

Caratterizzazione della biodiversità viticola: tolleranza a peronospora (*Plasmopara viticola*) e analisi dell'espressione di geni codificanti per stilbene sintasi in specie e cultivar del genere *Vitis*

Massimo Muganu¹, Marco Paolocci¹, Annarita Paolacci², Mario Ciaffi^{2*}

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

² Dipartimento per la Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF), Università della Tuscia, Viterbo

Characterization of grapevine germplasm: resistance to downy mildew (*Plasmopara viticola*) and expression analysis of stilbene synthase genes in cultivars and species of *Vitis* genera

Abstract. The study of plant varieties with adaptive traits of tolerance to stress is a key strategy in improving the plant-environment interaction. Grapevine germplasm includes minor and local accessions whose agronomic characteristics and tolerance to biotic stress are still poorly known. Among the natural defense mechanisms, the production of stilbenic phytoalexins following infection with *Plasmopara viticola* has been described. Stilbene are low molecular weight compounds naturally present in many families of the vegetable kingdom including many species of the *Vitis* genera. The aims of this study were to characterize the level of tolerance to *P. viticola* in different species and varieties of the *Vitis* genera and to analyze, in the same genotypes, the expression of genes coding for stilbene synthase (STS), the key enzyme in the stilbene synthesis.

Key words: disease resistance, grape quality, local varieties, sustainable viticulture.

Introduzione

Lo studio di vitigni con caratteri adattativi di tolleranza a stress è una strategia chiave nel miglioramento dell'interazione pianta-ambiente di coltivazione. Negli ultimi anni numerose ricerche e collaborazioni scientifiche sono state finalizzate alla raccolta e conservazione di germoplasma di vite. Il germoplasma

viticolo include varietà minori o locali le cui caratteristiche viticole, enologiche e di tolleranza a stress biotici sono ancora poco conosciute (Paolocci et al. 2014). Tra i meccanismi di difesa naturali presenti nella vite è stata descritta, a seguito dell'infezione di *Plasmopara viticola*, la produzione di fitoalessine di natura stilbenica. Gli stilbeni sono composti a basso peso molecolare naturalmente presenti in molte famiglie del regno vegetale e in molte specie del genere *Vitis*, compresa *V. vinifera*. Sono presenti in maniera costitutiva negli organi legnosi della vite, compresi i semi, ma sono anche sintetizzati come fitoalessine in organi o tessuti erbacei della pianta in seguito a risposta indotta. Comprendono numerose sostanze: oltre al resveratrolo, con forme isomeriche cis e trans, sono stati descritti glucosidi del resveratrolo come piceide e resveratroloside (Mattivi et al., 2011) e numerose molecole derivate dalla sua polimerizzazione, tra cui le più importanti sono le viniferine (Gindro et al., 2003) e lo pterostilbene.

Obiettivi del lavoro sono la caratterizzazione dei livelli di tolleranza di varietà e specie appartenenti al genere *Vitis* a *P. viticola* e l'analisi, negli stessi genotipi, dell'espressione di geni codificanti per stilbene sintasi (STS), enzima chiave nella sintesi di stilbeni.

Materiali e metodi

Per quanto riguarda *V. vinifera* spp sativa sono state utilizzate le accessioni Aleatico n. VTG, Canaiolo n. CM VT1, Bellone b. VT5, Trebbiano g. RS VT6 e Trebbiano t. b. TR VTT, già descritte nell'Italian *Vitis* Database. A queste sono stati aggiunti l'ibrido Isabella edue biotipi di *V. vinifera* spp *sylvestris* rinvenuti negli areali dei Monti della Tolfa e dei Monti Cimini (Regione Lazio). Infine, la varietà suscettibile Chasselas e l'ibrido resistente Solaris sono stati impiegati come controlli. Sono state

* ciaffi@unitus.it

effettuate prove di infezione in ambiente controllato su piante in vaso utilizzando una soluzione inoculante contenente 1×10^5 zoosporangi/ml. L'incidenza della malattia è stata valutata come percentuale di foglie manifestanti sintomi, mentre la severità come percentuale di superficie sporulante. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA).

Data la complessità della famiglia genica codificante per stilbenesintasi (STS) in vite (Vannozzi *et al.*, 2012), nel nostro studio per l'identificazione di sequenze geniche STS non ridondanti e accuratamente annotate, abbiamo utilizzato la banca dati NCBI. Le sequenze nucleotidiche di riferimento identificate che contenevano l'intera regione codificante dei geni STS sono state utilizzate per sintetizzare primers specifici per analizzare la loro espressione mediante PCR quantitativa real-time utilizzando RNA estratto dalle foglie campionate dai diversi genotipi considerati a 0, 16, 24, 48 h e 72 h dopo l'infezione.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza differenze significative nella incidenza e severità dei sintomi tra i vitigni. Sia per l'incidenza che per la severità della malattia i valori più elevati sono stati evidenziati nelle accessioni a bacca nera Aleatico n. VTG e Canaiolo n. CM VT1 e nella accessione a bacca bianca Trebbiano t. b. TR VTT, che hanno evidenziato i livelli minori di tolleranza. Una minore suscettibilità alla malattia è stata invece rilevata in Bellone b. VT5, Trebbiano g. RS VT6 e in *V. vinifera* spp *sylvestris*. Il controllo Solaris ha evidenziato valori nulli sia di incidenza che di gravità. L'ibrido Isabella ha evidenziato livelli elevati di tolleranza a peronospora come in precedenti osservazioni (Brown *et al.*, 1999).

Mediante diverse strategie di ricerca effettuate nella banca dati NCBI sono state individuate nel genoma della vite 31 sequenze STS funzionali, due delle quali localizzate sul cromosoma 10 e le rimanenti 29 in due distinti "cluster" nella regione distale del cromosoma 16. Sulla base di analisi filogenetiche le 31 sequenze identificate sono state suddivise in tre gruppi: le due localizzate sul cromosoma 10 sono state assegnate al gruppo filogenetico A, 19, localizzate sul cromosoma 16 al gruppo B, e le rimanenti 10 sempre localizzate sul cromosoma 16, al gruppo C. Data la complessità della famiglia genica STS in vite e l'elevata omologia di sequenza evidenziata per molti dei suoi membri, è stato possibile disegnare primer specifici solo per 8 delle 31 sequenze STS identificate. Per i rimanenti 23 geni sono stati disegnati primer conservati tra sequenze molto simili al fine di analiz-

zare la loro espressione totale. I primer conservati disegnati amplificano da due a quattro sequenze molto simili.

Le analisi di espressione, condotte nei diversi genotipi di vite in seguito all'infezione di *P. viticola*, hanno evidenziato che le maggiori differenze nel livello di trascrizione dei geni STS sono rilevate soprattutto per alcuni membri appartenenti al gruppo B. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni secondo cui i geni STS appartenenti al gruppo B evidenziano il più elevato livello di induzione in risposta a diversi stress biotici ed abiotici (Vannozzi *et al.*, 2012). E' comunque importante sottolineare che alcuni geni STS sono regolati in maniera differenziale nei diversi genotipi in seguito all'infezione e che è possibile riscontrare significative differenze tra i vitigni tolleranti e quelli suscettibili sia nella quantità dei trascritti dei geni STS che nel loro profilo di espressione temporale.

Conclusioni

La disponibilità di vitigni o cloni selezionati tolleranti alle malattie fungine è diventata una strategia chiave in molte zone viticole. Lo studio delle caratteristiche morfologiche e delle basi genetiche che regolano la risposta della vite a stress con l'attivazione di meccanismi di difesa naturali, potrebbe consentire progressi significativi nello sfruttamento delle risorse genetiche e nell'uso della selezione assistita mirata al miglioramento della qualità delle uve e alla riduzione dei costi ambientali.

Lavoro svolto in parte con fondi FILAS, progetto MIGLIORA

Bibliografia

- BROWN M.V., MOORE J.N., FENN P., MCNEW R., 1999. *Comparison of leaf disk, greenhouse and field screening procedures for evaluation of grape seedlings for downy mildew resistance*. Hort science 34(2): 331-333.
- GINDRO K., PEZET R., VIRET O., 2003. *Histological study of the responses of two Vitis vinifera cultivars (resistant and susceptible) to Plasmopara viticola infections*. Plant Physiology and Biochemistry, 41: 846-853.
- MATTIVI F., VRHOSEK U., MALACARNE G., MASUERO D., ZULINI L., STEFANINI M., MOSER C., VELASCO R., GUELLA G., 2011. *Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid Vitis vinifera (Merzling x Terodelgo) genotypes infected with Plasmopara viticola*. J. Agricultural and Food Chemistry 59: 5364-5375.
- PAOLOCCI M., MUGANU M., ALONSO-VILLAVARDE, V., GINDRO, K., 2014. *Leaf morphological characteristics and stilbene production differently affect downy mildew resistance of Vitis vinifera varieties grown in Italy*. Vitis 53: 155-161.
- VANNOZZI A., DRY I.B., FASOLI M., ZENONI S., LUCCHINI M., 2012. *Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multi-gene family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses*. BMC Plant Biology, 12: 130.