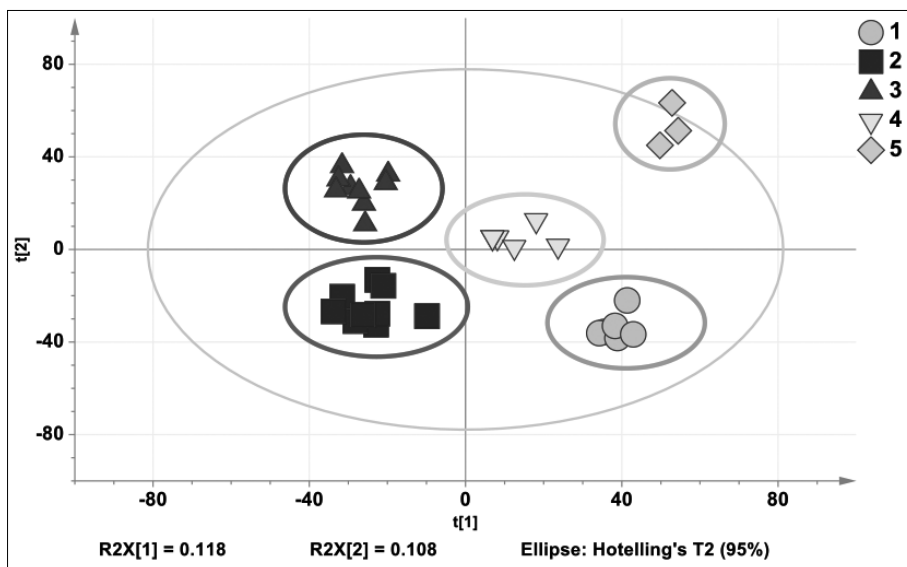


Fig. 3 Rappresentazione schematica della clusterizzazione a 5 gruppi del “dataset” dopo analisi con O2PLS - DA (Simca-P 12.0)

CONCLUSIONI

La plasticità fenotipica del clone 48 della cultivar Corvina di *Vitis vinifera* è stata valutata mediante approcci “omici”, principalmente trascrittomici, metabolomici ed enologici, su campioni di bacche provenienti da vitigni di aziende del territorio veronese.

Le variazioni di trascritti e metaboliti sono state messi in relazione con specifiche caratteristiche ambientali e con le diverse pratiche agronomiche utilizzate. Se ne è evinto che il trascrittoma di vite risponde e si plasma più in base ad attività e consuetudini agronomiche apportate dall’uomo che a caratteristiche prettamente naturali, come il tipo di suolo, l’altitudine o l’età del vigneto. Grazie all’ampio campionamento, protrattosi nell’arco di tre annate vitivinicole, si è potuto anche verificare come il trascrittoma di vite reagisca in modo plastico a eventi atmosferici specifici di ogni stagione produttiva.

Da questo studio si possono trarre alcuni benefici pratici per la coltivazione di vite e la produzione di vino di qualità costante nel tempo. Innanzi tutto, all’atto di programmazione, organizzazione e impianto di un nuovo vitigno il produttore potrà considerare quali pratiche agronomiche utilizzare (forma di allevamento, tipo di orientazione del filare, portainnesto) in relazione alle

caratteristiche di vino che desidera ottenere (maggior contenuto in polifenoli, maggior contenuto in zuccheri riduttori ecc.).

Secondariamente, tramite campionamenti su piccola scala, analisi trascrittomiche e monitoraggio di alcuni geni "markers", il produttore potrà fare una stima dell'andamento della stagione produttiva in relazione a eventi atmosferici (ad esempio, un forte innalzamento della temperatura durante la fioritura) e agire di conseguenza con pratiche di "viticoltura assistita".

RIASSUNTO

La plasticità fenotipica si definisce come l'abilità di un organismo con un dato genotipo di cambiare il proprio fenotipo in risposta ad ambienti differenti. La plasticità fenotipica della cultivar Corvina di *Vitis vinifera* è stata analizzata tramite approcci "omici", principalmente trascrittomici e metabolomici. Il presente studio è volto all'analisi della relazione che intercorre tra il genotipo del clone 48 di Corvina, clone più utilizzato nella pratica vinicola locale, e il territorio veronese stesso, le sue caratteristiche fisico-chimiche e le peculiari pratiche agronomiche in esso utilizzate. Sono state raccolte durante tre stagioni produttive consecutive (2006, 2007, 2008) bacche di uva Corvina in tre diversi stadi di sviluppo. Le bacche raccolte per questo lavoro di ricerca provenivano da undici aziende viti-vinicole presenti nel territorio veronese. Le variazioni di trascritti e metaboliti sono state messi in relazione con specifiche caratteristiche ambientali e con le diverse pratiche agronomiche utilizzate.

ABSTRACT

Phenotypic plasticity refers to the range of phenotypes a single genotype can express as a function of its environment. These phenotypic variations are attributable to the effect of the environment on the expression and function of genes influencing plastic traits. We investigated phenotypic plasticity in grapevine by comparing the berry transcriptome in a single clone of the vegetatively-propagated common grapevine species *Vitis vinifera* cultivar Corvina through 3 consecutive growth years cultivated in 11 different vineyards in the Verona area of Italy. Our data reveal candidate genes potentially responsible for the phenotypic plasticity of grapevine and provide the first step towards the characterization of grapevine transcriptome plasticity under different agricultural systems.

BIBLIOGRAFIA

AUBIN-HORTH N. AND RENN S.C. (2009): *Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity*, «Mol Ecol», 18, pp. 3763-3780.

- COOMBE B.G. AND MCCARTHY M.G. (2000): *Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening*, «Australian Journal of Grape and Wine Research», 6, pp. 131-135.
- GATTO P., VRHOVSEK U., MUTH J., SEGALA C., ROMUALDI C., FONTANA P., PRUEFER D., STEFANINI M., MOSER C., MATTIVI F. AND VELASCO R. (2008): *Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes*, «J Agric Food Chem», 56, pp. 11773-11785.
- JAILLON O., AURY J.M., NOEL B., POLICRITI A., CLEPET C., CASAGRANDE A., CHOISNE N., AUBOURG S., VITULO N., JUBIN C. ET AL. (2007): *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*, «Nature», 449, pp. 463-467.
- KRAMER A.T. AND HAVENS K. (2009): *Plant conservation genetics in a changing world*, «Trends Plant Sci», 14, pp. 599-607.
- NICOTRA A.B., ATKIN O.K., BONSER S.P., DAVIDSON A.M., FINNEGAN E.J., MATHESIU U., POOT P., PURUGGANAN M.D., RICHARDS C.L., VALLADARES F. AND VAN KLEUNEN M. (2010): *Plant phenotypic plasticity in a changing climate*, «Trends Plant Sci», 15, pp. 684-692.
- SCHLICHTING C.D. AND SMITH H. (2002): *Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes*, «Evolutionary Ecology», 16, pp. 189-211.
- TOMASI D., JONES G.V., GIUST M., LOVAT L. AND GAIOTTI F. (2011): *Grapevine Phenology and Climate Change: Relationships and Trends in the Veneto Region of Italy for 1964-2009*, «American Journal of Enology and Viticulture», 62, pp. 329-339.
- VELASCO R., ZHARKIKH A., TROGGIO M., CARTWRIGHT D.A., CESTARO A., PRUSS D., PINDO M., FITZGERALD L.M., VEZZULLI S., REID J. ET AL. (2007): *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*, PLoS One 2, e1326.
- VENTURINI L., FERRARINI A., ZENONI S., TORNIELLI G.B., FASOLI M., DAL SANTO S., MINIO A., BUSON G., TONONI P., ZAGO E.D. ET AL. (2013): *De novo transcriptome characterization of Vitis vinifera cv. Corvina unveils varietal diversity*, «BMC genomics», 14, p. 41.