

INFLUENZA DEL PORTINNESTO SUL METABOLISMO SECONDARIO DI UVE *PINOT NERO*

Alessandra Zombardo^{1,2*}, Erica Mica³, Sergio Puccioni¹, Laura Bassolino⁴, Rita Perria¹, Giovan Battista Mattii², Luigi Cattivelli³, Paolo Storchi¹

¹ CREA - Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia - Arezzo

² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari, Ambientali e Forestali (DAGRI) - Università degli Studi di Firenze - Sesto Fiorentino (FI)

³ CREA - Centro di Ricerca Genomica e Bioinformatica - Fiorenzuola d'Arda (PC)

⁴ CREA - Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali - Bologna

*alessandra.zombardo@crea.gov.it

Introduzione

L'utilizzo dell'innesto è una pratica diffusa nella maggior parte delle aree vitivinicole mondiali quale unica soluzione efficace contro la fillossera, un afide terricolo (*Daktulosphaira vitifoliae*) che, con la sua diffusione capillare a partire dalla fine del XIX secolo, ha messo seriamente in pericolo la stessa coltivazione della vite. La fillossera risulta, infatti, fortemente dannosa per l'apparato radicale di *Vitis vinifera* e, in conseguenza ad un attacco, si formano sulle radici delle galle nodose che compromettono la funzione assorbente, portando ad un rapido deperimento della pianta. L'innesto, effettuato con porzioni di legno di *Vitis* americane (usate pure o come incroci, le quali hanno radici non sensibili in quanto sono co-evolute con l'insetto patogeno), non solo conferisce resistenza alla fillossera, ma può modulare l'adattabilità della pianta all'ambiente e la sua risposta a diversi tipi di stress abiotico (ad esempio siccità, salinità, ristagno idrico). L'effetto del portinnesto è un argomento molto dibattuto in letteratura: secondo alcuni autori modifica le relazioni source-sink della vite, influenzandone la fisiologia (Mattii *et al.*, 2005; Di Filippo & Vila, 2011), mentre secondo altri ha solo un effetto indiretto sullo sviluppo della pianta, poiché il genotipo del nesto e l'ambiente sono sempre fattori più determinanti (Keller *et al.*, 2012; Nuzzo & Matthews, 2006). Lo studio dell'interazione tra i bionti coinvolti è piuttosto complesso: esso implica una connessione idraulica e cambiamenti strutturali. Le viti innestate, quindi, devono essere considerate a tutti gli effetti come piante composte da due genotipi che interagiscono tra loro per creare il fenotipo finale. Alcuni ricercatori hanno recentemente scoperto che, oltre alle piccole molecole (come acqua, ioni, aminoacidi e ormoni), anche alcune macromolecole (soprattutto mRNA e microRNA) riescono ad attraversare il punto di innesto e si spostano per via floematica (Harada, 2010; Buhtz *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Maré *et al.*, 2016). Il portinnesto, dunque, è in grado di condizionare l'espressione genica nell'intera pianta, soprattutto in presenza di stress o fattori limitanti e le alterazioni che avvengono sono principalmente a carico dei geni coinvolti nel metabolismo secondario, in particolar modo correlati alla biosintesi dei flavonoidi e degli stilbeni (Cookson *et al.*, 2014; Corso *et al.*, 2015; Chitarra *et al.*, 2017).

Nonostante il considerevole numero di ricerche effettuate sull'argomento, i network molecolari nesto-portinnesto rimangono in gran parte poco conosciuti e si hanno scarse informazioni riguardo il reale effetto dei diversi tipi di portinnesto sulla produzione e qualità dell'uva, ovvero gli aspetti di maggiore rilievo in viticoltura. Lo scopo della presente ricerca è stato quello di studiare l'influenza di due portinnesti con caratteristiche opposte tra loro (in termini di resistenza alla siccità e vigoria) sul fenotipo di uve *Pinot nero* e sul profilo di espressione di alcuni geni chiave del metabolismo dei composti fenolici. Essendo i portinnesti l'interfaccia tra l'ambiente e la pianta (Ollat *et al.*, 2017), ottenere informazioni riguardo la composizione finale delle uve può costituire una sfida vantaggiosa, in prospettiva dell'adattamento ai cambiamenti climatici in atto e può essere particolarmente importante per il miglioramento genetico in viticoltura.

Materiali e metodi

Il sistema sperimentale:

Il lavoro di ricerca è stato effettuato utilizzando un sistema sperimentale di vasi in plastica da 70 L contenenti piante di vite di 10 anni, cultivar *Pinot nero* (clone ENTAV 115) e terreno argillo-limoso (40% argilla, 41% limo, 19% sabbia), proveniente da un vigneto appartenente alla DOCG Chianti Classico. Sono state impiegate 3 tesi: viti franche di piede (FRA - come controllo) e viti innestate su 1103 Paulsen (PAU - *Vitis berlandieri* x *V. rupestris*) e su M101-14 (101 - *V. riparia* x *V. rupestris*). Le caratteristiche intrinseche dei portinnesti scelti sono elencate in Tab.1. Le viti erano poste in file parallele all'aperto, allevate a controspalliera con potatura a cordone speronato (10 gemme/pianta) e mantenute in condizioni agronomiche uniformi. L'irrigazione era fornita con un impianto a goccia, uguale per tutte le piante. Sono state considerate 9 ripetizioni per tesi, seguendo uno schema di disposizione a blocchi randomizzati.

Portinnesto	Resistenza alla fillossera	Tolleranza al calcare	Tolleranza al secco	Vigoria indotta	Tolleranza al ristagno	Tolleranza alla salinità
1103 Paulsen	Ottima	17%	Ottima	Ottima	Ottima/Buona	Buona
M101-14	Ottima	9%	Discreta/Mediocre	Discreta	Buona	Buona

Tab.1. Caratteristiche dei portinnesti utilizzati (da Palliotti *et al.*, 2015).

Fenotipizzazione:

Durante la stagione vegetativa 2017 sono state monitorate le fasi fenologiche ed è stato valutato lo stato fisiologico delle piante, con l'obiettivo di verificare eventuali differenze tra le tre tesi. In particolare, sono state eseguiti i seguenti rilievi: osservazione visiva dello sviluppo degli organi della vite (germoglio, foglia, grappolo) durante le principali fasi di crescita (scala BBCH); misurazioni settimanali (nei mesi di luglio e agosto) dello status idrico e dell'efficienza fotosintetica: potenziale idrico come *midday stem water potential* (con camera di Scholander – Ecosearch), scambi gassosi fogliari (mediante IRGA-Ciras1 - PPSsystem), misurazione della fluorescenza della clorofilla (con Handy-Pea Chlorophyll Fluorimeter - Hansatech) e contenuto di clorofilla in unità SPAD (con Chlorophyll Meter SPAD-502 Plus - Konica Minolta).

Al momento della vendemmia, è stata quantificata la produzione per pianta (resa/ceppo, numero di grappoli, peso medio del grappolo, peso medio dell'acino). Sulle uve raccolte è stata valutata la maturità tecnologica, secondo i metodi ufficiali O.I.V. (O.I.V., 2009). Per ogni tesi e ripetizione sono stati raccolti campioni di acini per svolgere le analisi di maturità fenolica (polifenoli e antociani estraibili e totali), secondo il metodo di Di Stefano e Cravero (1991). Sugli estratti delle bucce è stato esaminato il contenuto di sostanze fenoliche tramite HPLC, seguendo il metodo di Gomez-Alonso (*et al.* 2007). Infine, durante l'inverno è stato pesato il legno di potatura. Le analisi statistiche su tutti i risultati ottenuti sono state elaborate con il software Statgraphics, utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). La least significant difference di Fisher (LSD) è stata assunta per $P < 0,05$.

Analisi molecolari:

Per le analisi molecolari sono stati raccolti 15 acini per pianta, considerando 9 repliche biologiche per ogni tesi, all'invasatura (75% delle bacche invaiate nel grappolo) e a piena maturità, per un totale di 18 campioni (3 tesi portinnesto - 2 tempi di maturazione - 3 repliche biologiche). Le bucce sono state immediatamente separate e congelate a -80°C . Tali tessuti sono stati poi macinati per estrarre l'RNA totale usando il Plant RNA Isolation Reagent (Life Technologies), seguito da purificazione con il kit RNA Clean-up and Concentration (Norgen Biotek Corp.).

Sulla base di un esperimento di trascrittomica (RNA-seq), condotto nella stagione vegetativa 2012 sullo stesso sistema sperimentale di viti *Pinot nero* allevate in vaso (mantenuto nelle medesime condizioni e sulle stesse tesi e ripetizioni) descritto da Mica (*et al.*, 2014), sono stati selezionati 9 geni (elencati in Tab. 2) che risultavano differenzialmente espressi tra le tesi.

Gene	Funzione	Riferimenti bibliografici
VvPAL	FENILALANINA AMMONIO LIASI - codifica per un enzima che promuove la deaminazione della L-fenilalanina ad acido cinnamico	Boss <i>et al.</i> , 1996
VvF3'H	FLAVONOIDE 3'-IDROSSILASI - codifica per un enzima che catalizza l'idrossilazione dei flavonoidi nella posizione 3' dell'anello B, portando ai rispettivi flavonoli idrossilati, proantocianidine e antociani	Bogs <i>et al.</i> , 2006 Castellarin <i>et al.</i> , 2006 Cui <i>et al.</i> , 2017
VvFLS	FLAVONOLO SINTASI - codifica per un enzima che catalizza la formazione di flavonoli agliconi a partire da diidroflavonoli	Downey <i>et al.</i> , 2003
VvDFR	DIIDROFLAVONOL-4-RIDUTTASI - codifica per un enzima che catalizza la conversione dei diidroflavonoli a leucoantocianine	Bogs <i>et al.</i> , 2006 Castellarin <i>et al.</i> , 2006
VvMYB14	Fattore di trascrizione - regolatore della famiglia genica codificante per la stilbene sintasi	Fasoli <i>et al.</i> , 2018 Jeandet <i>et al.</i> , 2019
VvMYB2-L3	Fattore di trascrizione - coinvolto nella biosintesi delle antocianine, ha attività di repressore	Cavallini <i>et al.</i> , 2015 Zhu <i>et al.</i> , 2019
VvMYB4R1	Fattore di trascrizione - coinvolto nella sintesi degli stilbeni, come regolatore della trascrizione	Vezzulli <i>et al.</i> , 2019
VvNAC44	Fattore di trascrizione - coinvolto nella maturazione degli acini e nella risposta a stress, in particolare nell'accumulo di stilbeni	Suzuki <i>et al.</i> , 2015 Vannozzi <i>et al.</i> , 2018
VvNAC60	Fattore di trascrizione - coinvolto nella maturazione degli acini e nel metabolismo secondario, in particolare nell'accumulo di antociani	Palumbo <i>et al.</i> , 2014 Massonnet <i>et al.</i> , 2017

Tab.2. Elenco dei 9 geni differenzialmente espressi nel progetto pilota su Pinot nero del 2012, scelti per l'analisi molecolare.

I primer forward e reverse (elencati in Tab. 3) sono stati disegnati su regioni gene-specifiche, considerando che la maggior parte dei geni scelti appartengono a famiglie multigeniche con alto livello di omologia di sequenza. L'RNA totale, trattato con DNasi I (Applied Biosystem), è stato usato per sintetizzare cDNA a singolo filamento con il kit SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen). Le Real-Time-PCR sono state eseguite in un volume finale di 10 µl, con SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), considerando tre repliche tecniche per ciascun campione. Le piastre sono state analizzate su 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies) con le seguenti impostazioni: 1 ciclo di 95°C per 30 secondi, 40 cicli di 95°C per 10 secondi e 60°C per un minuto, un ciclo di dissociazione dei primer (per verificare i prodotti di PCR non specifici) di 95°C per 15 secondi, 60°C per 30 secondi e 95°C per 15 secondi.

La quantificazione relativa del trascritto di ciascun gene è stata calcolata dal Ct value, utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando un trascritto di poli-ubiquitina (VvUBI) come standard interno.

<i>Gene</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Primer Forward (Seq. 5'3')</i>	<i>Primer Reverse (Seq. 5'3')</i>
<i>VvPAL</i>	vit_13s0019g04460	CGCCAAACACAGCCACTCA	GCAGCTTTAGTACCAGTGTCTCCC
<i>VvF3'H</i>	vit_17s0000g07200	GCCTCCGTTGCTGCTCAGTT	CGTAGGGAGCGAACACCAGA
<i>VvFLS</i>	vit_18s0001g03430	TTGATATCCCACGACACACCG	ATTGAGATCAGCACCCAGAGGC
<i>VvDFR</i>	vit_16s0039g02350	TGAGAAGGAGAAACATGCATGCCA	AGGTGACCCATTGCAACTTTCA
<i>VvMYB14</i>	vit_07s0005g03340	CGGAGAGCCTTGGGTATGGA	TGCAGGGTGTAGTAATGTCCGA
<i>VvMYBC2-L3</i>	vit_214s0006g01620	CTCACCATTGCCATTCCTGCT	AGGATTTGCGTCACCTTCCAC
<i>VvMYB4R1</i>	vit_17s0000g02710	CCTCTCTCATTGAAGCCGCTC	GTTTCTGGATTGCACGGAGGA
<i>VvNAC44</i>	vit_06s0004g00020	GGACGACTGGGTTCTTTGCC	CCATCGTCTTCAGCCACCTC
<i>VvNAC60</i>	vit_08s0007g07670	ACGTTTCGAGCATGGATGGG	CTTTGCGGGAGGTCTGACTG
<i>VvUBI</i>	vit_219s0177g00040	AATGGTCAGTTGGCCCTACCT	TGGCTGAGACCCACAAAACC

Tab.3. Elenco dei geni studiati, relativo Gene ID e sequenza dei primer forward e reverse utilizzati.

Risultati e discussione

Fenotipizzazione:

Dai rilievi fenologici eseguiti durante la stagione vegetativa 2017 non sono emerse differenze significative tra le tesi, lo sviluppo è stato regolare e omogeneo per ognuna delle viti. In particolare, le fasi di invaiatura al 75% e piena maturità (in corrispondenza dei campionamenti delle uve) sono stati raggiunti nelle medesime date, in tutte le piante.

Le misurazioni dello stato fisiologico hanno confermato che l'irrigazione a goccia fornita era adeguata per evitare l'insorgenza di stress idrico e danni da siccità nelle viti, nonostante l'estate particolarmente calda e asciutta. Nello specifico, il *midday stem water potential* è sempre rimasto sotto della soglia di -1 MPa ed i parametri relativi agli scambi gassosi (fotosintesi netta, traspirazione, conduttanza stomatica e *water use efficiency*) non sono mai risultati significativamente differenti tra le tesi. I dati di fluorescenza della clorofilla (F_0 , F_m , F_v/F_m) sono stati omogenei tra le piante, in ciascun rilievo effettuato. Le misurazioni della clorofilla delle foglie (SPAD) hanno fornito valori stabili durante il periodo di indagine e le foglie adulte avevano un buon contenuto di pigmenti fotosintetici. Le viti afferenti ad ognuna delle tesi, dunque, sono risultate sane, dotate di buona funzionalità fogliare, fotosinteticamente attive ed efficienti.

Al momento della raccolta, avvenuta a piena maturità nell'ultima settimana di agosto, dalla quantificazione della resa per pianta non sono apparse differenze significative tra le tesi a livello produttivo. Tutti i parametri valutati (resa/ceppo, numero di grappoli, peso medio del grappolo, peso medio dell'acino) sono risultati simili tra le tesi. La produzione delle piante è stata piuttosto contenuta (in media inferiore a 500 g), principalmente a causa della condizione di crescita in vaso. Tutti i grappoli avevano una forma simile, quella tipica della varietà *Pinot nero*: piccoli,

compatti e cilindrici. Le bacche avevano dimensioni medie, forma sferoidale, buccia nera con pigmentazione omogenea e contenevano in media 2-3 semi (descrizione secondo le linee guida ampelografiche, O.I.V., 2009). Anche a livello di maturità tecnologica delle uve non sono emerse differenze tra le tre tesi considerate e l'effetto del portinnesto non è stato rilevato su nessun parametro considerato. La maturità delle bacche era pienamente raggiunta in tutte le tesi: il livello medio di zuccheri nei mosti (attorno a 20° Brix) indicava un buon accumulo finale e l'acidità totale (circa 7 g/L di acido tartarico) ed il pH (circa 3,35) avevano valori appropriati per uve adatte alla vinificazione. Le due tesi di portinnesto hanno dato risultati simili tra loro e simili alle piante franche di piede, usate come controllo. I risultati ottenuti nel presente lavoro permettono, quindi, di dedurre che i portinnesti adoperati, in condizioni ottimali di irrigazione e in assenza di fattori limitanti, non hanno avuto effetto sul metabolismo primario delle viti.

Per quanto riguarda la maturità fenolica, dalle analisi sugli estratti delle uve (bucce e semi) non sono state riscontrate differenze significative tra le tesi, relativamente alla quantità (mg/kg uva) di antociani e polifenoli, sia estraibili che totali.

Al contrario, sono emerse interessanti differenze a livello di profilo antocianico percentuale delle bucce, che, come è noto, nel *Pinot nero* è caratterizzato dalla prevalenza di malvidina, seguita dalla peonidina e dalla totale assenza di antociani acilati (Mattivi *et al.*, 2006). Dalle analisi HPLC effettuate, si sono confermate le caratteristiche del profilo, ma è stato evidenziato tra le tesi un diverso accumulo percentuale delle 5 singole antocianine. Le piante innestate su 1103 Paulsen (PAU) avevano un contenuto più alto di antociani disostituiti, dovuto ad un maggiore accumulo di peonidina-3-glucoside, le piante innestate su M101-14 (101) avevano valori intermedi, mentre le piante controllo (FRA) avevano un maggior contenuto di antociani trisostituiti, dovuto ad un maggiore accumulo di malvidina-3-glucoside. Di conseguenza, anche il rapporto tra antociani disostituiti e trisostituiti è risultato significativamente diverso (Fig.1). La porzione relativa tra due tipi di antocianine determina la colorazione delle bucce, variabile tra rosso, viola e blu. Tale caratteristica è ritenuta molto importante in enologia, poiché può influenzare la qualità dei vini ottenuti, in termini di intensità colorante e tonalità, nonché la loro attitudine all'invecchiamento. Il profilo antocianico è un carattere determinato geneticamente ed è tipico in ciascuna varietà, ma può subire lievi alterazioni, anche significative, in questo caso dovute all'influenza del portinnesto, come ipotizzato anche da alcuni autori (Fasoli *et al.*, 2018).

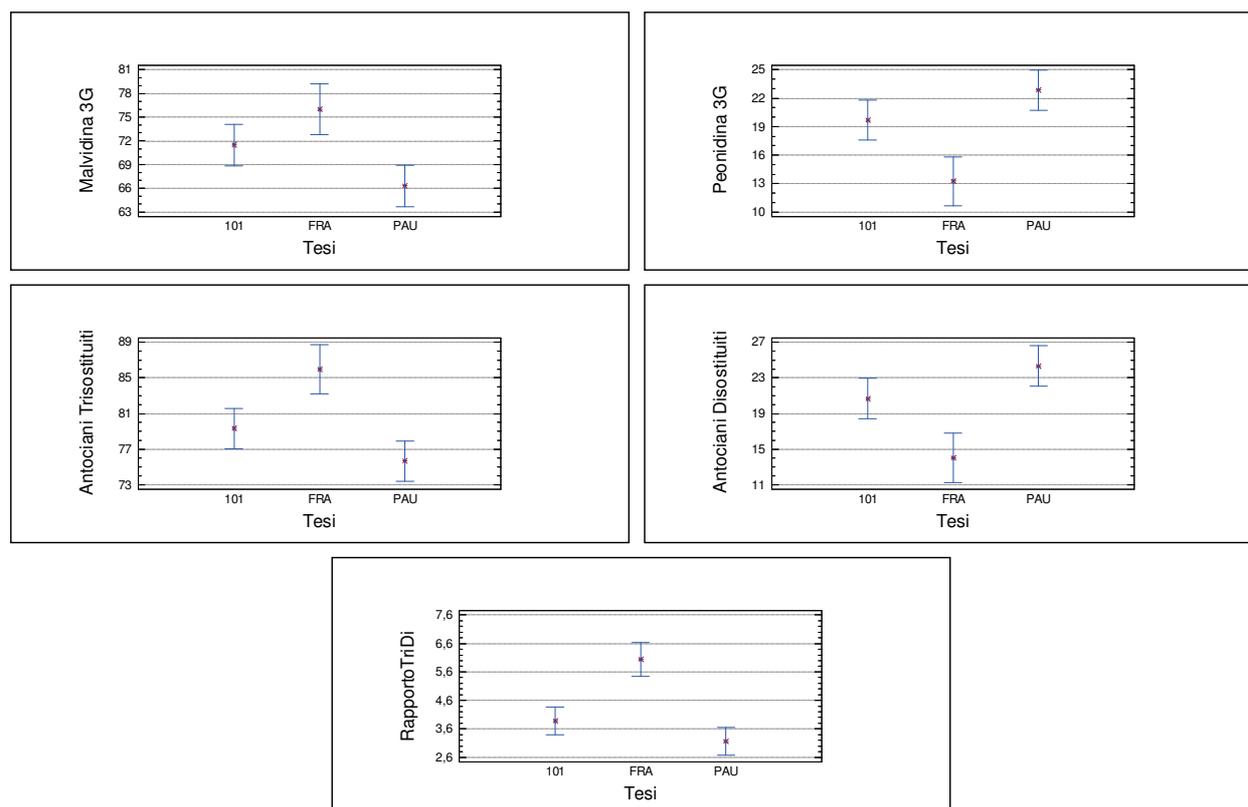


Fig.1. Profilo antocianico percentuale: contenuto in malvidina-3-glucoside, peonidina-3-glucosidde, Σ antociani trisostituiti, Σ antociani disostituiti e rapporto antociani trisostituiti/disostituiti. Tesi: 101=M101-14; PAU=1103 Paulsen; FRA=controllo (LSD assunta per $P<0,05$).

Per quanto riguarda il contenuto in flavonoli, una classe di composti che si trova sempre in forma glicosilata ed è presente nello strato più superficiale della buccia degli acini, in *Pinot nero* il profilo è caratterizzato da un alto contenuto di quercetina, seguito da una minore quantità di miricetina e da concentrazioni minime di kaempferolo e isoramnetina (Mattivi *et al.*, 2006). Le analisi effettuate hanno confermato il profilo già noto e, tra le tesi, sono emerse differenze significative nell'accumulo di alcuni flavonoli. Le piante controllo (FRA) avevano una quantità maggiore di rutina (o rutoside, un glicoside della quercetina), mentre un contenuto minore è stato identificato nella tesi 1103 Paulsen (PAU) e quello minimo in M101-14 (101). Inoltre, presenza di miricetina-glucoside era significativamente diversa tra le tesi, più alta in 1103 Paulsen e M101-14 e più bassa nelle piante controllo.

Riguardo i flavan-3-oli, che hanno solitamente alte concentrazioni in *Pinot nero*, l'unico metabolita presente in quantità significativamente diverse tra le tesi è stata la catechina, con un contenuto maggiore in 1103 Paulsen e inferiore in M101-14 e piante controllo.

Infine, il resveratrolo come la polidatina (o piceide, un glicoside stilbenoide, il principale derivato del resveratrolo nell'uva) è stato rilevato in concentrazioni significativamente diverse: maggiore nelle tesi innestate su 1103 Paulsen, mentre M101-14 e le viti non innestate ne avevano una quantità inferiore, più simile tra loro. Tutti i risultati sono mostrati in Figura 2.

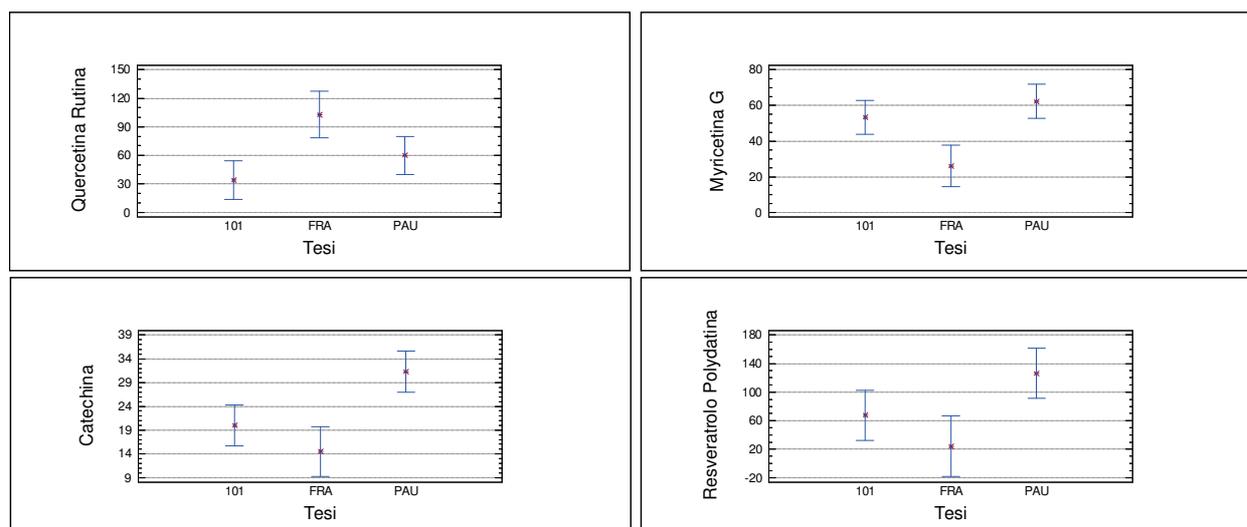


Fig.2. Contenuto di quercetina-rutina, miricetina-glucoside, catechina e resveratrolo-polidatina, espressi come area HPLC. Tesi: 101=M101-14; PAU=1103 Paulsen; FRA=controllo (LSD assunta per $P<0,05$).

Durante la stagione invernale tra 2017 e 2018 è stato effettuato un rilievo del peso di potatura per ogni pianta e, come ci si aspettava, le viti innestate su 1103 Paulsen (PAU) avevano una quantità significativamente più alta rispetto alle tesi innestate su M101-14 (101) e controllo (FRA) (Fig.3); questo risultato supporta l'ipotesi comunemente nota che questo portinnesto induce nel nastro un maggiore vigore vegetativo, probabilmente a causa della struttura del sistema radicale con ampio angolo geotropico.

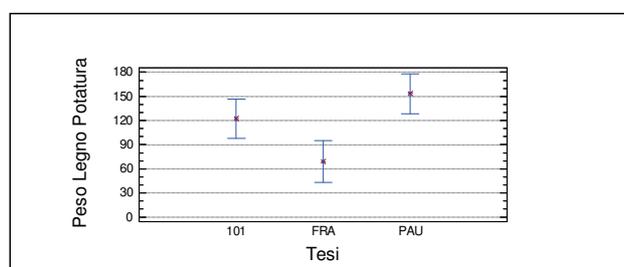


Fig.3. Peso del legno di potatura (g). Tesi: 101=M101-14; PAU=1103 Paulsen; FRA=controllo (LSD assunta per $P<0,05$).

Analisi molecolari:

In seguito all'analisi trascrittomico (RNA-seq), eseguita sullo stesso sistema sperimentale nel 2012, come progetto pilota (medesime tesi e ripetizioni, tenute in condizioni simili e medesimi tessuti campionati), è emerso che i geni maggiormente modulati tra le 3 tesi a maturazione appartengono al metabolismo secondario, ed in particolare alla via biosintetica dei fenilpropanoidi. Di questi, sono stati selezionati 9 geni differenzialmente espressi tra le 3 tesi, per valutare la variabilità nelle quantità di trascritto nelle bucce, in 2 precise fasi fenologiche, ovvero invaiatura (al 75%) e piena maturità nell'anno 2017. I ruoli dei 9 geni selezionati sono i seguenti: 4 sono geni funzionali, coinvolti in diversi punti chiave della sintesi di differenti sostanze fenoliche e 5 geni codificano per fattori di trascrizione (appartenenti alle famiglie MYB

e NAC), responsabili della regolazione trascrizionale di geni strutturali. Le analisi di espressione genica sono state effettuate tramite qRT-PCR e i risultati sono stati normalizzati con il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$. In generale, i 9 geni analizzati risultano essere differenzialmente espressi tra le tesi, con differenze più consistenti nei campioni a piena maturità, rispetto all'invaiaatura. A causa della complessità della via biosintetica dei fenilpropanoidi e dato l'alto numero di meccanismi post-trascrizionali e post-traduzionali coinvolti nella regolazione del pathway molecolare, non è facile correlare direttamente i risultati ottenuti nell'attività di fenotipizzazione con i livelli di espressione dei 9 geni presi in esame. Si deve, inoltre, considerare che molti di questi geni, come già anticipato, sono membri di famiglie multigeniche, e non è quindi ovvio che siano direttamente ed univocamente responsabili del fenotipo osservato. È particolarmente difficile, infatti, trovare una corrispondenza diretta tra le concentrazioni finali dei metaboliti e la quantità di un trascritto dei geni coinvolti negli step intermedi di sintesi, soprattutto in un pathway complesso come quello esaminato. Un chiaro esempio è dato dal gene *VvPAL*, di cui è difficile avere riscontri fenotipici, poiché l'attività del relativo enzima ha un complesso controllo multi-livello (Zhang & Liu, 2015). Con i risultati ottenuti si è potuta confrontare, invece, la coerenza con alcune informazioni già presenti in letteratura, soprattutto riguardo le differenze di espressione genica tra invaiatura e maturazione.

Il gene *VvPAL* codifica per la FENILALANINA AMMONIO-LIASI, l'enzima responsabile del primo step del pathway di biosintesi dei fenilpropanoidi, in cui dalla fenilalanina viene sintetizzato l'acido cinnamico, il substrato comune delle reazioni successive. L'espressione di *VvPAL* aumenta in modo graduale durante la maturazione (Gatto et al., 2008), anche sotto lo stimolo dei raggi UV-B, che up-regolando alcuni geni tra cui *PAL*, innescano la sintesi di composti UV-assorbenti come i flavonoidi (Teixeira *et al.*, 2013). Dai risultati ottenuti, l'espressione del gene all'invaiaatura è stata simile tra le tesi. Nel controllo la quantità di trascritto ha subito un aumento a maturità (come da letteratura), mentre in M-101-14 e in 1103P ha avuto un trend di espressione superiore nel primo stadio di campionamento ed è rimasto pressoché stabile o più basso nel successivo campionamento. Il gene *VvF3'H* codifica per la FLAVONOIDE 3'-IDROSSILASI, un enzima responsabile dell'idrossilazione in posizione 3' dell'anello B dei flavonoidi naringenina e di-idrokampferolo, che porta alla successiva sintesi di flavonoli, proantocianidine e antociani disostituiti. Secondo lo studio di Castellarin (*et al.*, 2006), condotto sulle variazioni di colore nelle uve a bacca nera, in *Merlot* gli antociani derivati dalla cianidina (disostituiti) sono sintetizzati in misura maggiore nella prima fase dell'invaiaatura. Tale risultato è in linea con quelli ottenuti nel presente studio, in quanto la quantità di trascritto del gene *VvF3'H* è maggiore al momento dell'invaiaatura, rispetto alla piena maturità. A maturità il gene *VvF3'H* è più espresso nel controllo e meno espresso nella tesi PAU. L'enzima F3'H compete con F3'5'H (codificato dal relativo gene, appartenente ad una famiglia multigenica compresa nel genoma di *Vitis vinifera*) per l'utilizzo di substrati comuni, biforcando, di fatto, il

pathway di sintesi dei flavonoidi. Secondo alcuni autori, la prevalenza di F3'H su F3'5'H porta ad avere un maggiore accumulo di cianidina, il precursore della peonidina, in sfavore dell'accumulo di delphinidina, precursore di malvidina e petunidina (Kuhn *et al.*, 2014). Nei risultati ottenuti in questo studio non c'è linearità diretta tra le concentrazioni dei metaboliti e il livello di espressione dei geni. Il gene *VvFLS* codifica per la FLAVONOLO SINTASI, un enzima che catalizza la formazione di flavonoli agliconi a partire da di-idrokampferolo, di-idromiricetina e di-idroquercetina. Durante la prima fase della crescita, nelle bucce si accumulano maggiormente flavonoli e proantocianidine (Bogs *et al.*, 2006) e secondo Ali (*et al.*, 2011) i trascritti della FLAVONOLO SINTASI diminuiscono progressivamente durante la maturazione nelle bucce di *Cabernet sauvignon*. Questa tesi si può considerare supportata dai risultati ottenuti, vista la maggiore espressione genica di *VvFLS* all'invaiaitura e una minore alla maturità. Inoltre, l'espressione nei due time point è stata più alta nel controllo e potrebbe essere correlata con la maggiore concentrazione di rutina nelle bucce. I substrati di FLS (i di-idroflavonoli) sono comuni anche all'enzima DFR, che svolge il primo step di sintesi delle antocianidine, ovvero converte i di-idroflavonoli in leucoantocianidine. Secondo Castellarin (*et al.*, 2006), nella fase di post-invaiaitura, l'accumulo di proantocianidine nelle bucce diminuisce in modo drastico. I valori ottenuti per l'espressione del gene *VvDFR*, che resta similmente alta in entrambi i time point di campionamento, possono far ipotizzare che all'invaiaitura che i substrati intermedi vengano convertiti preferibilmente in proantocianidine, mentre a maturità il metabolismo sia a favore della sintesi di antociani.

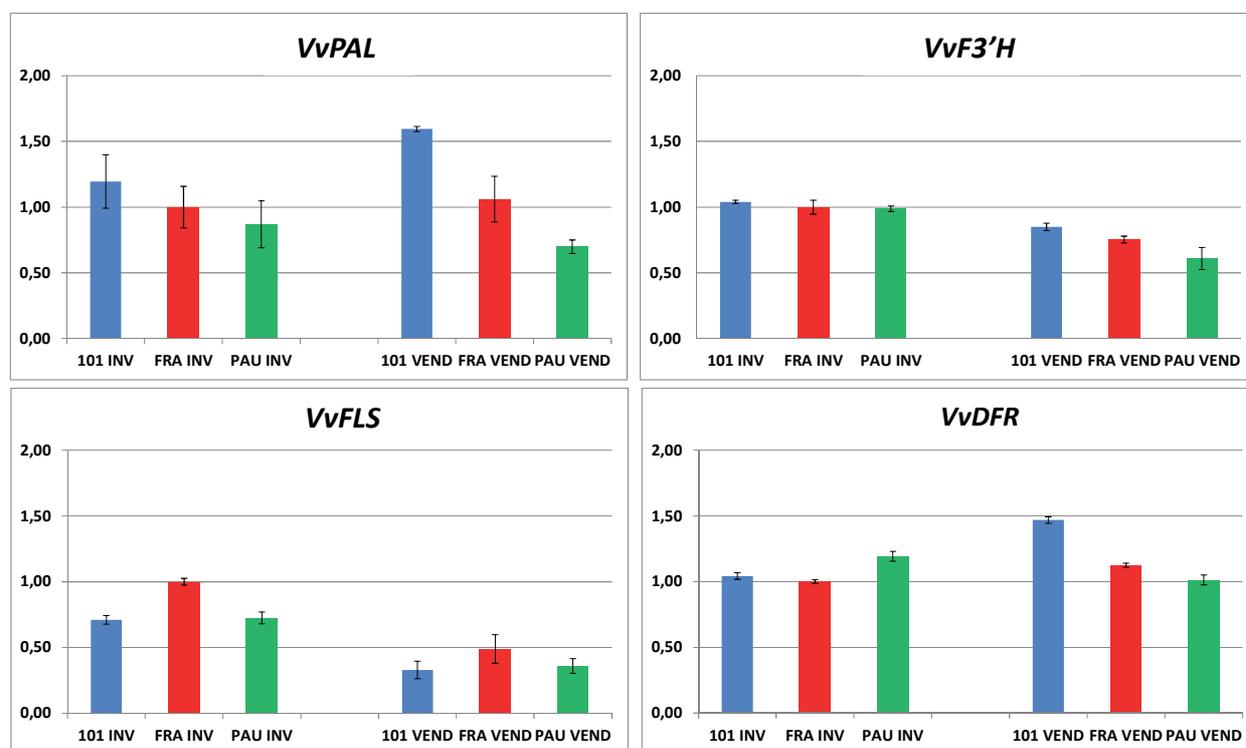


Fig.4. Espressione dei 4 geni strutturali. Analisi con qReal-Time PCR, calcolo da Ct value con il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (le barre indicano l'errore standard). Tesi: 101=M101-14; PAU=1103 Paulsen; FRA=controllo; INV=invaiaitura; VEND=maturità.

I fattori di trascrizione MYB appartengono al complesso proteico MBW (insieme a bHLH e WD40), che controlla, a diversi livelli, il pathway di sintesi dei fenilpropanoidi. Le proteine MYB hanno una struttura conservata, caratterizzata da uno specifico dominio N-terminale capace di legare il DNA, che è costituito da 52 amminoacidi e si ripete 1, 2 o 3 volte (R1, R2, R3). La famiglia MYB comprende numerosissimi membri, tutti regolatori della trascrizione (sia positivi che negativi), coinvolti nella via biosintetica di flavonoli, antocianine, proantocianidine e stilbeni. Sul ruolo dei diversi geni MYB sono state effettuate e sono tutt'ora in atto numerose ricerche, ma le informazioni che si trovano in letteratura sono, a volte, discordanti.

Del gene *VvMYB14* si sa che è coinvolto nella regolazione a feedback della sintesi del resveratrolo, un ramo del pathway dei fenilpropanoidi (Fasoli *et al.*, 2018; Jeandet *et al.*, 2019). Il resveratrolo è una molecola che ha importante ruolo nella dissipazione dello stress ossidativo, e si è visto che viene accumulato anche negli acini di viti sane e non stressate verso la fine della maturazione (Gatto *et al.*, 2008). La produzione del fattore di trascrizione MYB14 è stimolata dallo stress indotto dai raggi UV-C, il quale, insieme ad un altro TF (WRKY3), induce l'attività del gene *STS29* (uno dei geni della famiglia genica codificante per l'enzima STILBENE SINTASI). In presenza di resveratrolo, *MYB14* è down-regolato dal TF WRKY8 che blocca, di conseguenza, l'attività di *STS29*, facendo scendere la concentrazione di resveratrolo. I risultati mostrano per *VvMYB14* un'espressione simile tra le tesi all'invaiaitura, a maturità risulta più alta la quantità di trascritto in M101-14.

Il gene *VvMYBC2-L3* è coinvolto nella biosintesi delle antocianine. Si sa che agisce come repressore trascrizionale nella sintesi degli antociani (Cavallini *et al.*, 2015). Secondo Zhu (*et al.*, 2019) l'espressione di *VvMYBC2-L3* in petali di tabacco transgenico reprime l'espressione del gene *VvDFR* ed induce l'espressione di *VvFLS*. Ma si tratta soltanto di un'ipotesi, in quanto la regolazione negativa della sintesi degli antociani nelle piante resta poco conosciuta. Secondo i risultati, all'invaiaitura l'espressione è maggiore nella tesi 1103 Paulsen, intermedia per il controllo e più bassa in M101-14; l'andamento risulta esattamente opposto a maturità, maggiore in M101-14, intermedio nel controllo e più basso in 1103 Paulsen.

Il gene *VvMYB4R1* è coinvolto nella sintesi degli stilbeni, ma si conoscono pochi ulteriori dettagli sulla sua attività funzionale (Vezzulli *et al.*, 2019). L'espressione di *VvMYB4R1* è minore nello stadio di invaiaitura e sale in tutte le tesi al momento della maturità; la quantità di trascritto è più alta in entrambi i casi per M101-14.

I geni appartenenti alla famiglia *NAC* sono fattori di trascrizione specifici delle piante. Hanno un dominio NAM conservato al N-terminale per il DNA-binding e i membri, 79 in vite secondo Wang

(*et al.* 2013), hanno diversi ruoli nei processi di sviluppo della pianta e nella maturazione dei frutti, nonché nella risposta agli stress biotici ed abiotici. Le precise funzioni non sono state individuate per tutti, si sa soltanto che spesso sono tessuto-specifici e possono essere attivatori o repressori, anche secondo l'ambiente circostante (Le Hénanff *et al.*, 2013).

Il gene *VvNAC44* è coinvolto nella maturazione degli acini e nella risposta a stress (Suzuki *et al.*, 2015), in particolare nella sintesi di stilbeni. È molto espresso nelle tesi innestate rispetto al controllo, sia all'invaiaitura che a maturità, con differenze notevoli, soprattutto nel secondo tempo di campionamento.

Anche *VvNAC60* è coinvolto nella regolazione della maturazione degli acini e nella risposta a stress (Sun *et al.*, 2012). Il gene ha un livello di espressione molto diverso nei due tempi, con differenze minime, ma significative tra le tesi. Il controllo ha sempre un livello di espressione più alto.

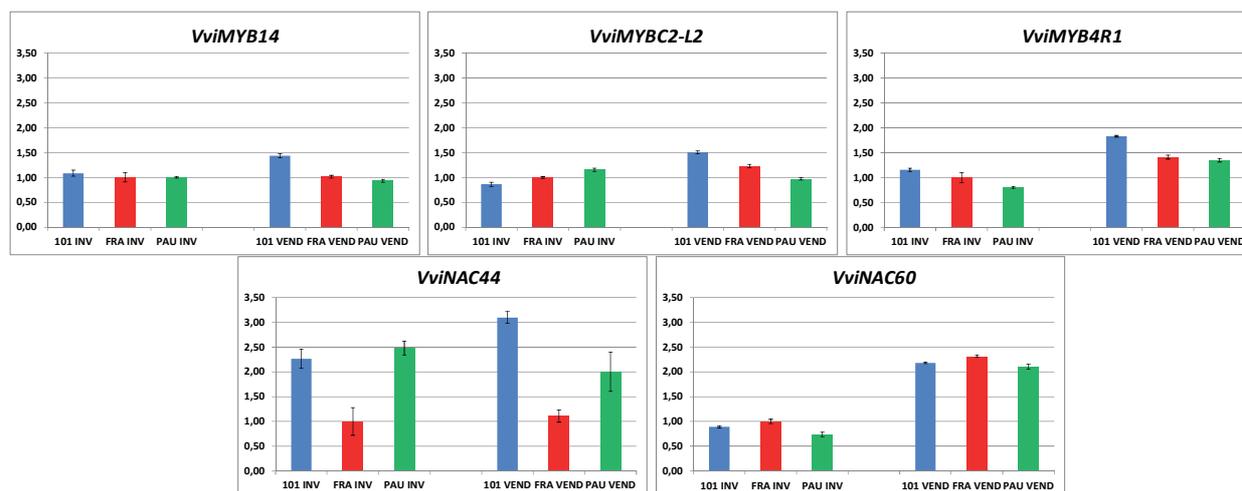


Fig.5. Espressione dei 5 geni codificanti per fattori di trascrizione. Analisi con qReal-Time PCR, calcolo da Ct value con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (le barre indicano l'errore standard). Tesi: 101=M101-14; PAU=1103 Paulsen; FRA=non innestato; INV=invaiaitura; VEND=maturità.

Conclusioni

Lo scopo di questo lavoro di ricerca è stato quello di studiare l'influenza del portinnesto sulla qualità dell'uva, in viti mantenute in condizioni agronomiche identiche e con medesimo abbondante apporto idrico. L'utilizzo di un sistema sperimentale di piante in vaso ha permesso di gestire in modo uniforme tutte le tesi. I risultati ottenuti consentono di dedurre che i portinnesti impiegati, ovvero 1103 Paulsen e M101-14, su uve *Pinot nero*, in condizioni ottimali di irrigazione ed in assenza di fattori limitanti, non hanno causato alterazioni nel nesto in termini di stadio fenologico di sviluppo, efficienza fotosintetica, produzione di uva e relativa maturazione tecnologica. Tali portinnesti, dunque, non hanno avuto effetti diretti sul metabolismo primario delle viti. Come ci si aspettava, l'unico parametro rilevato come significativamente

differente è stato il peso del legno per la tesi 1103 Paulsen, un portinnesto che notoriamente conferisce maggiore vigoria nel nesto.

Alcune differenze importanti, invece, sono state riscontrate a livello del metabolismo secondario delle uve, in particolare nelle bucce. Le 3 tesi hanno accumulato concentrazioni significativamente diverse di alcune molecole sintetizzate nell'ambito del pathway dei fenilpropanoidi, ovvero nel profilo antocianico percentuale (malvidina e peonidina), nei flavonoli (quercetina-rutina e miricetina-glucoside), nei flavan-3-oli (catechina) e negli stilbeni (resveratrolo-polidatina).

Anche le analisi molecolari, effettuate per avere informazioni riguardo il livello di regolazione dell'espressione di alcuni precisi geni strutturali o fattori di trascrizione, hanno dato risultati interessanti. I geni, selezionati a partire da uno studio precedente di trascrittomica, sono differenzialmente espressi tra le tesi nella stagione vegetativa 2017. Non è stata riscontrata una corrispondenza diretta tra le concentrazioni dei metaboliti secondari e la quantità di trascritto dei 9 geni considerati. Come si può ritrovare in molti studi sul medesimo argomento, non è, in effetti, possibile stabilire delle relazioni univoche riguardo l'accumulo di sostanze fenoliche, un processo complesso, ricco di interconnessioni (Pastore *et al.*, 2017). La concentrazione delle molecole sintetizzate in un tessuto ed in un determinato momento può non avere corrispondenza con il livello di espressione di un gene. Ciò viene spiegato dal fatto che nell'ambito del metabolismo secondario insorgono diversi livelli di regolazione post-trascrizionale, post-traduzionale, competizione tra gli enzimi per i substrati intermedi, necessità di cofattori nelle reazioni, che si ripercuotono sulla quantità finale di flavonoli, antocianine, proantocianidine e stilbeni. Inoltre, la presenza di famiglie multigeniche per i geni coinvolti nella biosintesi dei metaboliti secondari può dare origine a diversi profili di espressione spaziotemporali per i vari membri della stessa famiglia, che possono, o meno, essere in linea con la quantità finale del metabolita prodotto dalla via biosintetica (Kunh *et al.*, 2014).

L'effetto dei portinnesti sul fenotipo delle viti, ma soprattutto delle uve, è un argomento molto attuale, che stimola forte interesse nel mondo della ricerca. Anche nei lavori più recenti, e nonostante l'impiego di metodi di analisi avanzati e la disponibilità di tecnologie *high-throughput*, si sottolinea sempre che la complessità del network molecolare dello sviluppo della pianta e della maturazione dei frutti non permette di chiarimenti definitivi. La situazione è ancora più complicata in una coltura complessa come quella della vite, che ha una grande variabilità genetica data dalle numerosissime varietà che comprende e che esprime notevoli differenze nei frutti, anche all'interno di un singolo grappolo. Lo studio presentato avrà un seguito con la ripetizione delle ricerche sul medesimo sistema sperimentale, aggiungendo la variabile stress

idrico, per verificare se in condizioni di carenza di acqua viene ulteriormente modulata la risposta nel nesto, sotto l'influenza dei due diversi portinnesti considerati (1103 Paulsen e M101-14). Il portinnesto è un componente chiave che media l'effetto dell'ambiente sulla qualità delle uve (Ollat *et al.*, 2017) e comprendere alcuni meccanismi metabolici può risultare fondamentale per sfruttare questo elemento nell'ambito dei cambiamenti climatici e del miglioramento genetico in viticoltura.

Bibliografia

- Ali MB, Howard S, Chen S, Wang Y, Yu O, Kovacs LG, Qiu W (2011). Berry skin development in Norton grape: Distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 11: 7.
- Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson SP (2006). Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant Physiology*, 140: 279-291.
- Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol*, 111: 1059-1066.
- Buhtz A, Pieritz J, Springer F, Kehr J (2010). Phloem small RNAs, nutrient stress responses and systemic mobility". *BMC Plant Biol*, 10: 64.
- Castellarin SD, Di Gaspero G, Marconi R, Nonis A, Peterlunger E, Paillard S, Adam-Blondon AF, Testolin R (2006). Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*, 7: 12.
- Cavallini E, Matus JT, Finezzo L, Zenoni S, Loyola R, Guzzo F, Schlechter R, Ageorges A, Arce-Johnson P, Torielli GB (2015). The phenylpropanoid pathway is controlled at different branches by a set of R2R3-MYB C2 repressors in grapevine. *Plant Physiol*, 167: 1448-1470.
- Chitarra W, Perrone I, Avanzato CG, Minio A, Boccacci P, Santini D, Gilardi G, Siciliano I, Gullino ML, Delledonne M, Mannini F, Gambino G (2017). Grapevine grafting: scion transcript profiling and defense-related metabolites induced by rootstocks. *Front Plant Sci*, 8: 564.
- Cookson SJ, Clemente Moreno MJ, Hevin C, Nyamba Mendome LZ, Delrot S, Magnin N, Trossat-Magnin C, Ollat N (2014). Heterografting with nonself rootstocks induces genes involved in stress responses at the graft interface when compared with autografted controls. *J Exp Bot*, 65: 2473-2481.
- Corso M, Vannozi A, Maza E, Vitulo N, Meggio F, Pitacco A, Telatin A, D'Angelo M, Feltrin E, Negri AS, Prinsi B, Valle G, Ramina A, Bouzayen M, Bonghi C, Lucchin M (2015). Comprehensive transcript profiling of two grapevine rootstock genotypes contrasting in drought susceptibility links the phenylpropanoid pathway to enhanced tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 66: 5739-5752.
- Cui ZH, Bi WL, Hao XY, Li PM, Duan Y, Walker MA, Xu Y, Wang QC (2017). Drought Stress Enhances Up-Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine leafroll-associated virus 3- Infected in vitro Grapevine (*Vitis vinifera*) Leaves. *Plant Disease*, 101: 1606-1615.
- Di Fillippo M, Vila H (2011). Influence of different rootstocks on the vegetative and reproductive performance of *Vitis vinifera* L. Malbec under irrigated conditions. *J Int Sci Vigne Vin*, 45: 75-84.
- Di Stefano R, Cravero MC (1991). Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. *Rivista di Viticoltura e di enologia*, 2: 37-45.
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust J Grape Wine Res* 9: 110-121.
- Fasoli M, Richter CL, Zenoni S, Bertini E, Vitulo N, Santo SD, Dokoozlian N, Pezzotti M, Torielli GB (2018). Timing and order of the molecular events marking the onset of berry ripening in grapevine. *Plant Physiol*, 178: 1187-1206.
- Gatto P, Vrhovsek U, Muth J, Segala C, Romualdi C, Fontana P, Pruefer D, Stefanini M, Moser C, Mattivi F, Velasco R (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem*, 56: 11773-11785.
- Gomez-Alonso S, Garcia-Romero E, Hermosin-Gutiérrez I (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 618-626.
- Harada T (2010). Grafting and RNA transport via phloem tissue in horticultural plants. *Scientia Horticulturae*, 125: 545-550.
- Jeandet P, Clément C, Cordelier S (2019). Regulation of resveratrol biosynthesis in grapevine: new approaches for disease resistance?. *J Exp Bot*, 70: 375-378.
- Keller M, Mills LJ, Harbertson JF (2012). Rootstock effect on deficit-irrigated winegrapes in a dry climate: vigor, yield formation and fruit ripening. *Am J Enol Vitic*, 63: 29-39.

- Kuhn N, Guan L, Dai ZW, Wu BH, Lauvergeat V, Gomès E, Li SH, Godoy F, Arce-Johnson P, Delrot S (2014). Berry ripening: recently heard through the grapevine?. *J Exp Bot*, 65: 4543-4559.
- Le Hénanff G, Profizi C, Courteaux B, Rabenoelina F, Gerard C, Clement C, Baillieux F, Cordelier S, Dhondt-Cordelier S (2013). Grapevine NAC1 transcription factor as a convergent node in developmental processes, abiotic stresses, and necrotrophic/biotrophic pathogen tolerance. *J Exp Bot* 64: 4877-4893.
- Maré C, Mica E, Cattivelli L (2016). Molecular advances in rootstock-scion interaction in grapevine. *Acta Horticulturae*, 1136: 155-160.
- Massonnet M, Fasoli M, Torielli GB, Altieri M, Sandri M, Zuccolotto P, Paci P, Gardiman M, Zenoni S, Pezzotti M (2017). Ripening Transcriptomic Program in Red and White Grapevine Varieties Correlates with Berry Skin Anthocyanin Accumulation. *Plant Physiology*, 174: 2376-2396.
- Mattii GB, Orlandini S, Calabrese CE (2005). Analysis of grapevine vegeto-productive responses to plant density and rootstock. *Int. GESCO - Viticulture Congress*, 14, Geisenheim, Germany, vol. 2: 629-634.
- Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R (2006). Metabolite profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J Agric Food Chem*, 54: 7692-7702.
- Mica E, Faccioli P, Tononi P, Delledonne M, Storchi P, Zombardo A, Morreale G, Vařková R, Dobrev PI, Mocali S, Bernardo L, Giusti L, Costantini E, Priori S, Crosatti C, Reshef N, Or E, Fait A, Cattivelli L (2014). Rootstock-scion interaction in grapevine: An omics perspective. *Proceedings of the 58th Italian Society of Agricultural Genetics*, poster communication 1.33.
- Nuzzo V, Matthews MA (2006). Response of fruit growth and ripening to crop level in dry-farmed Cabernet sauvignon on four rootstocks. *Am J Enol Vitic*, 57: 314-324.
- O.I.V. (2009). Compendium of international methods of analysis of wines and musts. <http://www.oiv.int>.
- O.I.V. (2009). 2nd edition of the O.I.V. descriptor list for grape varieties and Vitis species. <http://www.oiv.int>.
- Ollat N, Cookson SJ, Lauvergeat V, Marguerit E, Barrieu F, Gambetta G, Goutouly JP, Tandonnet JP, Vivin P, Delrot S (2017). Grapevines roots: the dark side. *Acta Horticulturae*, 1188: 213-226.
- Palliotti A, Poni S, Silvestroni O (2015). La nuova viticoltura. Edagricole, Bologna, Italy.
- Palumbo MC, Zenoni S, Fasoli M, Massonnet M, Farina L, Castiglione F, Pezzotti M, Paci P (2014). Integrated Network Analysis Identifies Fight-Club Nodes as a Class of Hubs Encompassing Key Putative Switch Genes That Induce Major Transcriptome Reprogramming during Grapevine development. *The Plant Cell*, 26: 4617-4635.
- Pastore C, Dal Santo S, Zenoni S, Movahed N, Allegro G, Valentini G, Filippetti I, Torielli GB (2017). Whole Plant Temperature Manipulation Affects Flavonoid Metabolism and the Transcriptome of Grapevine Berries. *Front Plant Sci*, 8: 929.
- Sun X, Korir NK, Han J, Shanguan LF, Kayesh E, Leng XP, Fang JG (2012). Characterization of grapevine microR164 and its target genes. *Mol Biol Rep*, 39: 9463-9472.
- Suzuki M, Nakabayashi R, Ogata Y, Sakurai N, Tokimatsu T, Goto S, Suzuki M, Jasinski M, Martinoia E, Otagaki S, Matsumoto S, Saito K, Shiratake K (2015). Multiomics in Grape Berry Skin Revealed Specific induction of the Stilbene Synthetic Pathway by Ultraviolet-C irradiation. *Plant Physiology*, 168: 47-59.
- Teixeira A, Eiras-Dias J, Castellarin S, Geròs H (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int J Mol Sci*, 14: 18711-18739.
- Vannozi A, Wong DCJ, Holl J, Hmam I, Matus JT, Bogs J, Ziegler T, Dry I, Barcaccia G, Lucchin M (2018). Combinational Regulation of Stilbene Synthase Genes by WRKY and MYB Transcription Factors in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Physiol*, 59: 1043-1059.
- Vezzulli S, Malacarne G, Masuero D, Vecchione A, Dolzani C, Goremykin V, Mehari ZH, Banchi E, Velasco R, Stefanini M, Vrhovsek U, Zulini L, Franceschi P, Moser C (2019). The *Rpv3-3* Haplotype and Stilbenoid Induction Mediate Downy Mildew Resistance in a Grapevine Interspecific Population. *Front Plant Sci*, 10: 234.
- Wang N, Zheng Y, Xin H, Fang L, Li S (2013). Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep*, 32: 61-75.
- Yang Y, Mao L, Jittayasothon Y, Kang Y, Jiao C, Fei Z, Zhong GY (2015). Messenger RNA exchange between scions and rootstocks in grafted grapevines. *BMC Genomics*, 15: 251.
- Zhang XB, Liu CJ (2015). Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Mol Plant*, 8: 17-27.
- Zhu Z, Li G, Li L, Zhang Q, Han Z, Chen X, Li B (2019). A R2R3-MYB Transcription Factor, *VvMYBC2L2*, Functions as a Transcriptional Repressor of Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecules*, 24: 92.

Riassunto:

In gran parte dei distretti vinicoli mondiali, le viti coltivate devono essere necessariamente innestate su radici di Vitis americane per superare il problema della fillossera, una grave malattia esplosa in Europa alla fine del 1800. I portinnesti rappresentano una forma molto efficace di controllo biologico contro il parassita del suolo Daktulosphaira vitifoliae e, secondo molti autori, influenzano la fisiologia del nesto, l'adattabilità della pianta all'ambiente e la sua capacità di reagire agli stress abiotici. L'interazione tra i bionti è complessa ed implica cambiamenti strutturali, integrazione idraulica tra le parti innestate, scambio di ormoni e materiali genetici attraverso il punto di innesto. Nonostante la grande quantità di studi e ipotesi sull'effetto dei diversi portinnesti sulla resa della pianta e sulla qualità dell'uva prodotta, i network molecolari che regolano questa interazione rimangono in gran parte poco conosciuti.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'influenza di due diverse combinazioni di portinnesto (1103 Paulsen e M101-14, opposti tra loro per vigore e tolleranza alla siccità) e viti non innestate (usate come controllo) sul metabolismo secondario di uve Pinot nero, sia a livello biochimico, che a livello di espressione genica. Le ricerche sono state effettuate in un sistema sperimentale di viti in vaso di 10 anni, allevate a controspalliera con potatura a cordone speronato; tutte le piante sono state irrigate in modo abbondante, con quantità di acqua identica per ognuna delle tre tesi.

I risultati hanno permesso di evidenziare considerevoli differenze, sia nella sintesi di alcune classi di flavonoidi che nell'espressione di alcuni geni (strutturali e regolatori) appartenenti al pathway dei fenilpropanoidi.

Abstract:

Most of the grapevines cultivated in the world are grafted in order to overcome the problem of phylloxera, a serious disease that exploded in Europe at the end of 1800. The rootstocks represent not only a very effective form of biological control against the soil-borne pest Daktulosphaira vitifoliae, but also an important way to influence the physiology of the scion, the adaptability to the environment and its response to different kind of abiotic stresses. The rootstock-scion interaction is complex because it implies structural changes, hydraulic integration, exchange of hormones and genetic materials through the graft junction. Despite the great amount of studies and hypotheses about the effect of the different type of rootstocks on plant's yield and grape quality, the molecular networks governing this interaction remain largely unknown.

The aim of this work is to evaluate the influence of two different rootstock combinations (1103 Paulsen and M101-14, mutually opposite in vigor and drought tolerance) and not grafted plants (as control) on the secondary metabolism of Pinot Noir grapes, both biochemically and in terms of gene expression. The project was set up on potted 10-year-old grapevines, trained on vertical shot positioned trellis and spur cordon pruned; all the plants were irrigated abundantly, with the same amount of water.

Taken together, our results suggest that different rootstocks have a direct effect on vines' phenotype and quality, in particular in the synthesis of some flavonoids and in the expression of some genes (both structural and regulatory), belonging to the phenylpropanoid pathway.