

DOCUMENTO
TECNICO

***Alessandro Zappata**
***Jacopo Cricco**
****Serena Imazio**
***Luca Toninato**
****Anna Zorloni**
****Attilio Scienza**

**Ager Sc - Agricoltura e
 Ricerca - Milano*
*** DIPROVE - Università
 degli Studi di Milano
 Facoltà di Agraria - Milano*



*Da sinistra:
 J. Cricco,
 A. Zappata,
 L. Toninato*

IL MIGLIORAMENTO GENETICO E SANITARIO DEL TREBBIANO SPOLETINO: PRIMI RISULTATI

Viene presentato il lavoro di ricerca cominciato nel 2006 e tuttora in corso volto a riscoprire, caratterizzare e promuovere sul territorio l'antica varietà Trebbiano Spoletino. Sono trattati i lavori di selezione massale, selezione clonale, aumento della variabilità tramite metodiche di autofecondazione e studio dei parentali tramite la genetica molecolare.

Introduzione

Il Trebbiano spoletino è un antico vitigno coltivato da tempi remoti in Umbria. La sua origine è sconosciuta non si hanno infatti informazioni in nessun antico trattato di ampelografia, ma solo una breve descrizione fatta dal Francolini nei bollettini ampelografici risalenti al 1878. Vitigno a bacca bianca autoctono dell'Umbria, il Trebbiano spoletino per secoli aveva valso alla regione la fama di terra di grandi bian-

chi, contribuendo in modo essenziale alla notorietà dell'enologia regionale. Storicamente l'Umbria era infatti vocata anzitutto alla produzione di vini bianchi, come dimostra lo studio sulla vite e sul vino in Umbria del Ministero di agricoltura, industria e commercio, pubblicato nel 1896. Anche l'inchiesta Agraria di Stefano Jacini a fine '800 conferma questo e, in particolare, evidenzia l'alta vocazione alla produzione di un vitigno: il Trebbiano spoletino.

Ai giorni nostri con l'affermazione nella regione di vini rossi come il Sagrantino, il Trebbiano spoletino rischiava l'abbandono e la scomparsa fino a che la Cantina Novelli, giovane azienda appartenente al Gruppo Novelli con sede vicino a Montefalco (PG), prima a credere in questo vitigno per tanti anni sottovalutato e quasi abbandonato, ha avviato un progetto di ricerca e recupero su questa antica varietà, affidandolo al DIPROVE della Facoltà di Agraria di Milano

in collaborazione con AGER, società cooperativa di Milano specializzata in ricerche in campo viticolo.

La ricerca e la selezione

Nel 2006 comincia il lavoro di valorizzazione, che ha previsto dapprima una selezione massale per recuperare la maggior parte possibile delle antiche piante ancora coltivate nella valle che da Spoleto arriva a Trevi; l'esigenza era quella di avere in tempi brevi materiale vivaistico in quantità da impiegare per l'impianto di un nuovo vigneto che entrasse presto in produzione per soddisfare la richiesta delle uve in cantina.

Il lavoro ha previsto numerosi sopralluoghi in vecchi vigneti di proprietà di agricoltori locali e il prelevamento di legno di potatura per la successiva propagazione del materiale migliore. Sono state così inizialmente individuate alcune migliaia di piante anche secolari e spesso 'maritate' a tutori vivi, come aceri o olmi; solo una parte di queste si presentavano agli occhi dei ricercatori prive di sintomi di virosi e in generale in uno stato fitosanitario accettabile. (Foto 1 e 2)

La prima parte della ricerca ha quindi previsto la selezione delle piante migliori per avere una buona sorgente di materiale vivaistico con l'obiettivo di produrre circa 30.000 barbatelle necessarie all'impianto dei primi 6 ettari di vigneto.

Durante questa prima fase di lavoro, oltre a selezionare le piante sane tramite rilevamenti sintomatologici in campo, si è proceduto a descrivere ciascun genotipo dal punto di vista ampelografico. Questa attività ha permesso di individuare all'interno della popolazione studiata la presenza di alcuni distinti biotipi: con questo termine si intende un gruppo di piante di una varietà con caratteristiche ampelografiche simili tra loro, ma in parte differenti da altri gruppi di piante della stessa varietà.

La variabilità intraspecifica così riscontrata all'interno della popolazione ha permesso di identificare e caratterizzare 4 differenti biotipi che presentavano le seguenti caratteristiche (Foto 3-6)

- Il Biotipo A presenta un grappolo cilindrico, biforcuto, di dimensioni notevoli, con lunghezza spesso maggiore ai 20 cm e spargolo, con la presenza di 1, 2 o più ali. L'acino è sferico di grandezza medio-piccola, la foglia pentalobata con seno peziolare aperto a V, mentre i seni laterali sono a lira.
- Il biotipo B presenta un grappolo cilindrico, biforcuto, di dimensioni ragguardevoli con lunghezza spesso maggiore ai 20 cm, compatto con presenza di 2 o più ali; l'acino è di grandezza media. La foglia, anch'essa di media grandezza, appare pentalobata con seni laterali più marcati.
- Il Biotipo C presenta invece un grappolo piccolo, di lunghezza inferiore ai 20 cm, spargolo e non sempre biforcuto con la presenza di 1-2 ali. L'acino risulta essere molto piccolo come pure la foglia che ha comunque una forma simile alle altre.
- Il Biotipo D presenta un grappolo di piccole dimensioni, compatto, spesso con assenza di ali; l'acino è di media grandezza. La foglia appare pentalobata con seno peziolare aperto a V e seni laterali marcati.

Successivamente a questa fase di caratterizzazione ampelografica e di selezione sanitaria si è proceduto nel gennaio del 2007 alla raccolta del legno di potatura, che è stata condotta prestando la massima cura nel tenere separati i tralci di ciascun biotipo. La distribuzione percentuale di ciascun biotipo rispetto alla popolazione indagata viene riportata in Fig. 1.

Sul legno prelevato da ciascun biotipo, venivano intanto condotte dal laboratorio di analisi genetiche del DIPROVE della Facoltà di Agraria

Foto 1 e 2 - Vecchie piante di Trebbiano spoletino maritate ad aceri

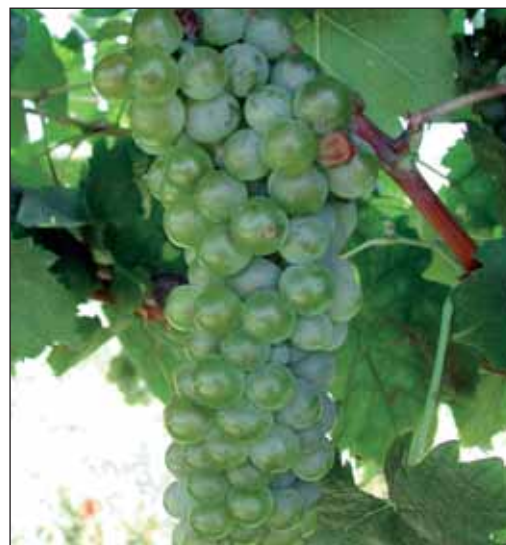


di Milano analisi con le moderne tecnologie dei marcatori micro satellite per osservare eventuali differenze genetiche tra i diversi biotipi. I risultati hanno evidenziato come i 4 biotipi analizzati sono identici tra loro e identici al Trebbiano spoletino presente nella collezione ampelografica gestita dall'Università di Milano presso l'Istituto ERSAF di Pavia.

Un successivo confronto dei profili micro satellite del Trebbiano spoletino con i profili micro satellite di più di 3000 varietà di vite ha permesso di evidenziare una vicinanza genetica del Trebbiano spoletino con la famiglia dei Grechetti e con il

Trebbiano toscano.

Nella primavera 2008 le barbatelle ottenute dal legno dei differenti biotipi, innestate su 1103 Paulsen, sono state impiantate su un appezzamento appositamente preparato e descritto anche grazie alla realizzazione di uno studio pedologico in località colle Mandola nei pressi di Spoleto. La prima vendemmia di tali selezioni è prevista per l'autunno 2010, quando verranno realizzate microvinificazioni per saggiare differenze organolettiche tra i vini ottenuti dai 4 distinti biotipi. Verranno inoltre effettuate osservazioni per verificare se le differenze fenotipiche registrate durante la se-

Foto 3 - Particolare del grappolo del biotipo A**Foto 4 - Particolare del grappolo del biotipo B****Foto 5 - Particolare del grappolo del biotipo C****Foto 6 - Particolare del grappolo del biotipo D**

lezione sulle piante madri permangono stabili nella progenie anche quando i biotipi vengono coltivati nelle medesime condizioni ambientali.

Dopo questa prima fase di indagine e ricerca della variabilità esistente per il Trebbiano spoletino, si è passati ad una successiva fase di studio più dettagliato ed articolato, i cui obiettivi sono i seguenti:

- Selezione clonale della varietà Trebbiano spoletino.
- Aumento della variabilità intra-varietale tramite metodologie di autofecondazione.
- Studio genetico volto a ritrovare l'origine dei parentali del Trebbiano spoletino.

La selezione clonale

Per attuare questo tipo di ricerca, che ha un lungo protocollo standardizzato e regolamentato da seguire, è necessario eseguire uno screening sanitario mediante rilevamenti sintomatologici in campo seguiti da saggi diagnostici di laboratorio e da saggi biologici, come indicato dal protocollo tecnico fitosanitario allegato al D.M. 24 giugno 2008.

Le piante appartenenti ai presunti cloni identificati e risultate virus-esenti, vengono moltiplicate e conservate in appositi campi di selezio-

ne, quindi sottoposte alla valutazione di alcune caratteristiche agronomiche ed enologiche. Infine, dopo almeno tre anni di osservazione e di raccolta dati, possono essere preparati i dossier per l'omologazione dei presunti cloni, in cui vengono riportate tutte le informazioni genetiche, ampelografiche, produttive, qualitative e sanitarie.

Nel caso del progetto in atto presso la Cantina Novelli, le prime fasi di recupero e individuazione della variabilità genetica erano già state, come descritto, realizzate con il lavoro di identificazione e caratterizzazione dei biotipi.

Si è quindi partiti pro-

Tab. 1 - Virus rilevati tramite saggio E.L.I.S.A., nei ceppi selezionati.

n° ceppi:			virus rilevati:						
saggiati	virus-esenti	infetti	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GFLV	ArMV	GVA	GVB
103	22	81	74	0	6	1	1	3	0

dendo ad effettuare i sopralluoghi in campo per verificare la presenza di eventuali sintomi dovuti a malattie da virus sulle piante madri individuate: le osservazioni sono state eseguite nei periodi primaverile ed estivo-autunnale per rilevare, rispettivamente, sintomi di arricciamento e di accartocciamento fogliare, oltretutto di malattie provocate da fitoplasmi.

Nel corso della stagione invernale, in seguito alla caduta delle foglie, dai singoli ceppi risultati asintomatici sono stati raccolti campioni legnosi da sottoporre a saggi sierologici E.L.I.S.A. per i virus indicati dalla normativa vigente: gli ampelovirus GLRaV-1 e GLRaV-3; il closterovirus GLRaV-2; i nepovirus GFLV e ArMV; i vitivirus GVA e GVB.

In totale, come riportato nella Tab. 1, su 103 campioni esaminati, 22 sono risultati virus-esenti. Il virus rilevato con maggior frequenza è stato GLRaV-1 associato all'accartocciamento fogliare (74 campioni positivi), pochi i casi rilevati di GLRaV-3 (6), GVA (3), GFLV e ArMV (1 campione positivo per entrambi i virus).

Saggi biologici sulle 22 accessioni di Trebbiano spoletino risultate virus-esenti, sono stati avviati tramite innesto su cloni certificati di varietà Barbera e Kober 5BB, indicatrici rispettivamente di accartocciamento fogliare e Kober stem grooving (sindrome compresa nel complesso del legno riccio).

Dalle 22 piante risultate sane, è stato inoltre prelevato il legno di potatura per la produzione di barbatelle necessarie a costituire il campo di confronto clonale che è stato impiantato lo scorso 9 marzo su un appezzamento antistante la Cantina Novelli. Per ciascun biotipo sono state impiantate 25 barbatelle in

3 ripetizioni come previsto dal protocollo ministeriale. In parallelo, ciascuna delle accessioni è stata impiantata in screen-house nell'azienda sperimentale dell'Università degli Studi di Milano, situata a Tavazzano con Villavesco (Lodi), per la conservazione genetica e sanitaria del materiale vegetale.

Presumibilmente a partire dal 2012 verranno condotti i rilievi e le analisi sui presunti cloni nel campo di omologazione e verranno eseguite per 2 anni le microvinificazioni per definire il profilo gusto-olfattivo e chimico dei vini di ciascun clone.

Varietà intravarietale

Aumento della variabilità intravarietale per autofecondazione.

Parallelamente al lavoro di selezione clonale si è proceduto alla produzione di nuovi genotipi, ottenuti per autofecondazione con l'obiettivo di aumentare la variabilità presente all'interno della varietà Trebbiano spoletino.

Questo vitigno è infatti da sempre coltivato in areali limitati; per questo motivo le selezioni operate dall'uomo hanno probabilmente mantenuto tra le sue caratteristiche fenotipiche solo alcune principali peculiarità come evidenziato dalla grande premienza di alcuni biotipi rispetto ad altri.

Attraverso la tecnica dell'autofecondazione (o inbreeding) si ottengono genotipi segreganti che presentano, vicino alle caratteristiche generali del vitigno, alcuni caratteri nuovi non presenti nelle espressioni fenotipiche della popolazione naturale; questo fenomeno è reso possibile dal fatto che i vitigni coltivati sono spesso frutto di selezioni fatte su viti ottenute

da seme nei secoli passati favorendo nel corso delle generazioni la creazione di una sorta di linee pure almeno per alcuni caratteri, lasciando però una ricca deriva genetica per altri.

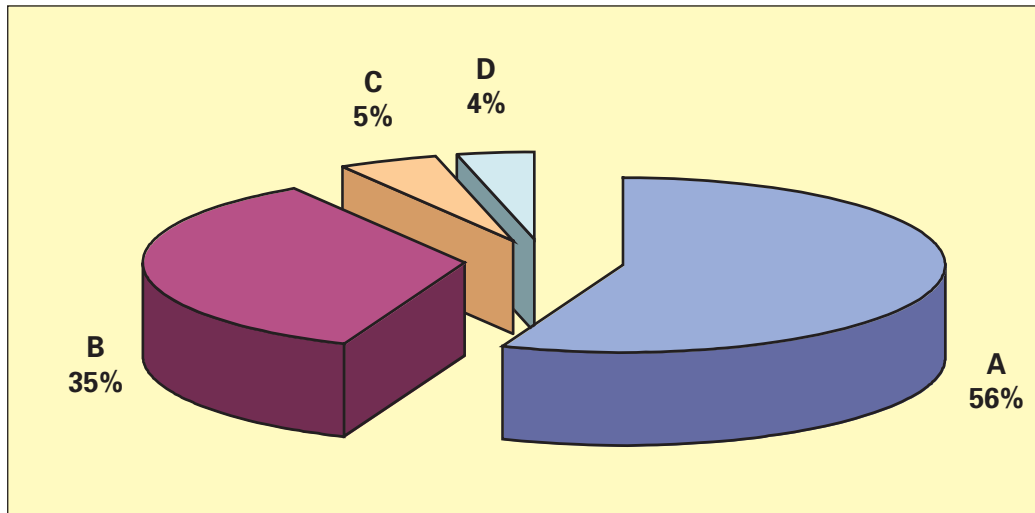
Obiettivo del presente ramo di ricerca è dunque realizzare piante di Trebbiano spoletino ottenute da inbreeding, con lo scopo di individuare genotipi con caratteristiche migliorative rispetto alle varietà di partenza.

Nel giugno 2008 si è quindi proceduto a isolare grappoli di Trebbiano spoletino con sacchetti di carta per ottenere la autofecondazione degli stessi e per impedire l'insediamento di polline di altre piante. In autunno dai grappoli isolati sono stati prelevati i semi ottenuti da autofecondazione che sono stati posti a germinare in serra, dopo un periodo di vernalizzazione con sabbia, per ottenere piante da allevare in vaso.

I 300 semenzali così ottenuti sono stati impiantati in primavera 2010 e verranno gestiti con tecniche di coltivazione che ne favoriranno una precoce entrata in produzione (al 2°-3° anno); queste tecniche prevedono la forzatura della crescita ed una potatura che concentri tutto il vigore della pianta nella gemma ibernante apicale che differenzia così nel 1°-2° anno.

Successivamente i semenzali saranno sottoposti ad osservazioni morfologiche, con particolare attenzione alle caratteristiche di fertilità delle gemme ed alla tolleranza del grappolo alla botrite e ad analisi relativamente alle caratteristiche dell'epidermide e della composizione della bacca (zuccheri, acidi organici).

Una volta individuate, le piante più interessanti saranno innestate in un campo di portinnesti per avere un numero sufficiente di piante per

Fig. 1 - Distribuzione percentuale dei biotipi ritrovati

eseguire microvinificazioni, che permetteranno di valutare i genotipi anche dal punto di vista sensoriale.

Relazioni di parentela

Ricerca di relazioni di parentela del Trebbiano Spoletino.

In un progetto così ambizioso e articolato non poteva mancare una fase di approfondimento sulle origini genetiche di questo vitigno; a questo scopo è previsto uno studio per la ricerca dei parentali della varietà Trebbiano spoletino attraverso le moderne tecniche di biologia molecolare.

A tal fine campioni di legno di Trebbiano spoletino sono stati conferiti presso il laboratorio di Biotecnologie del DIPROVE dell'Università di Milano, dove si è proceduto all'estrazione e all'amplificazione dei tratti microsatellite del DNA. Lo studio, tutt'ora in corso, prevede un primo screening analizzando una ventina di loci microsatellite. I loci sono scelti in maniera tale da ricoprire l'intero genoma (almeno 1 per ogni cromosoma) della vite in modo che il risultato rispecchi fedelmente la struttura biologica dei campioni analizzati. I prodotti di amplificazione sono poi utilizzati per determinare le dimensioni alleliche nei

loci microsatellite selezionati.

I risultati ottenuti da questa prima fase di analisi sono stati inseriti in un Data Base contenente le informazioni relative ai profili molecolari di circa 3.000 varietà di vite; in tal modo si è avuta possibilità di confrontare il genoma del Trebbiano spoletino con quello della maggior parte delle varietà di vite studiate fino ad oggi. I risultati conseguiti tramite l'analisi di questo primo pool di 20 loci micro satellite hanno consentito di eliminare tutte le varietà che non rispondono al requisito fondamentale per essere un ipotetico genitore del Trebbiano spoletino: avere almeno un allele in comune per ognuno dei 20 loci analizzati.

I primi risultati escludono la parentela del Trebbiano spoletino con i principali vitigni internazionali e nazionali e riportano una vicinanza genetica del Trebbiano spoletino con le cultivar Greco, Grechetto e Trebbiano toscano.

Considerazioni conclusive

La presenza in un determinato luogo di viti "prefillosseriche", allevate su piede "franco" come si faceva fino alla fine del 1800 prima che la devastante piaga della fillossera invadesse tutta l'Europa, causando un radicale

cambiamento del modo di coltivare la vite e prevedendo l'innesto su viti americane resistenti, è di notevolissima importanza perché sta a indicare una antica presenza della coltivazione della vite e quindi uno stretto legame tra le antiche varietà ed il territorio. Queste antiche origini garantiscono anche la sopravvivenza del patrimonio genetico iniziale, nella sua ampia variabilità, alle selezioni operate successivamente dall'uomo.

Tutto questo si è verificato nel piccolo areale di coltivazione del vitigno Trebbiano spoletino, dove l'elevato numero di viti "prefillosseriche" e la notevole variabilità genetica ritrovata (rinvenute 600 piante secolari ancora coltivate col vecchio sistema dell'alberata e la presenza di almeno 4 differenti "biotipi" afferenti al Trebbiano spoletino) consentono di porre tale areale nel ristretto ambito delle territorialità ritenute uniche ed irripetibili, assicurando nel futuro l'ottenimento di vini moderni complessi frutto di questo ricco passato.

Su questa importante base di partenza si sono poi susseguiti ulteriori studi volti da un lato a realizzare selezioni clonali, quindi alla identificazione di presunti cloni biologicamente sani ed enologicamente migliori e stabili, e dall'altro ad aumentare in maniera naturale la variabilità varietale esistente sul territorio viticolo Spoletino.

Infine, rivestirà notevole importanza individuare l'origine filogenetica del Trebbiano spoletino tramite indagini molecolari per valutarne i percorsi adattativi e di selezione nel corso dei secoli di coltivazione nell'areale di studio.

Ringraziamenti.

Si ringrazia la Cantina Novelli per il contributo finanziario alla ricerca e per la sempre attenta collaborazione di tutto il personale in particolare del dott. Stefano Novelli e del dott. Marco Serafini.