

A cura di:



Gicele Sbardelotto
De Bona^{1,2}

Simone Vincenzi^{1,2}

Elisa Angelini³

Nadia Bertazzon³

Marielle Adrian⁴

Jonathan Negrel⁴

Annick Chiltz⁴

Agnès Klinguer⁴

Benoît Poinssot⁴

Marie-Claire Héloir⁴

UN ESTRATTO DI TRALCI DI POTATURA PROTEGGE LA VITE DA ATTACCHI DI BOTRYTIS CINEREA CON UNA DUPLICE MODALITÀ D'AZIONE

Il lavoro dimostra come l'estratto di stilbeni induca alcuni meccanismi di difesa della vite, tra cui l'attivazione di MAPK, l'espressione di geni correlati alla patogenesi (PR) e un gene che codifica per la glutatione-S-transferasi 1



Ricerca presentata all'Enoforum Web Conference candidata per il premio Assoenologi

Gli estratti grezzi di tralci di *Vitis vinifera* rappresentano una fonte naturale di composti stilbenici, che, tra le altre proprietà note, possiedono un'attività antifungina. Nelle nostre prove, l'applicazione esogena di un estratto di stilbeni (SE), ottenuto da tralci di vite, ha ridotto le lesioni necrotiche causate da *Botrytis cinerea* su foglie di vite. L'estratto ha dimostrato di possedere innanzitutto un'attività antifungina diretta, causando l'inibizione della crescita del micelio. È stata poi esplorata su sospensioni cellulari di vite l'attivazione di alcuni meccanismi di difesa della vite, come la produzione di acqua ossigenata, l'attivazione di proteine coinvolte nella risposta agli stress (MAPK) e l'accumulo di fitoalessine stilbeniche. Inoltre, su piante di vite è stata analizzata la trascrizione di alcuni geni che codifica-

no per proteine implicate nelle risposte di difesa. È stato dimostrato che l'estratto di stilbeni induce alcuni meccanismi di difesa della vite, tra cui l'attivazione di MAPK, l'espressione di geni correlati alla patogenesi (PR) e un gene che codifica per la glutatione-S-transferasi 1 (GST1). Al contrario, il trattamento delle foglie di vite con SE regola negativamente la produzione *ex-novo* di stilbeni.

Le premesse della sperimentazione

Durante la coltivazione della vite viene richiesto un uso intensivo di anticrittogamici per la protezione contro malattie fungine come peronospora, oidio e bottrite. I residui di antiparassitari possono essere rilevati nell'uva e nel vino, a seconda della quantità e delle modalità

¹ Università di Padova, Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali (TESAF), Legnaro (Padova)

² Università di Padova, Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE) Legnaro (Padova)

³ Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia (CREA) Conegliano (Treviso)

⁴ Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne Franche-Comte, Dijon, Francia

del loro utilizzo in campo, del numero di applicazioni e dell'intervallo tra l'applicazione e la raccolta. Sono sorti seri problemi legati all'uso dei pesticidi, sia per l'ambiente che per la salute umana. Tuttavia, l'uso di prodotti chimici rimane ad oggi la strategia di protezione più comune in viticoltura. Queste problematiche hanno stimolato la ricerca di prodotti alternativi per la

difesa delle colture, meno impattanti per l'ambiente e più sicuri per il consumatore, che consentano di sostituire o limitare l'uso del rame. Alcune di queste nuove strategie, anziché rivolgersi alla lotta diretta al patogeno, mirano all'attivazione di meccanismi di difesa da parte della pianta stessa.

Le piante possiedono infatti un sistema immunitario innato per difendersi

da diversi microrganismi, quali i funghi. Una delle principali strategie di difesa consiste nella sintesi di stilbeni, composti fenolici che vengono prodotti dal metabolismo secondario delle piante in risposta a vari stress biotici e abiotici. Gli stilbeni vengono sintetizzati mediante la via della fenilalanina, attraverso la quale avviene la produzione di resveratrolo e dei suoi derivati, come piceatannolo e viniferina. Il resveratrolo e il suo dimero, la viniferina, possiedono ben documentate attività antimicrobiche, sono efficaci ad esempio contro l'oidio, la peronospora e la botrite. Anche il piceatannolo, un analogo del resveratrolo, è prodotto dalla pianta in seguito ad attacchi fungini.

Nel corso della stagione vegetativa gli stilbeni si accumulano nell'intera pianta e specialmente nei tessuti legnosi, come i tralci, le radici, i semi, e in organi semi-legnosi come i raspi, dove vengono sintetizzati costitutivamente (e quindi non indotti da stress), probabilmente come meccanismo di resistenza del legno alla decomposizione.

Una grande quantità di queste molecole di difesa viene persa con la potatura invernale del vigneto, dopo la quale i tralci dell'anno vengono solitamente compostati o bruciati. I residui di potatura, considerati sottoprodotto dell'azienda viticola, possono però essere recuperati ed essere utilizzati per la produzione di un estratto ricco di sostanze bioattive, come gli stilbeni.

L'obiettivo del presente lavoro è stata la ricerca di una procedura per il recupero del maggior contenuto possibile di stilbeni dagli scarti di tralci di vite. Successivamente, è stato valutato se l'applicazione esogena dell'estratto di stilbeni (SE) ottenuto fosse in grado di indurre la protezione delle foglie di vite contro *Botrytis cinerea*. Infine, la modalità di azione del SE è stata successivamente studiata su sospensioni di cellule di vite e su piante, al fine di verificare se la protezione acquisita fosse dovuta solo all'attività antimicotica diretta o anche all'induzione delle difese della vite.

Materiali e metodi

I tralci di vite sono stati raccolti da piante di Pinot nero coltivate nei vi-

Fig. 1 - Contenuto di (A) resveratrolo, (B) piceatannolo e (C) viniferina in tralci di Pinot nero prelevati ad ottobre, novembre e dicembre e sottoposti a diversi processi (congelamento, liofilizzazione ed essiccazione) prima dell'estrazione degli stilbeni

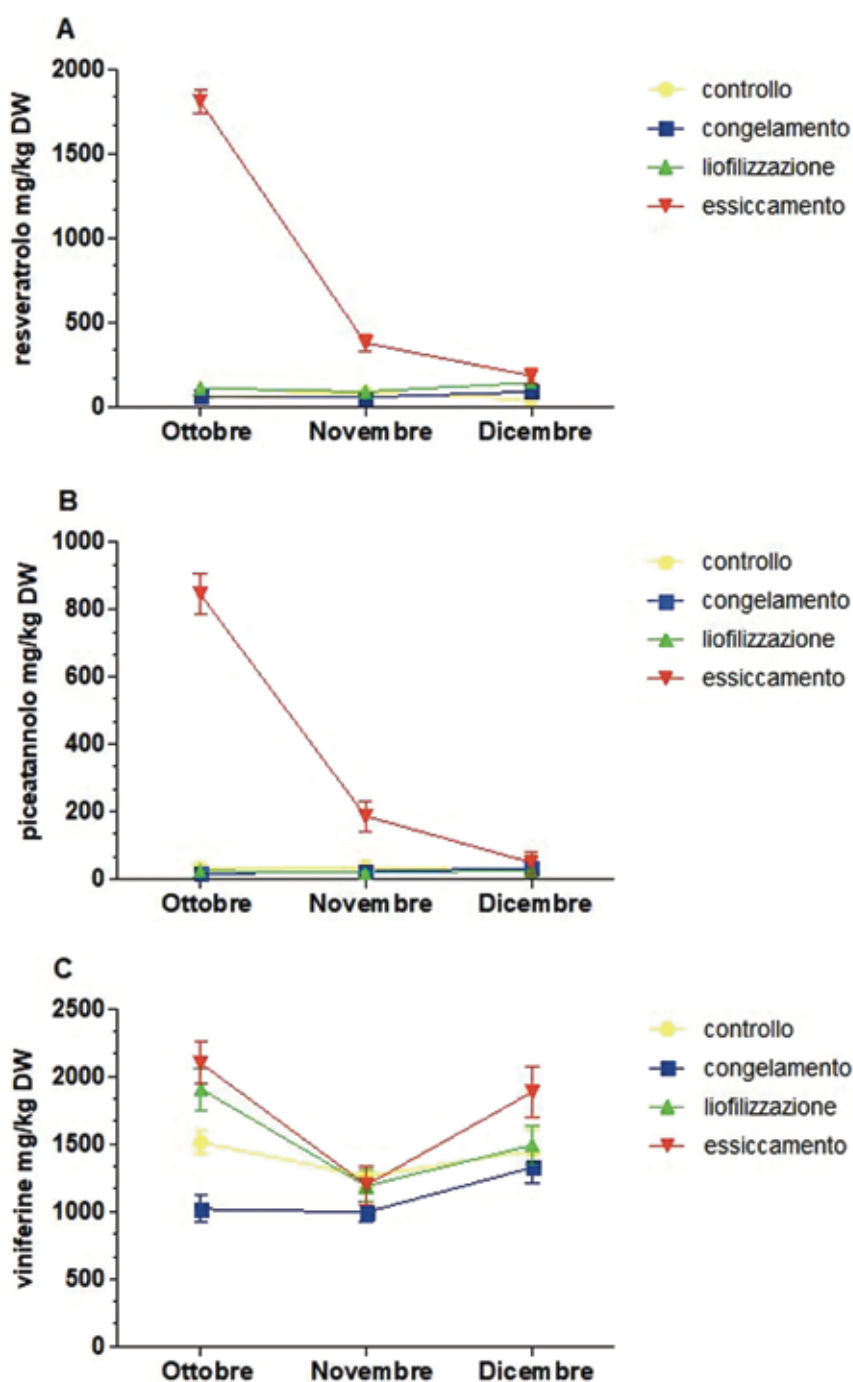
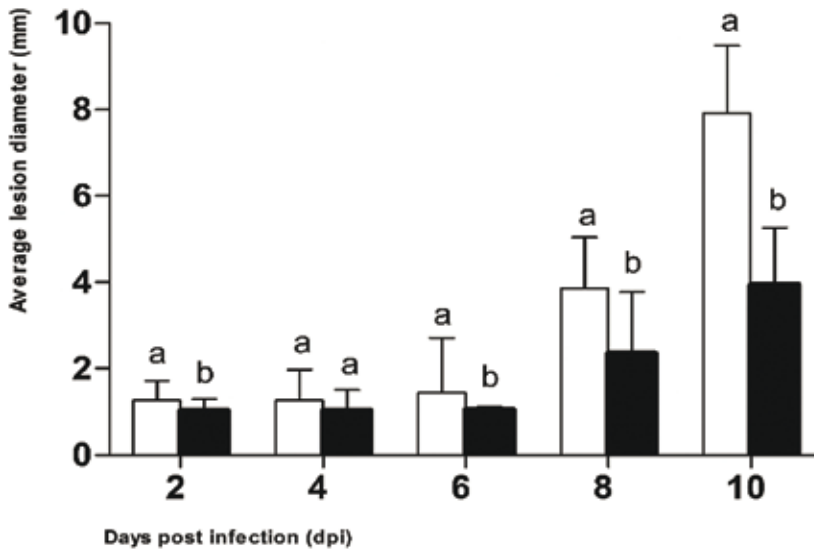


Fig. 2 - Protezione contro *Botrytis cinerea* indotta dall'applicazione preventiva di SE in piante di vite. Diametro medio della lesione causata dall'infezione di *B. cinerea* misurato su piante non trattate (barre bianche) e su piante trattate con SE 24 h prima dell'inoculazione di *B. cinerea* (barre nere) a diversi giorni dopo l'infezione (dpi). I risultati indicati con lettere diverse sono significativamente diversi al 5% utilizzando il test di Tukey



gneti della Scuola Enologica "G.B. Cerletti" di Conegliano, in provincia di Treviso. Per l'estrazione degli stilbeni, i tralci, tagliati in sezioni di 10 cm, sono stati macinati ed è successivamente stata effettuata un'estrazione in tre passaggi utilizzando etanolo all'80%. La quantificazione dei singoli stilbeni, contenuti nell'estratto, è stata effettuata mediante metodica HPLC.

Per le prove biologiche in piastra, *B. cinerea* è stata coltivata in terreno MEA (Estratto di Malto agar). Per verificare l'attività antifungina sono state preparate delle piastre Petri, nelle quali l'estratto, a varie concentrazioni (10, 25, 50, 75, 100 e 150 μ M), è stato aggiunto al terreno di coltura. L'inoculo fungino è stato effettuato depositando dei tondelli di micelio vitale al centro delle piastre. Il diametro del micelio è stato misurato giornalmente fino al completo riempimento della piastra. I dati raccolti sono stati analizzati statisticamente mediante test della varianza ed è stata calcolata la concentrazione in grado di dimezzare la crescita del micelio rispetto al controllo (IC50).

La protezione indotta dall'estratto di tralci in piante di vite è stata valutata mediante applicazioni fogliari su piante di Merlot allevate in vaso. Nel dettaglio, 20 foglie per pianta sono state inoculate con gocce di 10 μ l di sospensione conidica dopo 24 ore dal tratta-

mento con l'estratto. Le piante sono state successivamente coperte con un sacchetto di plastica trasparente, per il mantenimento di un'elevata umidità, e incubate a 24 °C con un fotoperiodo di 12 ore. Lo sviluppo della malattia è stato monitorato da 1 a 10 giorni dopo l'infezione (dpi) misurando il diametro medio delle lesioni formate.

La modalità d'azione di SE è stata valutata in sospensioni cellulari, misurando la produzione di H₂O₂ (Gauthier *et al.*, 2014), la presenza di MAPKs fosforilate mediante analisi *western blot* e la formazione di stilbeni tramite estrazione in metanolo e analisi RP-HPLC (Krzyzaniak *et al.*, 2018).

L'induzione di alcuni geni di difesa è stata esplorata in foglie raccolte da piante di vite. Il disegno sperimentale includeva quattro condizioni: foglie trattate e infette (SE + Bc), foglie trattate e non infette (SE), foglie non trattate e infette (Bc) e foglie non trattate e non infette (controllo). Le foglie sono state raccolte prima del trattamento e un giorno dopo il trattamento che corrisponde al giorno di inoculo. Inoltre, dopo l'inoculo di *B. cinerea* sono stati effettuati tre campionamenti (2, 5 e 8 dpi). Da ciascuna condizione sperimentale sono state raccolte tre repliche biologiche indipendenti ad ogni tempo di campionamento. Dai campioni fogliari è stato estratto l'RNA totale

e mediante *real-time* PCR quantitativa è stata valutata l'espressione di alcuni geni coinvolti in meccanismi di difesa della pianta (Bertazzon *et al.*, 2012).

I risultati emersi

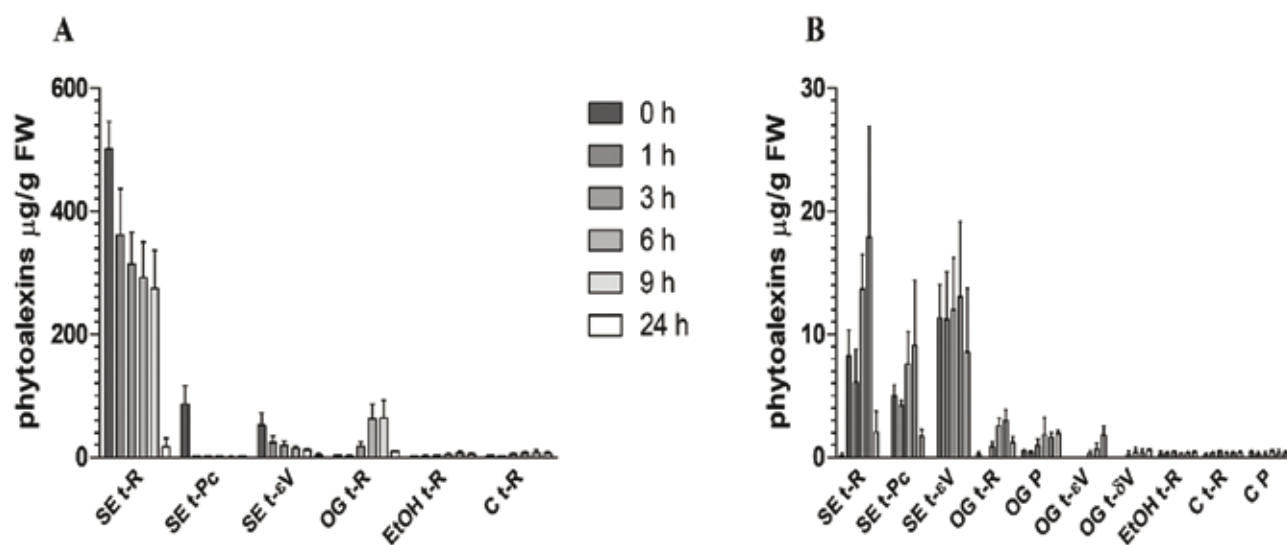
Messa a punto di un protocollo per l'ottenimento di un estratto di tralci ad alto contenuto di stilbeni

Nel presente lavoro è stata valutata l'influenza di vari fattori sul contenuto di stilbeni nell'estratto di tralci, al fine di individuare un protocollo per l'ottenimento di un estratto ad alto contenuto di stilbeni, potenzialmente utile per la difesa delle colture.

La potatura invernale della vite nel Nord Italia avviene normalmente a partire dalla caduta delle foglie e si può protrarre fino alla fine del periodo invernale. Il momento in cui la potatura viene effettuata potrebbe incidere sul contenuto di stilbeni accumulato dai tralci. Per capirlo, è stata effettuata una raccolta di tralci da un vigneto di Pinot nero in tre momenti diversi: ottobre, novembre e dicembre. L'analisi non ha mostrato grosse differenze nel contenuto di stilbeni tra gli estratti ottenuti da tralci potati in momenti diversi, dimostrando che, in assenza di stress, quando le viti sono in riposo vegetativo, il metabolismo degli stilbeni è inattivo.

È stato dimostrato che il contenuto di stilbeni nei tralci continua ad aumentare anche dopo la potatura grazie all'azione di geni ed enzimi legati alla biosintesi del resveratrolo e dei suoi derivati, che sembrano essere attivati dallo stesso taglio di potatura. Per questo, in una seconda prova i tralci prelevati nei mesi di ottobre, novembre e dicembre sono stati sottoposti a differenti processi prima dell'estrazione etanolica degli stilbeni (congelamento, liofilizzazione ed essiccazione), e il contenuto di resveratrolo, piceatannolo e viniferine negli estratti è stato poi confrontato con quello ottenuto con l'estrazione immediata (controllo). Il congelamento a -20°C e la liofilizzazione, o crioessiccazione, dei tralci dopo la potatura non hanno provocato significative modifiche della concentrazione di stilbeni negli estratti. Al contrario, il

Fig. 3 - Accumulo di stilbeni in colture cellulari di vite trattate con estratto di stilbeni (SE), oligogalatturonidi (OG), controllo con etanolo (EtOH), e controllo in acqua (C). (A) Accumulo extra-cellulare; (B) Accumulo intra-cellulare. Livelli di trans-resveratrolo (t-R), trans-piceatannolo (t-Pc), ϵ -viniferina (t-eV), ϵ -viniferina (te-V) and piceide (P).



processo di essiccazione a 40 °C, protratto fino al raggiungimento del peso costante del materiale biologico (circa 48 ore), ha consentito un aumento significativo del livello di stilbeni nei campioni raccolti nei diversi periodi di potatura. L'aumento maggiore è stato osservato nei tralci raccolti in ottobre, dove il piceatannolo e il resveratrolo aumentavano rispettivamente di circa 44 e 35 volte rispetto al controllo. L'incremento di queste molecole è stato inferiore nei tralci raccolti a novembre e soprattutto, in quelli prelevati a dicembre. Il contenuto di viniferine, già elevato nei tralci freschi, è aumentato solo lievemente con l'essiccazione dei tralci a 40 °C, in particolare nella raccolta di ottobre.

Anche lo stoccaggio prolungato a temperatura ambiente dei tralci dopo il taglio permette un aumento del contenuto di stilbeni. Per verificare questa ipotesi i tralci di Pinot nero, prelevati ad ottobre, novembre e dicembre, sono stati tagliati in sezioni di 10 cm e stoccati a temperatura ambiente per tre, sei, nove e dodici settimane prima dell'ottenimento degli estratti, simulando la normale situazione del vigneto, dove, dopo la potatura, i tralci vengono lasciati sul suolo per un certo periodo di tempo. In effetti, lo stoccaggio dei tralci ha consentito un marcato incremento di resveratrolo e piceatannolo negli estratti, con il rag-

giungimento della quantità massima dopo nove settimane di stoccaggio per i tralci prelevati in ottobre e dopo sei settimane per quelli raccolti a novembre e dicembre (Fig. 1). In questo caso, contrariamente a quanto osservato nel trattamento a 40 °C, la sintesi di stilbeni è più rapida nelle potature effettuate più avanti nel tempo.

I trattamenti con SE proteggono le foglie di vite contro Botrytis cinerea

L'effetto antifungino di SE è stato studiato mediante l'applicazione antecedente (effetto preventivo) o successiva (effetto curativo) all'inoculo di *B. cinerea*. Per la valutazione dell'effetto preventivo, la diffusione delle lesioni necrotiche è stata monitorata su piante trattate con SE 24 h prima dell'inoculo di *B. cinerea*. Una prima prova è stata eseguita su foglie ad una dose elevata di SE (300 µg/mL di resveratrolo), e dopo il trattamento non sono mai stati osservati sintomi di fitotossicità. L'applicazione fogliare di SE ha attivato un buon livello di protezione contro *B. cinerea* (Fig. 2). Si è infatti osservata una significativa riduzione dei diametri delle lesioni già a 2 dpi nelle piante trattate rispetto a quelle non trattate, raggiungendo il massimo livello di protezione a 10 dpi, con una riduzione del 48% del diametro della lesione, rispetto alle piante non trattate. La capacità di SE di ridurre lo

sviluppo del patogeno una volta che ha già infettato l'ospite è stata successivamente studiata trattando le piante dopo un giorno dall'inoculo con *B. cinerea*. Il trattamento SE in questo caso si è rivelato inefficace: infatti non c'è stata una significativa riduzione del diametro della lesione rispetto al non trattato.

SE ha mostrato un effetto antifungino diretto contro Botrytis cinerea

L'attività antifungina diretta di SE contro *B. cinerea* è stata controllata monitorando la crescita del micelio su un terreno nutriente a base di agar. Una IC50 (considerata come la concentrazione in grado di dimezzare la crescita del micelio rispetto al controllo) di 150 µM, corrispondente a circa 35 µg / mL di resveratrolo, 6,87 µg / mL di piceatannolo e 7,95 µg / mL di ϵ -viniferina, è stata determinata a 4 dpi.

SE ha indotto MAPK ma non la produzione di H2O2 in sospensioni cellulari di vite

Per determinare se il trattamento con SE, oltre ad avere un effetto diretto sul fungo, fosse anche in grado di innescare le risposte di difesa della vite, sono stati studiati gli effetti sugli eventi iniziali, che normalmente caratterizzano la reazione di difesa delle piante, utilizzando sospensioni cellulari.

Uno dei primi eventi di risposta gene-

ralmente attivati dall'applicazione di un elicitore è la produzione di H₂O₂, che contribuisce a varie risposte di difesa, incluso il rinforzo della parete cellulare, la risposta ipersensibile, l'attivazione di geni di difesa e di composti difensivi. Tuttavia, l'applicazione di SE non ha indotto la produzione di H₂O₂. Anche le cascate di fosforilazione della proteina chinasi attivata dal mitogeno (MAPK) sono anche note come eventi di segnalazione precoce di stress biotico. La loro rapida attivazione in risposta agli elicitori è stata segnalata in varie piante. In questo studio, la fosforilazione di MAPK è stata studiata tramite *western blotting*, con anticorpi policlonali che legano in modo specifico la forma fosforilata di MAPK. Bande corrispondenti a due MAPK fosforilate (49 e 45 kDa) sono state rilevate nelle cellule trattate con SE, mentre nessuna banda è stata rilevata nel controllo. Mentre la MAPK da 49 kDa è stata attivata da 5 a 45 min, con un picco a 15 min dopo il trattamento (mpt), la MAPK da 45 kDa è stata rilevata solo a 15 mpt.

Produzione di fitoalessine in cellule di vite trattate con SE

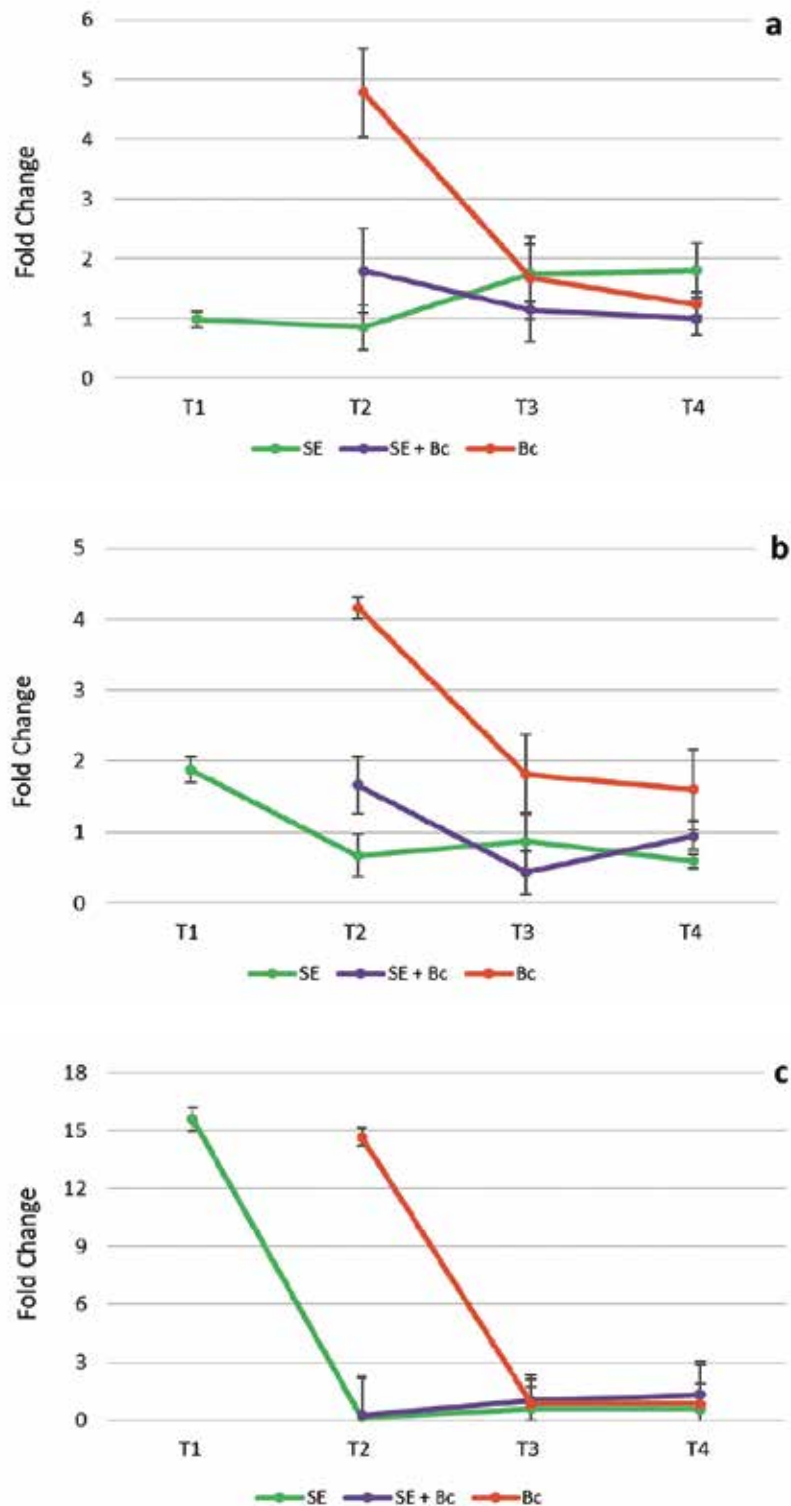
Le colture cellulari di vite rispondono agli elicitori sintetizzando e accumulando fitoalessine stilbeniche, principalmente resveratrolo e il suo dimero viniferina.

Inizialmente è stato valutato il rilascio di stilbeni nel terreno di coltura delle cellule dopo il trattamento con SE, confrontandolo con quello osservato dopo il trattamento con noti elicitori delle difese della vite come gli oligogalatturonidi (OG) (Fig. 3A). Come previsto, sono state rilevate concentrazioni molto elevate di resveratrolo immediatamente dopo l'aggiunta di SE (510 µg/g FW), seguito da una diminuzione progressiva fino a 24 h (16,69 µg/g FW). In confronto, l'accumulo di resveratrolo dopo il trattamento con OG è stato transitorio e ha raggiunto il picco a 6 e 9 ore dopo il trattamento (62,38 e 63,79 µg/g FW a 6 e 9 ore, rispettivamente). Per quanto riguarda gli altri stilbeni, il piceatannolo, che non è stato rilevato nelle cellule trattate con OG, è stato misurato nel mezzo di colture delle cellule trattate con SE immediatamente dopo il trattamento

(86,22 µg/g) per poi scomparire completamente dopo un'ora, mentre la concentrazione di ε-viniferina è diminuita progressivamente fino a 24 ore

(da 52,02 µg/g a 0 h a 3,29 µg/g dopo 24 h). Pertanto, il rilascio di stilbeni nel mezzo di coltura delle cellule, indicativo di un'induzione della biosintesi

Fig. 4 - Profili dei trascritti di PAL (A), STS1 (B) and GST1 (C) osservati dopo il trattamento (SE) e dopo l'infezione con *Botrytis cinerea* in piante trattate (SE + Bc) e non trattate (Bc) a quattro tempi (T1: 1 dpt, T2: 3 dpt e 2 dpi, T3: 6 dpt e 5 dpi, T4: 9 dpt e 8 dpi). L'espressione relativa (fold change) è stata ottenuta tramite i seguenti confronti: SE = "trattato" vs. "non trattato"; SE + Bc = "trattato e infetto" vs. "non trattato e non infetto"; Bc = "non trattato e infetto" vs. "non trattato e non infetto"



di stilbeni innescata da elicitori delle difese, non è stata registrata nelle cellule trattate con SE.

L'accumulo di stilbeni è stato monitorato anche all'interno delle cellule (Fig. 3B). Dopo un'ora dal trattamento con SE, resveratrolo, ϵ -viniferina e piceatannolo sono stati rilevati nelle cellule trattate, con livelli che aumentavano lentamente fino a raggiungere un massimo (17,88, 13,07 e 9,09 $\mu\text{g/g}$, rispettivamente) intorno alle 9 ore. Successivamente, le quantità di resveratrolo e piceatannolo sono diminuite drasticamente, mentre la ϵ -viniferina poteva ancora essere rilevata a un livello relativamente alto (8,60 $\mu\text{g/g}$) anche dopo 24 ore. Nelle cellule trattate con OG dopo 6 ore è avvenuto l'accumulo di una miscela di stilbeni, comprendenti piceide, ϵ -viniferina, ϵ -viniferina e resveratrolo, mentre non è stata rilevata alcuna traccia di piceatannolo. Il più alto accumulo di resveratrolo è stato osservato dopo 9 ore dal trattamento (3,0 $\mu\text{g/g}$), ma, a differenza delle cellule trattate con SE, i livelli di tutti gli stilbeni rilevati sono rimasti a livello stabile fino a 24 ore (1,94, 1,18, 1,80, 0,62 $\mu\text{g/g}$ per piceide, resveratrolo, ϵ -viniferina e ϵ -viniferina, rispettivamente).

Espressione genica correlata alla difesa nelle viti trattate con SE

La risposta della pianta a diversi stimoli biotici e abiotici, inclusi gli elicitori, coinvolge la modulazione dell'espressione di geni correlati alla difesa. Nel presente lavoro, il profilo di espressione di alcuni geni marcatori di difesa è stato seguito in piante trattate con SE e in piante non trattate, infette o meno da *B. cinerea*.

È stata monitorata l'espressione di due geni coinvolti nella biosintesi degli stilbeni (PAL e STS), di geni codificanti proteine di difesa (PR1, PR5, PR6, PR10, PR14) e di un gene implicato nella regolazione dello stato redox della pianta (GST1).

Tra i geni codificanti per proteine PR, dopo un giorno dal trattamento con SE è stato registrato un aumento della trascrizione della PR5 e della PR6 e una diminuzione dell'espressione della PR1. Sorprendentemente invece, l'espressione di PAL e STS, i principali geni della via dei fenilpropanoidi, che

porta alla produzione di stilbeni, non è stata indotta (Fig. 4 A,B). È interessante notare che il gene che codifica per la glutatione S-transferasi 1 (GST1) è stato transitoriamente altamente sovra-regolato a 1 dpt e sotto-regolato a 3 dpt (Fig. 4 C). L'espressione degli altri geni studiati non è risultata diversa rispetto al controllo.

Il livello di trascrizione di questi geni è stato studiato anche dopo l'infezione con *B. cinerea*. L'analisi è stata eseguita entro i primi otto giorni dopo l'infezione, quando lo sviluppo di *B. cinerea* era comparabile tra le foglie della tesi controllo e quelle trattate con SE. Nelle foglie non trattate, l'infezione di *B. cinerea* ha indotto l'espressione transitoria di molti geni: PAL e STS1 (2 dpi), PR1 (5 dpi), PR5, PR6 e PR10 (2 dpi), GST1 (2 dpi). Nelle foglie trattate con SE, alcuni geni PR hanno mostrato un'espressione inferiore e / o ritardata rispetto a quella delle foglie non trattate, mentre, è stato trovato altamente indotto solo il gene PR5 (5 dpi). L'induzione dell'espressione di PAL e STS1 in risposta all'infezione di *B. cinerea* in piante non trattate è stata confermata per tutti i momenti analizzati, mentre, curiosamente, non è stato osservato per le piante trattate con SE, suggerendo che SE contrasta l'induzione della produzione di stilbeni. Risultati simili sono stati ottenuti anche per GST1.

Discussione

Nel presente lavoro è stato dimostrato che un estratto di tralci, ricco di stilbeni, può essere facilmente ottenuto raccogliendo i tralci dopo la potatura, effettuata preferibilmente nel mese di dicembre, e conservandoli per 12 settimane a temperatura ambiente.

Le prove in piastra hanno dimostrato che l'estratto SE è stato in grado di ridurre la crescita di *B. cinerea* e la sua applicazione esogena su foglie di vite ha consentito l'ottenimento di un buon livello di protezione contro lo sviluppo della malattia.

Per determinare se il trattamento con SE, oltre ad avere un effetto diretto sul fungo, fosse anche in grado di innescare le risposte di difesa della vite, sono stati studiati alcuni degli eventi

iniziali che caratterizzano la risposta di difesa mediata della pianta, la produzione di fitoalessine e la modulazione nella trascrizione di alcuni geni di difesa.

È stato dimostrato che il trattamento con SE di sospensioni cellulari attiva la cascata di trasmissione del segnale mediata dalla fosforilazione delle MAPK, senza alcuna induzione di H_2O_2 . La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'attivazione delle MAPK sono due delle prime risposte di difesa nelle piante a stress biotici o abiotici. Tuttavia, non sono sistematicamente dipendenti. È stato infatti riportato che l'attivazione di MAPK indotta da funghi non dipende dal burst ossidativo, suggerendo che H_2O_2 stessa possa agire come uno stress, piuttosto che come un segnale per altri stress per attivare la cascata di MAPK (Romeis *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001).

Diversi esperimenti con colture cellulari di vite hanno dimostrato che le cellule sintetizzano e accumulano il resveratrolo nello spazio extracellulare, in risposta a diversi elicitori (Almagro *et al.*, 2015; Zamboni *et al.*, 2006). Al contrario, il piceide e la ϵ -viniferina si accumulano generalmente in maggiore concentrazione all'interno delle cellule (Martínez-Márquez *et al.*, 2017; Adrian *et al.*, 2012). Nel presente lavoro, dopo il trattamento con SE solo il resveratrolo, la ϵ -viniferina e il piceatannolo, i tre tipi di stilbeni contenuti nell'estratto SE, sono stati rilevati nel terreno di coltura, e sempre le stesse molecole sono state rilevate anche all'interno delle cellule a partire da un'ora dopo il trattamento. A differenza del trattamento con OG, non sono mai stati rilevati né piceide né ϵ -viniferina. Inoltre, il decorso nel tempo dell'accumulo di resveratrolo, ϵ -viniferina e piceatannolo all'interno delle cellule dopo il trattamento SE ha mostrato un accumulo iniziale che ha raggiunto il picco a 9 ore, seguito da una diminuzione generale fino a 24 ore, ad eccezione della ϵ -viniferina il cui livello è rimasto relativamente stabile. Complessivamente, questi dati sembrano escludere la possibilità che l'estratto di SE induca un'attivazione della biosintesi di stilbeni. Tuttavia, i tre stilbeni presenti nell'estratto

di tralci erano chiaramente rilevabili dopo il trattamento nella frazione cellulare, suggerendo un trasporto di queste molecole dal mezzo extracellulare all'interno delle cellule, anche se per ora non è possibile sapere se gli stilbeni rilevati fossero realmente all'interno delle cellule o semplicemente attaccati alle pareti cellulari. Infatti, è stato riportato che resveratrolo e i suoi derivati, grazie all'azione di perossidasi, possono essere legati alla parete cellulare, andando quindi a rafforzarla. La ϵ -viniferina rilevata all'interno delle cellule trattate con SE dopo 24 h potrebbe derivare dall'ossidazione di una porzione di resveratrolo. Quest'ultimo non possiede un'elevata attività antimicrobica, ma è il precursore di derivati più attivi, come appunto la viniferina. I nostri dati suggeriscono, quindi, che il trattamento con SE non abbia indotto alcuna nuova produzione di stilbeni, ma piuttosto, che gli stilbeni forniti esogenamente siano stati parzialmente trasportati all'interno delle cellule di vite, rimanendo in parte come composti antifungini attivi (viniferina), oppure venendo legati alle pareti cellulari, contribuendo così al loro rinforzo. Nelle foglie trattate con SE alcuni geni di difesa, come quelli codificanti le PR *protein*, sono stati leggermente indotti, mentre è stata fortemente aumentata l'espressione di GST1. Le proteine GST sono coinvolte nella detossificazione da molecole reattive, come i perossidi lipidici di membrana, mediante coniugazione al glutatione, e alcune di esse funzionano anche come glutatione perossidasi per disintossicare le specie reattive dell'ossigeno (Bartling *et al.*, 1993). È stato dimostrato che le GST hanno un ruolo nel trasporto e accumulo dei composti fenilpropanoidi nel vacuolo, necessario per prevenire i danni legati alla tossicità che potrebbero causare ad alta concentrazione (Tavares *et al.*, 2013). Nel presente lavoro, l'aumento del livello di espressione di GST1 era correlato all'attivazione dei geni PAL e STS1 (entrambi coinvolti nella sintesi di fitoalessine) nelle foglie infette da *B. cinerea*. Tuttavia, questa correlazione non si è verificata nelle foglie trattate con SE. Come accennato in precedenza, il trattamento con SE

sembra inibire la nuova produzione di stilbeni. Quindi, si può ipotizzare che l'espressione di GST1 venga innescata dagli stilbeni esogeni contenuti in SE. Recentemente, è stato riportato che alcune particolari isoforme GST, classificate come proteine associate alla resistenza multipla (MRP), sono coinvolte nel trasporto del resveratrolo dalle cellule della vite. Collettivamente, si potrebbe riassumere che il trattamento con SE viene percepito a livello cellulare, inducendo eventi di difesa, come l'attivazione di MAPK e una maggiore espressione di alcuni geni PR e GST1, ma va a regolare negativamente la nuova produzione di stilbeni.

Bibliografia

- Adrian, M.; Trouvelot, S.; Gamm, M.; Poinssot, B.; Héloir, M.-C.; Daire, X. Activation of Grapevine Defense Mechanisms: 2 Theoretical and Applied Approaches. In *Plant defence: biological control.*; Mérillon J. M.; Ramawat Kishan G. Eds.; Springer, Dordrecht, 2012, Vol. no 12., pp. 313-331.
- Almagro, L.; Belchí-Navarro, S.; Martínez-Márquez, A.; Bru, R.; Pedreño, M. A. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine. *Plant Physiol.* 2015, 97, 361-367.
- Bartling, D.; Radzio, R.; Steiner, U.; Weiler, E. W. A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular cloning and functional characterization.* *Eur. J. Biochem.* 1993, 216, 579-86.
- Bertazzon, N.; Raiola, A.; Castiglioni, C.; Gardiman, M.; Angelini, E.; Borgo, M.; Ferrari, S. Transient silencing of the grapevine gene *VvPGIP1* by agroinfiltration with a construct for RNA interference. *Plant Cell Rep.* 2012, 31, 133-143.
- Gauthier, A.; Trouvelot, S.; Kelloniemi, J.; Frettinger, P.; Wendehenne, D.; Daire, X.; Joubert, J.-M.; Ferrarini, A.; Delledonne, M.; Flors, V.; Poinssot, B. The sulfated laminarin triggers a stress transcriptome before priming the SA- and ROS-dependent defenses during grapevine's induced resistance against *Plasmopara viticola*. *PLoS One*, 2014, 9, No. e88145.

- Krzyzaniak, Y.; Negrel, J.; Lemaitre-Guillier, C.; Clément, G.; Mouille, G.; Klinguer, A.; Trouvelot, S.; Héloir, M.-C.; Adrian, M. Combined enzymatic and metabolic analysis of grapevine cell responses to elicitors. *Plant Physiol. Biochem.* 2018, 123, 141-148.
- Martínez-Márquez, A.; Martínez-Esteso, M. J.; Vilella-Antón, M. T.; Sellés-Marchart, S.; Morante-Carriel, J. A.; Hurtado, E.; Palazon, J.; Bru-Martínez, R. A. Tau Class Glutathione-S-Transferase is Involved in Trans-Resveratrol Transport Out of Grapevine Cells. *Front. Plant Sci.* 2017, 8, 1457.
- Romeis, T.; Piedras, P.; Zhang, S.; Klessig, D. F.; Hirt, H.; Jones, J. D. G. Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*, 1999, 11, 273-287.
- Tavares, S.; Vesentini, D.; Fernandes, J. C.; Ferreira, R. B.; Laureano, O.; Ricardo-Da Silva, J. M.; Amâncio, S. *Vitis vinifera* secondary metabolism as affected by sulfate depletion: diagnosis through phenylpropanoid pathway genes and metabolites. *Plant Physiol. Biochem.* 2013, 66, 118-126.
- Zamboni, A.; Vrhovsek, U.; Kassemeyer, H.-H.; Mattivi, F.; Velasco, R. Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *Vitis*, 2006, 45, 63-68.
- Zhang, S.; Klessig, D. F. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 2001, 6, 520-527.

Questo articolo è stato tratto dai seguenti lavori:

- Gicele Sbardelotto De Bona, Marielle Adrian, Jonathan Negrel, Annick Chiltz, Agnès Klinguer, Benoît Poinssot, Marie-Claire Héloir, Elisa Angelini, Simone Vincenzi, and Nadia Bertazzon. Dual Mode of Action of Grape Cane Extracts against *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2019 67 (19), 5512-5520.
DOI: 10.1021/acs.jafc.8b07098
- Gicele Sbardelotto De Bona, Nadia Bertazzon, Elisa Angelini, Simone Vincenzi. Influence of pruning time and viral infection on stilbenoid levels in Pinot noir grape canes. *Journal of Science and Food Agriculture* 2020 100(4), 1741-1747.
DOI: 10.1002/jsfa.10195