

Studi sui tratti di qualità negativa nelle nuove viti mediamente resistenti alle malattie fungine

Marco Stefanini^{1,*}, Verena Grati², Paola Bettinelli¹, Elena Zini³, Thomas Letschka³, Sonja Sturm², Riccardo Velasco⁴, Hermann Stuppner², Iuliia Khomenko¹, Daniela Eisenstecken³, Peter Robatscher³, Giulia Chitarrini^{3,1}, Ulrich Pedri³ and Vezzulli Silvia¹

¹ Centro di Ricerca e Innovazione, Fondazione E. Mach, Via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN) Italia

² Istituto di Farmacia/Farmacognosia, Centro per le Bioscienze Molecolari Innsbruck, Università di Innsbruck, Innrain80/82, Innsbruck 6020 Austria

³ Centro di Sperimentazione Laimburg, Laimburg 6, 39052 Vadena (BZ) Italia

⁴ CREA Centro di Ricerca per la Viticoltura e l'Enologia, Via XXVIII Aprile 26, 31015 Conegliano (TV) Italia

Abstract. The varieties of vines tolerant to the main fungal diseases are the object of growing interest because they require fewer treatments for the production of quality grapes. These varieties are considered qualitatively unsuitable especially for some characteristics such as the foxy aroma, the level of anthocyanin diglucosides and the level of methyl alcohol in wines. In the three-year period 2016-2018, from a population of 74 medium resistant varieties placed in a single collection, in Marleno (BZ), young leaves were taken for DNA analysis; annually 2 surveys of the OIV 452 453, 455 and 456 descriptors were carried out, and, at 18° Brix, sambunches were collected for the analysis of different metabolites. Nano-vinifications were carried out for 32 genotypes. Genotypes with different levels of stacked loci associated with resistance to downy and powdery mildew were detected, with different resistance behaviors over the years. Only some genotypes have aromas of foxy and only 20% of the genotypes analyzed have levels of anthocyanin diglucosides higher than the levels required by current legislation. Some vinifications showed methanol levels higher than the legal limit set. High percentages of genotypes respected the legal levels of metabolites required by current regulations and only genotypes with the presence of *V. labrusca* showed the aroma of foxy.

1 Introduzione

Le varietà di viti tolleranti alle principali malattie fungine sono oggetto di interesse crescente perché necessitano, per la produzione di uve di qualità, di un numero di trattamenti inferiore. Queste varietà [6] derivano da diversi piani di breeding sviluppati in vari stati europei che introducono diverse fonti di resistenza derivanti sia da *Vitis* americane che da *Vitis* asiatiche. Effettivamente il livello qualitativo dei fenotipi ottenuti dal primo incrocio tra *V. vinifera* e *Vitis* con resistenza (*V. lincencumi*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris*) risultava non soddisfacente e solo l'intensa attività di reinrocio con genotipi di *V. vinifera* ha permesso di raggiungere livelli qualitativi dei vini paragonabili a quelli ottenuti da varietà di *V. vinifera* [1]. Inoltre questa attività di incrocio, attiva in alcuni centri di ricerca in Europa, permette di selezionare genotipi adatti alle condizioni climatiche odierne che risultano diverse da quelle presenti quando sono state selezionate le attuali varietà coltivate. Quindi queste nuove varietà risultano molto interessanti dal punto di vista della sostenibilità del vigneto perché non necessitano una copertura antifungina come le varietà di *vinifera* coltivate e presentano inoltre un livello di adattamento alle condizioni climatiche attuali delle diverse zone di coltivazione. Normalmente queste varietà sono considerate qualitativamente non adatte alla produzione di vino soprattutto per alcuni caratteri come il contenuto di antranilato di etile e di antranilato di metile (aroma

foxy), il livello degli antociani diglucosidi e il livello di alcool metilico nei vini. L'aroma foxy è un carattere qualitativo presente nelle uve con background di *V. labrusca* e *Muscadinia rotundifolia*, mentre gli antociani 3-5 diglucosidi non hanno nessun effetto né di tipo salustistico né di tipo qualitativo. Problematico il contenuto di alcool metilico sicuramente con risvolti salustistici, ma ampiamente superato dalle tecniche di fermentazione delle varietà ammesse alla coltivazione. Nel presente lavoro sono stati verificati i livelli di tali composti in un'ampia popolazione di genotipi resistenti, posti in condizioni pedoclimatiche uniformi.

2 Materiali e metodi

Si è analizzata una popolazione di 74 varietà [2], con livelli diversi di resistenza coltivate in un unico appezzamento, nel comune di Marleno (BZ), per il triennio 2016-2018. Sono state prelevate giovani foglie per l'analisi del DNA; durante la stagione sono stati realizzati due rilievi mediante i descrittori OIV 452, 453, 455 e 456 [5], e raggiunti i 18 °Brix, sono stati raccolti grappoli per le analisi metabolomiche, descritte nei paragrafi seguenti. Per 32 genotipi sono state realizzate nanovinificazioni, di cui 18 a bacca rossa

3 Risultati

* Corresponding author: marco.stefanini@fmach.it

3.1. Analisi della resistenza su foglie e grappoli

I singoli genotipi sono stati analizzati per definire il loro patrimonio in *R* loci legati al carattere di resistenza a peronospora e oidio.

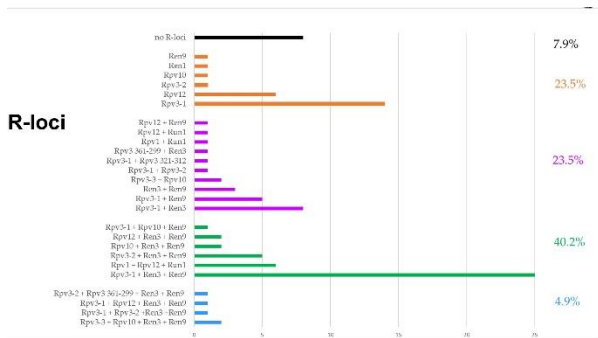


Fig. 1 Distribuzione degli 11 *R* loci conosciuti più importanti ed affidabilmente esaminabili nella popolazione in oggetto: 5 associati alla resistenza a peronospora (*Rpv1*, *Rpv3*, *Rpv10*, *Rpv12*, *Rpv14*) e 6 associati alla resistenza a oidio (*Run1*, *Run2*, *Ren1*, *Ren3*, *Ren9*).

Questa analisi [3], come riportato in Figura 1, evidenzia come i genotipi analizzati presentino livelli differenti di piramidazione per i diversi caratteri. In particolare, il 7% dei genotipi valutati non presenta *R* loci analizzati, il 23,5% presenta un unico *R* locus tra quelli analizzati e 23,5% ne presenta 2 di cui la maggioranza ha *R* loci associati alla resistenza sia alla peronospora che all'oidio. Il 40,2% presenta 3 *R* loci e il 4,9% presenta combinazioni di 4 *R* loci, collegati ad entrambi i caratteri.

Per quanto riguarda la resistenza a peronospora (Figura 2A), i singoli loci *Rpv10* e *Rpv12* hanno mostrato un grado significativamente più alto di resistenza in campo valutato nei 3 anni sulle foglie rispetto ai genotipi con il singolo *Rpv3-1*. Per quanto riguarda i grappoli, questo grado più alto è confermato solo per il confronto tra *Rpv12* e *Rpv3-1*. I genotipi che portano *Rpv1+Rpv12* hanno manifestato una resistenza significativamente maggiore rispetto ai singoli genotipi *Rpv3-1* sia a livello di foglia che di grappolo.

Per quanto riguarda solo i grappoli, la resistenza a peronospora è stata significativamente più alta nei genotipi contenenti *Rpv10* insieme a *Rpv3-3* rispetto ai genotipi con i singoli *Rpv3-1* e *Rpv3-2*. Nessun altro *R* locus (singolo o piramidizzato) presentava differenze significative. È interessante notare che i genotipi che non presentavano locus *Rpv* si sono rivelati non essere significativamente più suscettibile tranne che in confronto con genotipi *Rpv3-3+Rpv10* a livello di grappolo. I nostri risultati evidenziano che i singoli gruppi di geni coinvolti nei processi di resistenza provenienti da *V. amurensis* (*Rpv10* e *Rpv12*) garantiscono una forte barriera contro il patogeno, sebbene non sembrano trarre beneficio dalla presenza di altri loci *Rpv* studiati.

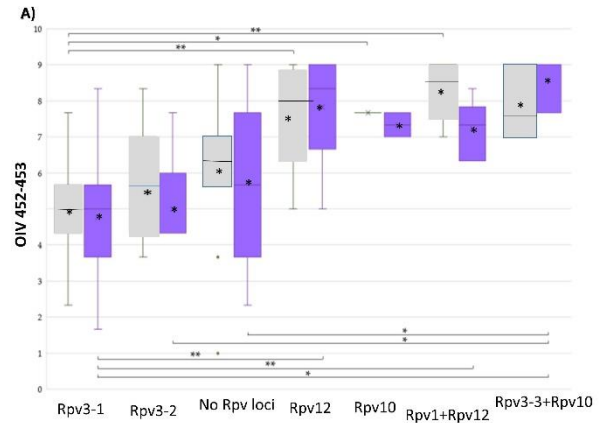


Fig. 2A. Valutazione della resistenza in campo alla peronospora su foglie (grigio) e grappoli (nero) su accessioni a grappolo in funzione della presenza di loci di resistenza (*R*). Per ciascun genotipo, i punteggi dell'OIV sono stati calcolati come media su 3 anni. Per ogni anno, è stato scelto il punteggio più basso tra le valutazioni. I grafici a riquadri mostrano le mediane con la linea mediana e le medie con x. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

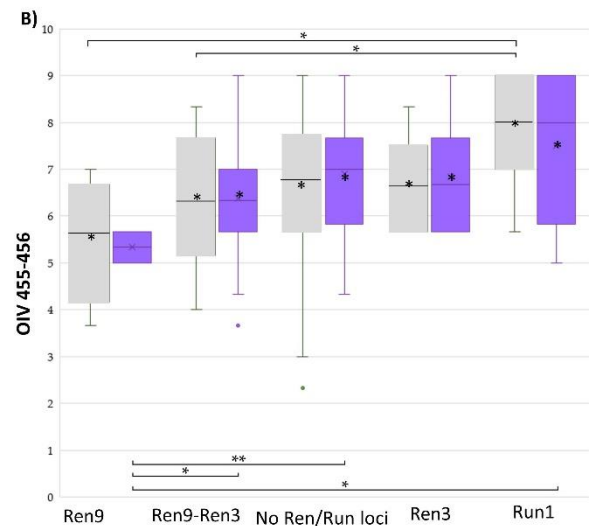


Fig. 2B. Valutazione della resistenza in campo all'oidio su foglie (grigio) e grappoli (nero) su accessioni a grappolo in funzione della presenza di loci di resistenza (*R*). Per ciascun genotipo, i punteggi dell'OIV sono stati calcolati come media su 3 anni. Per ogni anno, è stato scelto il punteggio più basso tra le valutazioni. I grafici a riquadri mostrano le mediane con la linea mediana e le medie con x. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Per quanto riguarda la resistenza a oidio (Figura 2B), i genotipi che portano *Run1* hanno mostrato una resistenza significativamente maggiore rispetto a genotipi con *Ren9* singolo e *Ren3+Ren9* piramidizzati a livello fogliare. Sui grappoli, sia *Run1* che *Ren3+Ren9* hanno mostrato una resistenza significativamente maggiore rispetto al singolo *Ren9*.

Nel caso del singolo locus *Ren9*, il livello di resistenza del grappolo è diminuito anche rispetto alle accessioni senza alcun locus *R* studiato, indicando una forte mancanza di efficienza di resistenza di questo singolo locus. I nostri risultati mostrano che *Run1* conferisce un valore molto forte di resistenza derivata da

Muscadinia rispetto agli altri loci derivati da *Vitis* spp. A differenza dei loci *Rpv*, il confronto dei loci *Ren* ha rivelato che la piramidazione (cioè *Ren3+Ren9*) permette il rafforzamento della resistenza all'oidio a livello del grappolo, l'organo più delicato e rilevante della vite. Durante l'osservazione di sette genotipi senza alcun *R* locus noto, due di loro hanno mostrato un alto livello di punteggi OIV ($7 <$ descrittore OIV medio < 9) sia nelle foglie che nei grappoli per la peronospora, e nei grappoli per l'oidio, mentre la resistenza fogliare contro l'oidio era < 7 . Inoltre, un genotipo è risultato ad alta resistenza alla peronospora e oidio solo nei grappoli, mentre la resistenza fogliare alla peronospora era < 7 . Per i restanti tre genotipi i livelli del punteggio medio dell'OIV sono stati medi ($5 <$ descrittore OIV medio < 7) su entrambi gli organi per entrambi i funghi. Se consideriamo la resistenza alla singola malattia, dieci genotipi sono risultati privi di loci *Rpv* e 34 di loci *Run/Ren*. Il 50% dei genotipi senza alcun locus *Rpv* selezionabile ha rivelato un punteggio OIV medio ≥ 5 , risulta essere invece del 94 % la percentuale di genotipi senza alcun locus *Run/Ren* che hanno mostrato un punteggio OIV medio > 5 . In generale, i genotipi che non mostrano loci *R* analizzati potrebbero indicare la presenza di loci minori (nel caso di punteggi fenotipici medio-bassi) o anche la scoperta di nuovi loci *R*, non ancora identificati (in caso di punteggi fenotipici elevati). Questi genotipi vanno considerati risorse preziose nell'ottica della piramidazione verso una resistenza durevole.

3.2. Composizione delle uve

L'analisi realizzata sulle uve [4], raccolte a maturazione tecnologica ha messo in evidenza una variabilità tra i genotipi analizzati dovuta ai contenuti di antocianine 3-5 diglicosidi; questo rivela quindi la presenza di alcuni genotipi caratterizzati da valori molto elevati ed altri invece da valori molto bassi di tali composti; questi ultimi più simili ai genotipi di *V. vinifera*. I genotipi LEON MILLOT, CABERNET CORTIS, LU1 e LU2 nei diversi anni di indagine risultano avere livelli più elevati rispetto ad altri genotipi presi in esame che presentano livelli simili al PINOT NERO, varietà di *V. vinifera* (Figura 3).

Tramite un approccio mirato, 60 composti fenolici sono stati analizzati e quantificati utilizzando un metodo UHPLC-MS/MS, inclusi antociani, flavanoli, flavan-3-oli e stilbeni. Il contenuto di polifenoli totali risulta essere simile nelle linee di progenie sconosciute e nelle linee di riproduzione ben note, tuttavia, la progenie ha mostrato valori medi più elevati di flavan-3-oli e flavonoli. Inoltre, le accessioni bianche hanno mostrato contenuti più elevati di flavan-3-oli e flavonoli rispetto alle accessioni rosse. Per quanto riguarda gli stilbeni, le linee di riproduzione risultano avere un livello medio più alto di stilbeni con valori medi di 10,50 mg/kg FW rispetto alle linee di progenie con 5,40 mg/kg FW. Il *trans*-resveratrolo è stato rilevato nell'87,9% dei genotipi totali nel 2017 e nel 65,5% nel 2018. Poiché sono state prese in considerazione le accessioni bianche

e rosse, si sono registrati livelli di antocianine estremamente variabili all'interno degli ibridi di vite studiati. In dieci ibridi rossi, la malvidina-3,5-diglicoside è stata rilevata in entrambi gli anni con un contenuto massimo di 1,236 mg/kg FW nell'accessione LU2. Inoltre, le heat map e l'analisi dei cluster hanno consentito il confronto diretto delle accessioni in base ai loro profili fenolici. L'analisi statistica ha mostrato una correlazione significativamente positiva del contenuto delle classi fenoliche osservate tra il 2017 e il 2018 (Figura 3, 4A e 4B).

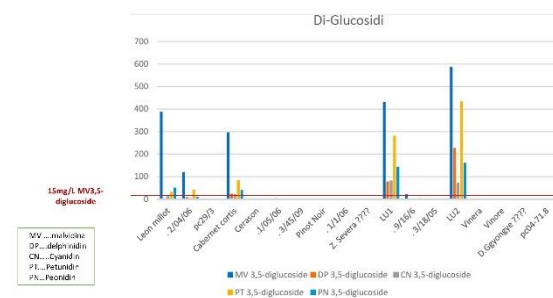


Fig. 3. Quantificazione delle antocianine 3-5 diglicosidi di alcuni genotipi analizzati espressa in mg/kg.

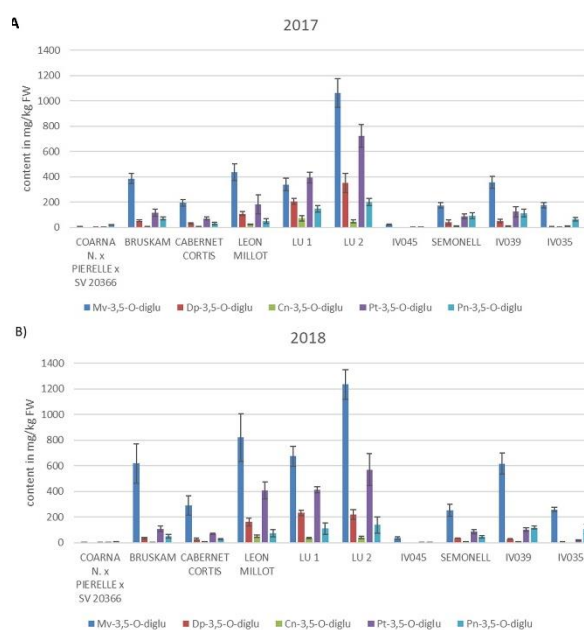


Fig. 4A-B. Contenuto di antociani diglicosidi in dieci accessioni di vite (misurato tramite LC-MS/MS) in due anni consecutivi espresse in mg/kg.

I composti organici volatili (VOCs) contribuiscono all'aroma dell'uva; tutte le accessioni di vite sono state analizzate tramite HS-SPME-GC-MS (Headspace Solid Phase Microextraction – Gas Chromatography). Il 2-ottanolo è stato utilizzato come standard interno e ha consentito la semi-quantificazione dei composti organici volatili. L'indice di ritenzione sperimentale di ciascun composto è stato calcolato utilizzando una serie di n-alcani (C8-C20) nelle stesse condizioni sperimentali dei campioni. L'identificazione dei composti è stata

effettuata mediante il confronto dello spettro di massa del composto stesso con gli spettri di riferimento del database internazionale (NIST 17) e mediante l'iniezione di composti di riferimento. Per quanto riguarda le bacche, sono stati identificati e quantificati dodici composti, inclusi i monoterpeni come il linalolo e il geraniolo. Nel 2017 e nel 2018, le seguenti accessioni hanno mostrato i contenuti più elevati di concentrazioni totali di VOCs: AROMERA, IV029, IV065, PETRA e PÖLÖSKEI MUSKOTALY (Figura 5). I composti più abbondanti risultano essere esanale, 2-esenale, linalolo e hotrienolo. Grazie all'analisi delle componenti principali (PCA), si è potuto osservare che le accessioni a bacca rossa formano un cluster mentre le accessioni a bacca bianca mostrano un modello più disperso. Tra il 2017 e il 2018 è stata osservata una correlazione significativamente positiva per tutti i composti volatili studiati.

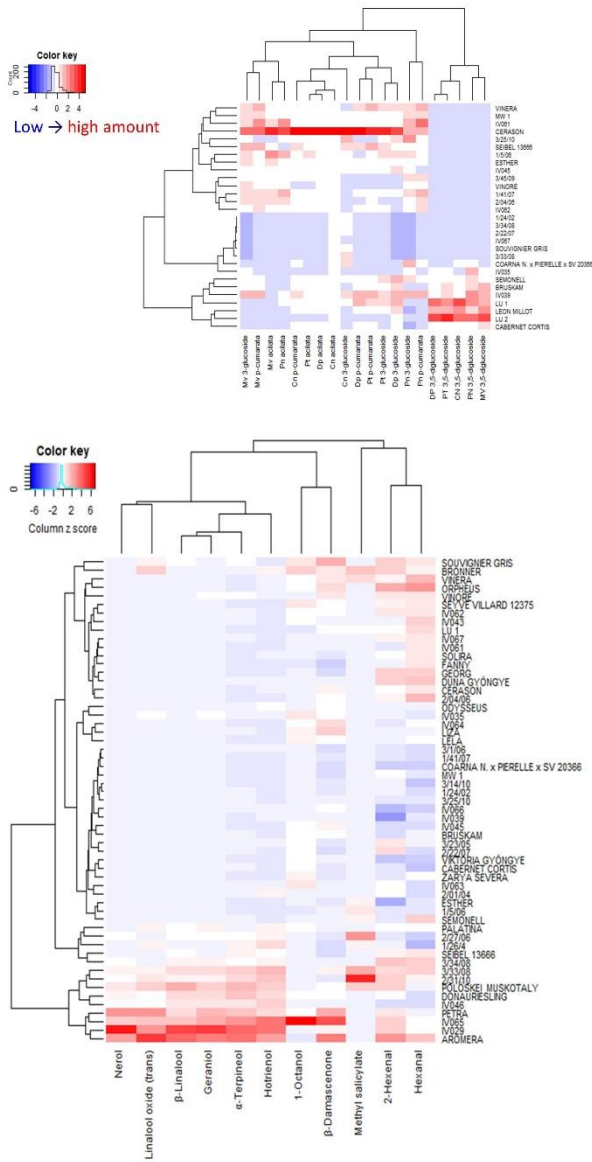


Fig. 5. Heat map dei VOCs rilevati nelle uve raccolte.

Una tecnica complementare alla GC-MS è stata scelta per l'analisi non mirata di ulteriori VOCs dell'uva, vale a dire PTR-MS (Reazione della trasferta dei protoni – tempo di volo - spettrometria di massa). L'acquisizione dei dati è stata eseguita in una modalità sensibile e normale, che ha portato a due diversi set di dati. In ogni approccio, sono stati selezionati più di 140 picchi di massa per ulteriori analisi. Un alto contenuto di monoterpeni sembra essere rilevato nelle accessioni AROMERA, PÖLÖSKEI MUSKOTALY, IV029 e MUSCARIS, in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi GC-MS. Dopo la PCA, l'accessione ESTHER è stata rilevata come un'anomalia nel 2017 a causa del picco di massa 43,0158. Tre off-flavour potrebbero essere assegnati provvisoriamente a diversi picchi di massa: metil antranilato, etil antranilato e 4-metossi-2,5-dimetil-3-furanone e sono stati rilevati in quantità molto basse in alcune accessioni.

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è un altro potente strumento nelle aree di ricerca della metabolomica. Un approccio non mirato combinato con un'analisi statistica multivariata ha permesso la discriminazione degli acini studiati in base ai loro profili spettrali. L'annotazione del picco NMR è stata effettuata mediante esperimenti di spiking, il confronto degli spettri di riferimento con i composti di riferimento misurati e CHENOMX Profiler (CHENOMX Inc., Edmonton, Canada), nonché utilizzando la letteratura pubblicata in precedenza.

Diciotto metaboliti sono stati identificati negli spettri della GC-MS nella buccia e la polpa delle bacche nel 2017, mentre un totale di 22 composti è stato identificato nei campioni di vino. La pre-elaborazione dei dati NMR è un passaggio fondamentale in qualsiasi approccio metabolomico NMR. L'approccio di binning è risultato favorevole per il set di dati su vino e uva (l'ampiezza di binning era 0,04 ppm). Gli spettri dei campioni rappresentativi di uva (buccia e polpa) erano caratterizzati dalla presenza di zuccheri (intervallo 3,00-5,50 ppm) e i segnali in questa regione erano molto sovrapposti. Per quanto riguarda i campioni di buccia, quattro a buccia rossa sono risultati anomali dopo la PCA, che era dovuto all'influenza dei bin corrispondenti alla regione aromatica (5,51 ppm - 9,50 ppm), principalmente a causa degli antociani. Per quanto riguarda i campioni di polpa, le accessioni a buccia bianca e rossa non hanno formato due cluster distinti, ma si ritrovano distribuiti in modo piuttosto uniforme nel modello PCA (Figura 6).

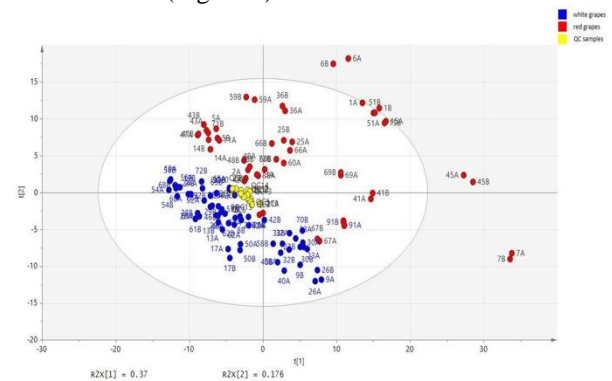


Fig. 6. PCA delle bucce misurate con spettroscopia NMR (raccolta 2017, misurazione in duplicato).

3.3. Composizione dei vini

Le nanovinificazioni sono state effettuate per due anni (2017 e 2018). Partendo da 1-3 kg di uva abbiamo ottenuto 0,3-1,5 litri di vino aggiungendo una quantità minima di lievito per garantire l'inizio del processo di fermentazione (Levuline BRG Yseo® 5g/L nei vini rossi, 10 g/L nei vini bianchi). I vini con una quantità di acido acetico $\geq 1,0$ g/L sono stati sottoposti ad analisi chimica di base, quantificazione mirata di polifenoli e antociani, semi-quantificazione di composti organici volatili e analisi NMR. I dieci vini considerati per l'analisi chimica sono 01/05/06, 02/04/06, 03/101/06, 3/33/08, IV061, LEON MILLOT, PINOT NOIR, PÖLÖSKEI MUSKOTALY, SOLIRA e SOUVIGNIER GRIS. L'analisi di base ci permette di visualizzare una separazione tra vini bianchi (w), vini rossi (r) con una sovrapposizione di vini bianchi da vini rossi (wr) riportata in Figura 7.

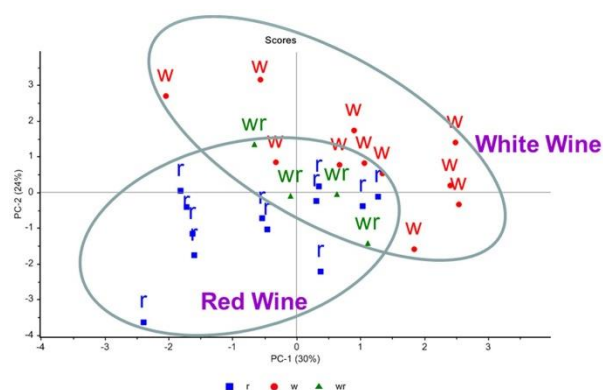


Fig. 7. PCA dell'analisi chimica di base sui nanovini. PC1 spiega il 30 % e PC2 il 24 % della varianza totale.

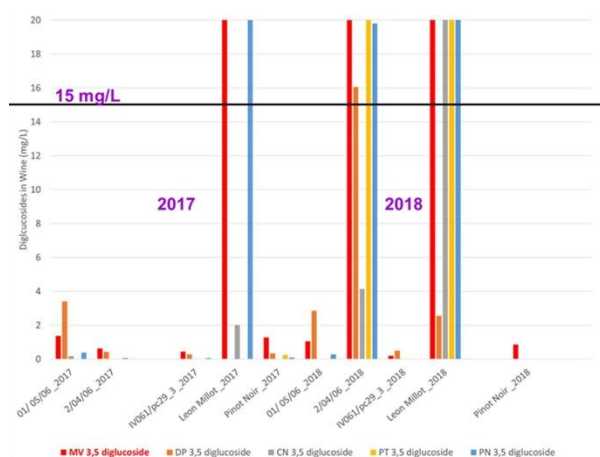


Fig. 8. Concentrazione di diglucosidi nei nanovini espressa in mg/L.

Generalmente, le varietà rosse mostrano una tendenza a contenere la malvidina-3/5-diglucoside oltre

il limite legale (15 mg/l), singole varietà invece sono meno problematiche da questo punto di vista (Fig. 8).

Utilizzando il metodo GC-MS siamo stati in grado di identificare 53 composti putativi. In PCA sono riportati i tre replicati dei due anni. Le componenti principali PC1 e PC2 spiegano il 45% della varianza (Fig. 9). Possiamo osservare una netta separazione dei vini LEON MILLOT (2017 in blu e 2018 in rosso) dagli altri campioni spiegati principalmente dal contenuto di acido butanoico, acido nonanoico e relativi esteri. Abbiamo anche trovato una separazione di SOUVIGNIER GRIS e 3/01/06 solo per i nanovini del 2018 rispetto all'altro set di dati spiegato dal contenuto di estere esilico dell'acido acetico e estere esilico dell'acido esanoico. Utilizzando le componenti principali PC1 e PC3 possiamo osservare un'ulteriore separazione di PÖLÖSKEI MUSKOTALY spiegata da una maggiore quantità di alfa-terpineolo, (R)-(+)-beta-citronellolo, linalolo e trans-geraniolo appartenenti alle classi dei terpeni (Fig. 10). La separazione osservata nella PCA ottenuta utilizzando i dati GC-MS rivela una tendenza simile rispetto ai risultati NMR.

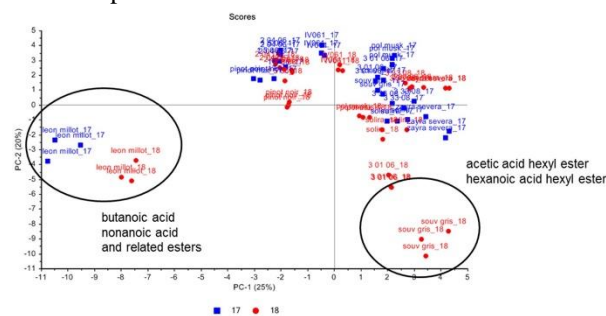


Fig. 9. PCA dei composti organici volatili (VOC) nei nanovini tramite GC-MS. PC1 spiega il 25% e PC2 il 20% della varianza totale.

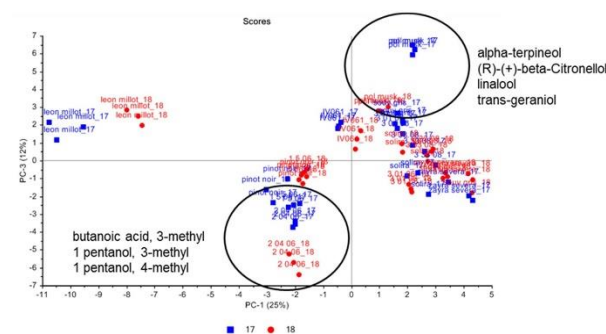


Fig. 10. PCA dei component organici volatile (VOCs) nei nanovini tramite GC-MS. PC1 spiega il 25% e PC3 il 12% della varianza totale.

3.4. Studi preliminari di associazione

È stata eseguita un'analisi preliminare di genome-wide association tra i 17.938 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) selezionati (data not shown) nei 95 genotipi precedentemente selezionati e ca. 170 masse VOC rilevate tramite PTR-ToF-MS con due metodi sia nel 2017 che nel 2018.

L'etil-antranilato e il metil-antranilato, ben noti composti correlati all'aroma *foxy*, sono stati rilevati sia negli standard PTR-ToF -MS che nei campioni e assegnati rispettivamente ai picchi di massa ms166.0872 e ms152.0775. Gli SNPs sono stati identificati su chr2, chr4 e chr9. Inoltre, è stata trovata una robusta associazione tra etil-antranilato e SNPs su chr15 e chr17, e tra metil-antranilato e chr11, 6, 12 e 14.

Precedenti studi su una progenie Concord (ibrido di *V. labrusca*) hanno rivelato che l'antranil-coenzima A: metanolo aciltransferasi (AMAT) era associato al carattere *foxy*; due omologhi AMAT sono stati trovati su chr2 e chr9 e (Wang e Luca 2005). Negli ultimi anni (Franziska Braun, PhD Thesis 2017) è stato localizzato un QTL principale sul chr4 di Catawba (ibrido *V. labrusca*) in associazione con la concentrazione di metil-antranilato, e in questa regione è stato trovato un omologo di mais AAMT.

Questi risultati richiederanno ulteriori approfondimenti per quanto riguarda la localizzazione SNP, gli ibridi e il grado di resistenza. L'aspettativa è che gli SNP inclusi nei QTL ritenuti affidabili saranno testati su una maggiore quantità di materiale genetico rappresentativo del carattere studiato. La convalida dei marcatori verrà estesa ad altri programmi di breeding assistito, europei ed extra-europei.

Bibliografia

1. S. Vezzulli, L. Zulini, M. Stefanini, Genetics-Assisted breeding for Downy/ Powdery Mildew and Philoxera resistance at FEM 41° World Congress OF Vine and Wine Punta dell'est –Uruguay (2018)
2. S. Vezzulli, A. Vecchione, M. Stefanini, L. Zulini Eur. J. of P. Pathol., **150**, 485-495 (2018).
3. E. Zini, C. Dolzani, M. Stefanini, V. Gratl, P. Bettinelli, D. Nicolini, G. Betta, C. Dorigatti, R. Velasco, T. Letschka, S. Vezzulli. Intern. J. of Mol. Sc. **20**, 3526 (2019)
4. V. Gratl, S. Sturm, E. Zini, T. Letschka, M. Stefanini, S. Vezzulli, H. Stuppner. J. Sc. F. Agric., **101**, 2380–2388 (2020)
5. <http://www.oiv.int/it/norme-e-documenti-tecnici/descrizione-dei-vitigni/lista-dei-caratteri-descrittivi-oiv-delle-variete-e-specie-di-vitis-2a-edizione>
6. <https://www.piwi-international.de/it/>
7. Franziska Braun, PhD Thesis 2017. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/12915/>