

DOCUMENTO
TECNICO

¹Giulia Malacarne
¹Urska Vrhovsek
¹Luca Zulini
¹Alessandro Cestaro
¹Marco Stefanini
¹Fulvio Mattivi
²Massimo Delledonne
¹Riccardo Velasco
¹Claudio Moser

¹Fondazione Edmund Mach,
 Centro di Ricerca ed Innovazione,
 San Michele all'Adige (TN)
²Dipartimento di Biotecnologie,
 Università di Verona



G. Malacarne

LA RESISTENZA A *P. VITICOLA* È ASSOCIATA ALL'ACCUMULO DI STILBENOIDI ED A RISPOSTE TRASCRIZIONALI NELLA VITE

Questo studio riporta i risultati del profilo metabolico e trascrizionale combinato di una popolazione di vite segregante per la resistenza a *P. viticola*. Sono stati individuati alcuni individui resistenti che sono stati caratterizzati a livello molecolare. Tali risultati saranno preziosi per i futuri programmi di miglioramento genetico in vite.

Stato dell'arte

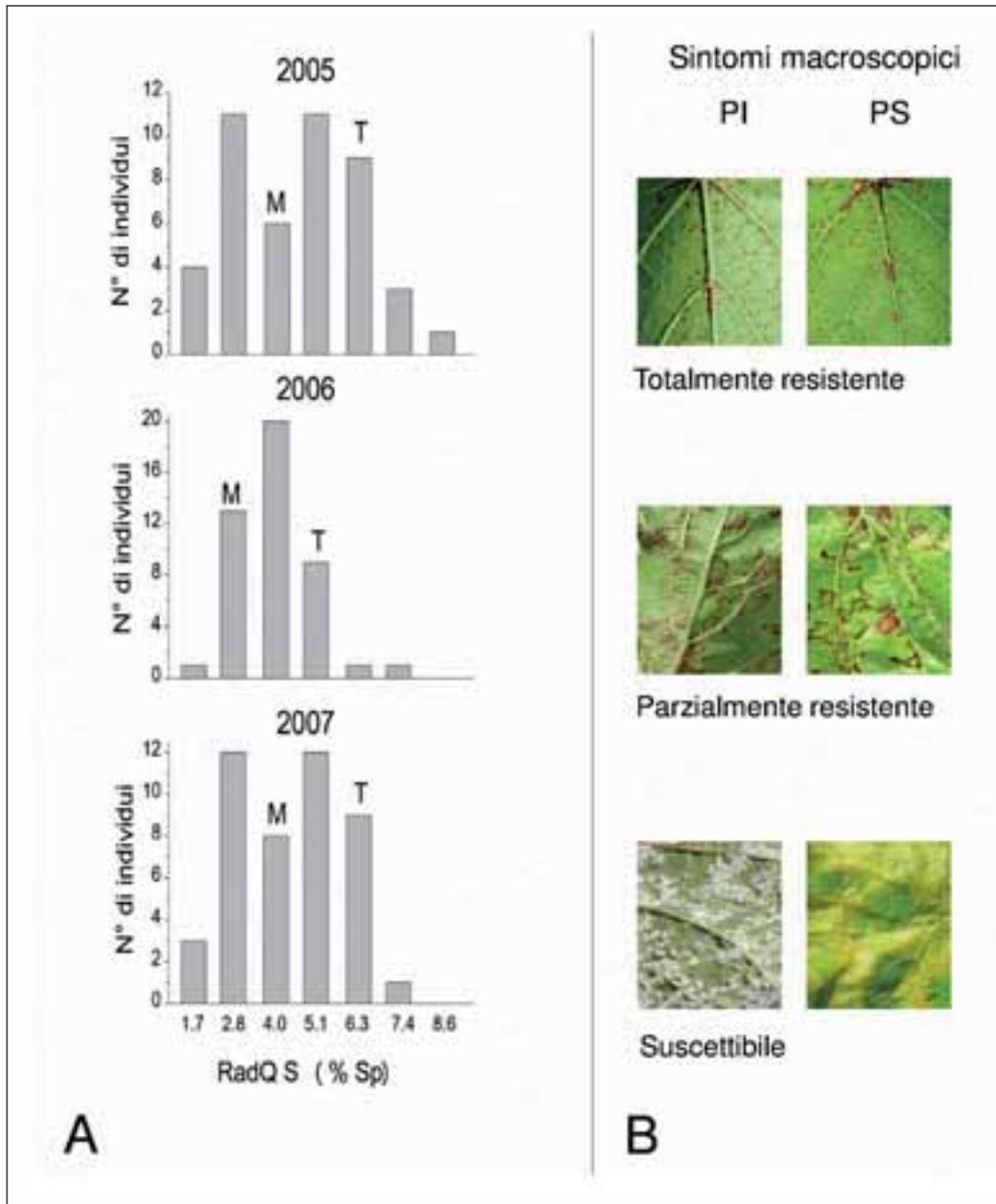
La vite europea coltivata, *Vitis vinifera L.*, produce uve di alta qualità, ma è soggetta a diverse malattie. Tuttavia, altre specie del genere *Vitis*, originarie dell'Asia orientale e del Nord e Centro America, sono state descritte come parzialmente o totalmente resistenti a diversi patogeni [1-4]. Tra questi, l'oomicete *Plas-*

smopara viticola (Berk. and Curt.) Berl. and de Toni rappresenta un grave problema per la vite in tutto il mondo. In cultivar suscettibili, questo patogeno biotrofo invade rapidamente le foglie infettate causando macchie d'olio giallastre sulla pagine fogliare superiore ed un'intensa sporulazione su quella inferiore [5]. Anche nei genotipi resistenti si assiste all'invasione da parte del patogeno, la cui proliferazione è rapidamente

bloccata dalla combinazione di meccanismi di resistenza di tipo costitutivo e post-infezionale [6, 7].

Infatti, le specie resistenti del genere *Vitis* possono beneficiare di un più alto livello di resistenza a *P. viticola* di tipo costitutivo [8-10] e manifestano dei meccanismi di resistenza post-infezionale che stimola l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno, composti fenolici ad azione antimicrobica, così come pro-

Fig. 1 - Caratterizzazione del tratto di resistenza nell'incrocio Merzling x Teroldego in tre annate



A) Distribuzione di 45 genotipi della progenie di Merzling x Teroldego sulla base della percentuale dell'area di sporulazione (% Sp) sul lato inferiore delle foglie, trasformata tramite radice quadrata (RADQ). Sono indicati anche i valori dei genitori Merzling (M) e Teroldego (T).

B) I sintomi macroscopici sulla pagina inferiore (PI) e superiore (PS) delle foglie a 10 giorni dall'infezione con *P. viticola*.

teine associate alla patogenesi e perossidasi [3, 11-13]. Tali eventi causano cambiamenti nella morfologia cellulare, tra cui l'ispessimento di parete, la necrosi and in alcuni casi una risposta ipersensibile (HR) localizzata [12, 14, 15].

Gli stilbenoidi rappresentano i principali composti ad azione antimicrobica in vite [16-19], la cui presenza può essere costitutiva negli organi lignificati [20-22] e nelle bac-

che [23], oppure può essere elicitata dall'infezione fungina [17], da stress abiotici o da elicitori [24-27].

Le complesse basi genetiche dei meccanismi di resistenza della vite a *P. viticola* sono state ampiamente investigate sia tramite l'analisi di tratti quantitativi (QTL) in popolazioni segreganti sia tramite studi di espressione a livello genomico confrontando specie resistenti e suscetti-

bili. Le analisi QTL hanno permesso di identificare alcune principali regioni di resistenza [28-32] che sono particolarmente ricche in geni di resistenza (RGAs). Le analisi del trascrittoma in interazioni compatibili ed incompatibili in vite [6, 33, 34] hanno sottolineato da un lato la complessità della risposta della pianta ed evidenziato dall'altro la modulazione di una significativa frazione dell'in-

tero trascrittoma in entrambi i casi, sebbene nel caso di un'interazione incompatibile si verifici prima e con maggiore intensità.

Nel presente lavoro abbiamo indagato la variabilità nella risposta di resistenza a *P. viticola* della popolazione d'incrocio Merzling (M) x Teroldego (T) analizzando il profilo di stilbenoidi dell'intera popolazione e le differenze nel trascrittoma dopo infezione con *P. viticola* tra individui resistenti e suscettibili. Questo studio è parte di una più ampia indagine dei meccanismi di resistenza a *P. viticola* nell'incrocio MxT, tra cui l'isolamento e la caratterizzazione strutturale di tutte le viniferine [35] e la validazione di un nuovo metodo di analisi per la loro quantificazione in foglie di vite infettate, tramite HPLC-DAD-MS [36].

Risultati del lavoro

Segregazione del fenotipo di resistenza a *P. viticola* nella progenie dell'incrocio MxT.

Nella popolazione MxT è stata riscontrata una variazione continua della sensibilità a *P. viticola*, misurata come percentuale dell'area sporulante (% Sp) sulla pagina fogliare inferiore, in tutti gli esperimenti di infezione eseguiti in tre diverse annate (Fig. 1A). Le due code della distribuzione erano popolate da individui caratterizzati da totale resistenza da un lato e da completa suscettibilità dall'altro. I primi erano caratterizzati da piccole aree necrotiche con HR ed assenza di sporulazione, mentre gli altri esibivano clorosi diffusa, macchie d'olio giallastre ed intensa sporulazione (Fig. 1B).

L'analisi comparativa delle distribuzioni nelle tre annate ha evidenziato una generale conservazione nell'intervallo di variazione del fenotipo osservato, e differenze nelle frequenze delle classi fenotipiche. Questo fenotipo sembra dipendere da fattori ambientali. In particolare, nel 2005 e nel 2007 i valori della

% Sp (RADQ S) della progenie, trasformati tramite radice quadrata, presentano una distribuzione bimodale, mentre nel 2006 le classi centrali risultano le più popolate facendo assumere alla distribuzione un andamento normale. La valutazione della sensibilità alla peronospora tramite l'indicatore OIV452 [37], che prende in considerazione tutti i sintomi della pianta e non solo l'area di sporulazione, ha permesso di attribuire gli individui a nove classi dalla totale resistenza alla totale suscettibilità (File addizionale1). I parentali, in tutte le annate, l'uno confermato essere parzialmente resistente (M) e l'altro suscettibile (T), hanno mostrato un certo grado di variabilità nella severità dei sintomi. È interessante notare che l'intervallo di sensibilità a *P. viticola* riscontrato nella popolazione segregante era più ampio di quello delimitato dai parentali, suggerendo una segregazione trasgressiva del tratto di resistenza.

Analisi del contenuto di stilbenoidi in foglie infettate con *P. viticola*.

Per misurare l'accumulo di stilbenoidi nelle foglie infettate dei 106 individui della popolazione, raggruppando la seconda e la terza foglia dall'apice per ogni campione, è stata utilizzata una versione ottimizzata [36] di un metodo precedente [38, 39]. In seguito all'analisi del contenuto totale di stilbenoidi a 6 giorni dall'infezione (dpi), gli individui della popolazione sono stati classificati in tre diversi gruppi (File addizionale 1). Gli alto produttori (18 individui) presentavano il più alto contenuto totale di stilbenoidi con in media 78,8 µg/g peso fresco (fw) ed un intervallo di variazione da 146,3 µg/g fw a 19,8 µg/g fw. Il secondo gruppo, costituito dai basso produttori, è risultato il più popolato (66 individui) con un contenuto medio di stilbenoidi totale di 2,7 µg/g fw (intervallo da 15,4 µg/g fw a 0,2 µg/g fw). I restanti 22 individui sono stati classificati come non-produttori di stil-

benoidi, essendo la loro concentrazione sotto il limite di quantificazione.

A 6 dpi, nel gruppo degli alto produttori abbiamo identificato 3 stilbeni monomeri e 13 viniferine stilbenoidi, tra cui dimeri, trimeri e tetrameri del resveratrolo. Alcuni di questi, come *trans*-resveratrolo, *trans*-piceide, *trans*-ptero-stilbene, (+)-*E*-ε-viniferina, α-viniferina, *E*-miyabenolo C e pallidolo erano già stati ritrovati in vite ed in alcuni casi associati alla risposta della pianta ad attacchi fungini [18, 39-41]. Inoltre, siamo stati in grado di identificare e quantificare altre viniferine non ancora identificate in vite e che potrebbero contribuire alla resistenza a *P. viticola* (ampelopsina D, quadrangularina A, *Z*- and *E*-ω-viniferina, *Z*- and *E*-miyabenolo C, isoopeafenolo, ampelopsina H ed isomero di simile a vaticanolo C). Questi composti sono stati isolati e caratterizzati strutturalmente da Mattivi *et al.* [35]. Le quantità relative dei singoli stilbenoidi variava notevolmente, tra cui isoopeafenolo era il più abbondante (tra 2,6 e 68,4 µg/g fw) e *Z*- and *E*-ω-viniferina la meno (sotto 1,25 µg/g fw). La loro distribuzione anche tra gli alti produttori di stilbenoidi è risultata molto variabile, suggerendo che le reazioni di ossidazione stereospecifiche hanno portato a differenti profili di viniferine in foglie infettate di differenti genotipi (File addizionale 2).

Dalla Fig. 2 è anche evidente che esiste una correlazione negativa tra il contenuto di differenti stilbenoidi e la percentuale di sporulazione osservata dopo infezione. Con rare eccezioni, gli alto produttori erano anche gli individui con i meno gravi sintomi di sporulazione. Questo non è vero nel caso degli stilbeni monomeri *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide, che sono stati ritrovati anche negli individui con alta sporulazione ed erano gli unici stilbeni presenti nei basso produttori (Fig. 2 e File addizionale 1).

Analisi dell'espressione

genica in genotipi resistenti e suscettibili.

Il profilo fenotipico e metabolico della popolazione d'incrocio ha evidenziato una correlazione positiva tra la resistenza a *P. viticola* delle progenie ed il contenuto di stilbenoidi delle loro foglie. Per approfondire ulteriormente la risposta di resistenza a *P. viticola* delle progenie, abbiamo considerato un genotipo trasgressivo (F1 21/66) con totale resistenza ed un alto contenuto di stilbenoidi. Il genotipo F1 21/66 ed il suo parentale resistente Marzling sono stati l'oggetto di un'analisi cDNA-AFLP a diversi tempi dall'infezione. Il profilo di espressione dei geni modulati da *P. viticola* è stato poi validato con un'analisi microarray mirata, che ha permesso di fare un confronto tra la risposta nell'espressione del genotipo F1 21/66 e quella dei due genotipi suscettibili (Teroldego e F1 22/73).

Analisi cDNA-AFLP.

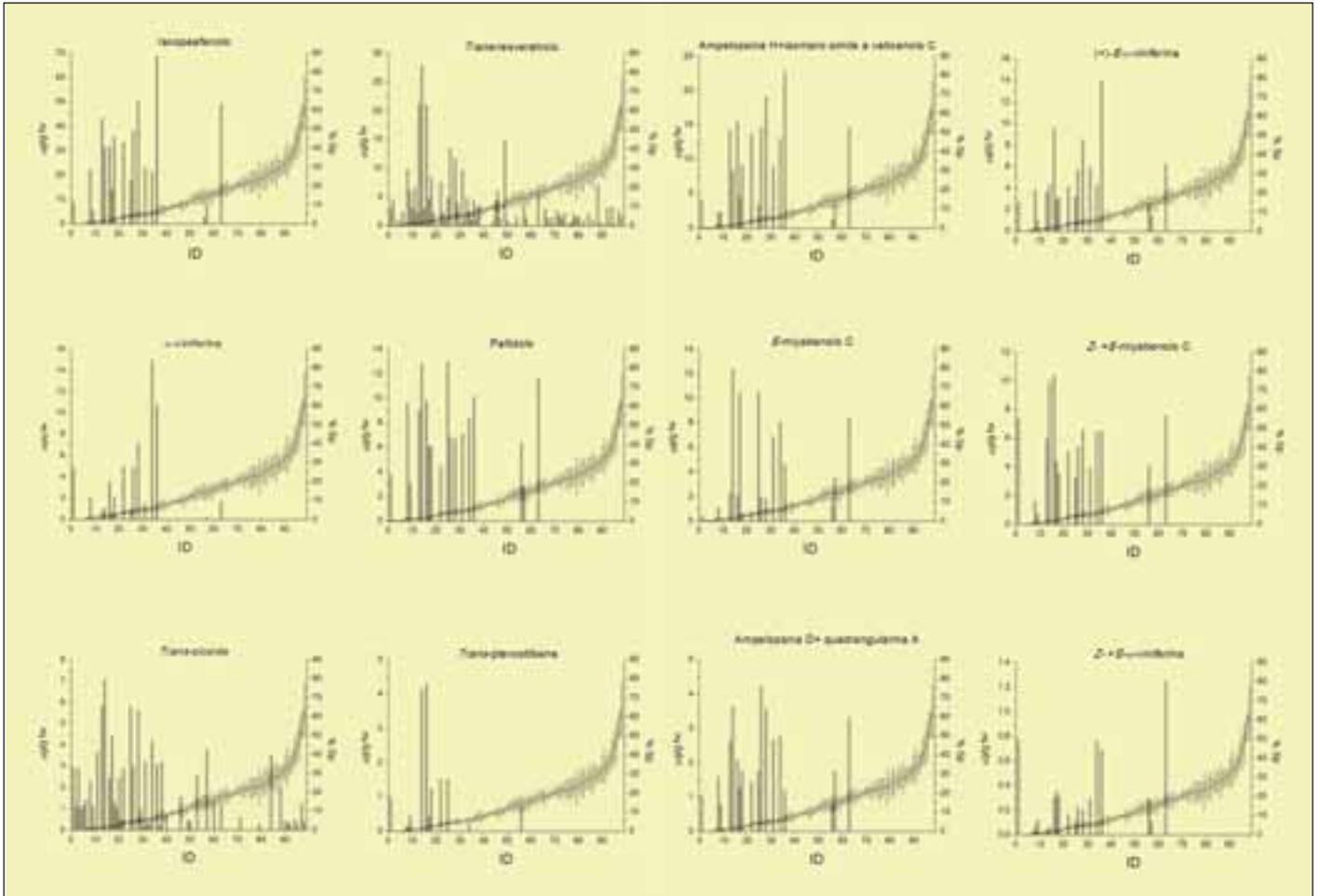
Per studiare i cambiamenti trascrizionali nell'ambito della risposta di difesa a *P. viticola* nel figlio F1 21/66, quasi totalmente resistente, e nel parentale Merzling, parzialmente resistente, è stata eseguita un'analisi cDNA-AFLP. L'espressione di circa 7.000 frammenti derivati da trascritti (TDFs) è stata monitorata utilizzando 128 diverse combinazioni di primer BstYI+1/MseI+2 (PCs) nell'amplificazione selettiva. Per ogni PC, sono stati visualizzati da 55 a 75 frammenti, di dimensione tra 50 e 1000 pb. Dal confronto dell'intensità delle bande nei campioni trattati (12, 24, 48, 96 ore dopo infezione-hpi) con quella nei controlli (0 ore dopo trattamento con acqua-hpmi), sono stati identificati 400 TDFs con profilo di espressione modulato dall'infezione. È interessante notare che 272 (68%) dei 400 TDFs erano modulati esclusivamente nel genotipo F1 21/66 e non nel parentale Merzling. Inoltre, la cinetica di modulazione dei 400 TDFs era diversa. Due principali profili di espressione erano evidenti in entrambi i genoti-

pi: un gruppo esteso di geni modulati precocemente che sembrano attivati nelle 12 hpi (63% in F1 21/66 e 69% in Merzling) ed un gruppo di geni attivati tardivamente modulati dalle 48 hpi (19% in F1 21/66 e 15% in Merzling). La frazione di TDFs indotti è risultata in linea generale più ampia di quelli repressi in entrambi i gruppi; questa tendenza è risultata ancora più evidente nel caso dei geni tardivi del figlio resistente (Fig. 3).

I frammenti differenzialmente espressi sono stati escissi dal gel e nuovamente amplificati per PCR utilizzando le appropriate PCs selettive (dati non mostrati). I prodotti PCR hanno permesso di ottenere 278 sequenze uniche di buona qualità (70%). Dei 278 TDFs, 265 erano modulati in F1 21/66 e 103 in Merzling. Le sequenze rimanenti non erano uniche e non potevano essere attribuite in maniera univoca, a causa probabilmente di uno o più frammenti co-migranti.

Delle 278 sequenze, 261 hanno trovato omologia in una banca dati e sono state annotate funzionalmente (File addizionale 3). Le rimanenti 17 sequenze non hanno trovato un'omologia significativa né in banca dati né con le sequenze note di *Phytophthora* spp. appartenenti alla sequenza del genoma di *Phytophthora* [42].

L'annotazione automatica dei 278 trascritti è stata eseguita sulla base della classificazione Gene Ontology (GO) [43] e successivamente è stata curata manualmente. Come mostrato in Fig. 4, i TDFs sono stati assegnati ad 8 categorie funzionali, facendo distinzione tra trascritti modulati precocemente e tardivamente e tra i due genotipi. Il metabolismo primario è risultata la categoria più popolata in entrambi i genotipi, seguita dalla trasduzione del segnale, trasporto, fotosintesi e risposta a stimolo. È interessante notare che i geni delle categorie quali risposta di difesa e metabolismo secondario erano maggiormente modulati nel genotipo

Fig. 2 - Profilo degli stilbenoidi dell'incrocio Merzling x Teroldego

resistente, principalmente nelle prime 24 hpi. Come atteso, il minor numero di TDFs da 48 hpi è coinciso con un minor numero di categorie funzionali. Infine un elevato numero di trascritti, modulati in entrambi i genotipi, era di funzione ignota.

Analisi microarray.

I trascritti identificati tramite analisi cDNA-AFLP sono stati utilizzati per costruire un oligo-microarray personalizzato per studiare la risposta del genotipo resistente F1 21/66 rispetto a quella del parentale teroldego e del figlio F1 22/73, entrambi suscettibili al fungo. Oltre ai 278 TDFs, sono state incluse delle sonde corrispondenti ad ulteriori 72 geni noti essere coinvolti nell'interazione pianta-patogeno. I vetrini sono stati ibridati con l'RNA totale estratto dalle foglie dei tre genotipi raccolte a 0 hpmi (campione controllo), 12 e 96

hpi (campioni trattati) (**File addizionale 4**). Questi tempi di raccolta sono stati scelti in quanto corrispondevano alle fasi di modulazione trascrizionale precoce e tardiva osservati negli esperimenti di cDNA-AFLP. L'analisi comparativa dei campioni trattati rispetto al campione controllo per ogni genotipo ha evidenziato 93, 45 e 36 geni rispettivamente modulati in F1 21/66, Teroldego e F1 22/73 (**File addizionale 5**). Dei 93 geni modulati in F1 21/66, 42 hanno mostrato lo stesso profilo dell'analisi cDNA-AFLP, sebbene i tempi di campionamento fossero solo parzialmente sovrapposti.

In particolare, 19 dei 93 geni modulati identificati nel genotipo resistente erano anche indotti nei soggetti sensibili. La maggior parte dei geni in questo sottogruppo appartengono a tre categorie: risposta allo stimolo, metabolismo primario e fotosintesi.

Un gruppo di 57 geni sono risultati esclusivamente modulati nel genotipo resistente. Di questi, 48 erano indotti a 96 hpi, 4 erano indotti a 12 hpi mentre i rimanenti 5 erano repressi ad uno dei punti temporali. Alcuni di questi trascritti sono stati assegnati alle categorie di risposta di difesa, fotosintesi e metabolismo primario, come il caso dei geni comunemente modulati, e gli altri sono stati assegnati alle principali categorie funzionali quali metabolismo secondario, trasduzione del segnale e trasporto. Abbiamo anche trovato un gruppo di geni specificamente modulati negli individui sensibili, di cui 13 sono risultati esclusivamente indotti in Teroldego e 11 nei figli (5 indotti e 6 repressi) sia a 12 che a 96 hpi. I dati di microarray per 9 trascritti differenzialmente espressi, la cui espressione relativa variava da 0,17 volte a 6,8 volte, sono

stati validati tramite analisi RT-qPCR (**File addizionale 6**). Sono stati scelti perché erano legati al processo di resistenza e anche a causa di una grande variazione nel rapporto dell'espressione relativa nei campioni trattati rispetto al controllo. Come mostrato nel **File addizionale 6**, è emerso un buon accordo con i dati di ibridazione e in alcuni casi l'entità della variazione determinata mediante RT-qPCR ha rivelato un'espressione differenziale maggiore, indicando che la tecnologia microarray ha sottostimato effettivi cambiamenti nell'espressione genica.

Discussione dei risultati

A differenza di *Vitis vinifera*, una specie indigena per l'Eurasia, le specie di vite selvatiche americane ed asiatiche sono generalmente resistenti a *Plasmopara viticola*, essendo co-evolute con questa muffa presente nello stesso habitat. Ci sono prove convincenti che esistono diversi meccanismi di resistenza a *P. viticola* [3, 12, 14, 15] e che essi si basano sul riconoscimento di elicitori generali o elicitori specifici codificati da geni *Avr*, come dimostrato in altri modelli [44, 45].

In questo studio abbiamo utilizzato una combinazione di analisi metaboliche e trascrizionali per indagare la resistenza a *P. viticola* in vite in una progenie generata dall'incrocio tra Merzling (un ibrido complesso di *V. vinifera* x *V. rupestris* x *V. lincedumii*) con Teroldego, una varietà di *V. vinifera*. Questa popolazione segrega chiaramente per la resistenza a *P. viticola*. Il grado di sensibilità individuale all'oomicete ha mostrato una distribuzione tipica dei tratti controllati da pochi principali QTLs con effetti dominanti, in accordo con la letteratura [28, 29, 31, 32].

Esiste una correlazione negativa tra la concentrazione di viniferine stilbenoidi e l'entità di sporulazione. Un meccanismo di difesa fre-

quentemente osservato nella vite è l'accumulo di fitoalessine appartenenti alla famiglia degli stilbeni [17-19, 39]. Abbiamo misurato la concentrazione degli stilbeni monomeri e di tutti gli stilbenoidi oligomeri nelle foglie dell'intera popolazione a sei giorni dall'infezione ed abbiamo riscontrato una grande variazione sia nel tipo sia nella quantità relativa (profilo) degli stilbenoidi. Livelli differenti di monomeri ed oligomeri del resveratrolo sono stati precedentemente riportati in uve sane [23, 46], ma anche in foglie infette dove sono stati associati alla suscettibilità a *P. viticola* genotipo dipendente [19, 47]. Le concentrazioni di stilbenoidi stimati nelle foglie inoculate variava da meno di 1 µg g⁻¹ fw a più di 100 µg g⁻¹ fw, suggerendo che almeno alcuni di essi erano presenti a concentrazioni tossiche per il patogeno (recensione in Smith [48]). I risultati di saggi di attività utilizzando gli stilbenoidi isolati ci permetteranno di trarre delle conclusioni definitive. Un'ulteriore indagine, che meriterebbe di essere eseguita, sarebbe una dettagliata analisi cinetica dell'accumulo di stilbenoidi e della diffusione del patogeno nelle foglie infette, al fine di corroborare le correlazioni emerse da questo studio. Abbiamo eseguito la nostra analisi a 6 dpi in quanto questo intervallo temporale era ideale per discriminare la produzione di fitoalessine stilbeniche nei diversi genotipi, come evidenziato in Vrhovsek et al. [36].

I nostri dati indirettamente hanno confermato che *trans*-resveratrolo e la sua forma glicosilata *trans*-piceide non sono di per sé molto tossici nei confronti di *P. viticola*, come già dimostrato da test diretti (recensione in Jeandet et al. [17]) e mediante analisi di genotipi di vite con diversi gradi di resistenza all'oomicete [18, 19]. Il tipo di sostituzione e lo stato di oligomerizzazione sembrano essere importanti nel definire il ruolo di uno stilbene come fitoalessina [18, 19, 47]. I due monomeri del resveratrolo

sono stati infatti ritrovati nella maggior parte dei genotipi suscettibili, mentre gli oligomeri del resveratrolo erano presenti quasi esclusivamente dalla prole resistente. Sono emerse tuttavia due tipi di eccezione: tre genotipi con livelli rilevabili di oligomeri mostrano tuttavia un grado intermedio di sporulazione (≥ 15%), e un gruppo di genotipi con livelli non rilevabili o molto bassi di oligomeri, ma resistenti a *P. viticola*.

Entrambi i gruppi di individui rappresentano materiale molto interessante per ulteriori analisi, in particolare il secondo gruppo la cui resistenza può essere attribuita ad un meccanismo diverso che non comporta la presenza di viniferine.

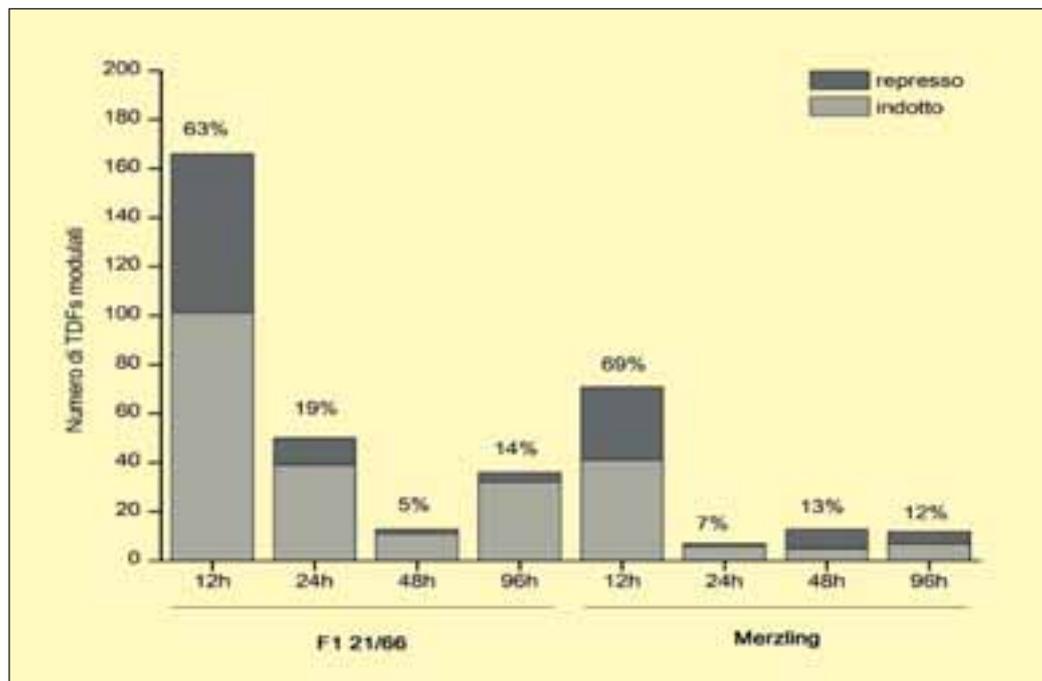
Analisi del trascrittoma di genotipi resistenti e suscettibili dopo infezione con *P. viticola*.

È interessante notare, per quanto riguarda sia la distribuzione del tratto di resistenza sia i profili degli stilbeni, che la popolazione è costituita da membri trasgressivi che esprimono il tratto in esame oltre l'intervallo di variazione delimitato dai genitori. Per questo motivo la nostra analisi trascrizionale ha preso in considerazione il genotipo F1 21/66. Diversi studi hanno dimostrato che *V. vinifera* subisce una forte modulazione trascrizionale dopo infezione con *P. viticola* per prevenire l'invasione da parte del patogeno [6, 33, 34], ma la risposta sembra essere più variabile nel caso di reazioni incompatibili. Modulazione geniche molto limitate sono state riportate nell'interazione tra *V. aestivalis* ed *Erysiphe necator* [10], mentre più di recente, lo studio delle interazioni incompatibili tra *V. riparia* e *P. viticola* ha rivelato invece un'evidente cambiamento trascrizionale [6].

Per studiare la risposta nell'espressione genica nel nostro patosistema abbiamo effettuato un'analisi comparativa degli individui resistenti e suscettibili utilizzando una combinazione delle tecniche cDNA-AFLP ed oligo-array.

Gli esperimenti microarray hanno evidenziato comportamenti molto differenti nei genotipi resistenti e suscettibili dopo infezione. È emerso un numero molto maggiore di trascritti modulati nel figlio F121/66 rispetto a Teroldego ed al figlio F122/73. Va tenuto in considerazione che, per come è stato progettato lo studio, non è possibile estendere questo risultato alla frazione di geni non rappresentati sul vetrino.

La metà dei geni modulati in F1 21/66 ha mostrato lo stesso profilo osservato nell'esperimento di cDNA-AFLP ed erano in genere indotti (**File addizionale 5**). Una differenza è stata tuttavia riscontrata nella tempistica di modulazione: nell'esperimento microarray l'induzione genica è stata rilevata principalmente dopo 12 hpi, mentre il 53% dei geni nello studio di cDNA-AFLP erano già indotti a 12 hpi. Questa differenza è attribuibile probabilmente al maggior numero di tempi di campionamento considerati nello studio di cDNA-AFLP ed al fatto che la tecnica microarray è meno sensibile della tecnica cDNA-AFLP basata sulla PCR. Una discrepanza tecnica simile è stata riscontrata in un recente studio riguardo all'analisi molecolare della resistenza alla striatura bruna dell'orzo [49]. Dei 93 geni modulati nella prole resistente solo 19 sono risultati indotti negli individui sensibili. Questa classe comprende geni codificanti per proteine coinvolte nella trascrizione e nell'attivazione della traduzione, tra cui un fattore di allungamento 1-alfa [DFCI: TC96066] ed una proteina contenente un pentapeptide ripetuto [DFCI: TC91629], e per una proteina correlata al cambiamento di fase [GenBank: JG391699, DFCI: TC93391] ed una proteina di trasferimento dei lipidi [DFCI: TC90421] attivate anche in altre interazioni pianta-patogeno [50, 51]. La loro induzione precoce, entro 12 hpi, suggerisce una riprogrammazione metabolica ed una risposta di difesa da parte della pianta in seguito al rico-

Fig. 3 - Trascritti modulati dall'infezione con *P. viticola* rivelati dall'analisi cDNA-AFLP

noscimento di elicitori generali in genotipi sia resistenti che suscettibili.

Geni modulati esclusivamente nel genotipo resistente.

Di particolare interesse sono risultati 57 geni modulati esclusivamente nel genotipo resistente. Date le categorie funzionali e, in alcuni casi, i geni specifici influenzati dall'oomicete, si presume che il meccanismo di resistenza osservata nel nostro studio sia molto simile a quello trovato in *V. riparia* dopo infezione *P. viticola* [6]. I geni che codificano per i componenti di trasduzione del segnale e di riconoscimento, come due proteine chinasiche simili a recettori [DFCI: TC80277, GenBank: JG391865] ed un recettore di tipo TIR-NBS [DFCI: TC98959], sono risultati leggermente attivati. Un proteina chinastica calcio-dipendente [DFCI: TC79194] è emersa anche specificamente indotta nel figlio resistente suggerendo che questo messaggero secondario può giocare un ruolo nella risposta di difesa. Un ruolo importante, tuttavia, sembra essere giocato dall'etilene come molecola di segnalazione. Numerosi trascritti coinvolti nella bio-

sintesi di etilene [DFCI: TC98757, DFCI: TC89222, DFCI: TC77376, DFCI: TC75061], così come fattori di risposta ad etilene a valle [DFCI: TC92107, DFCI: TC89392] sono risultati indotti. È interessante notare che abbiamo rilevato l'attivazione della trascrizione di geni che codificano per una proteina di *V. vinifera* simile ad osmotina [GenBank: Y10992] ed una β -1,3-gluco-nasi [GenBank: AJ277900], che appartengono rispettivamente alla classe 5 e alla classe 2 di proteine legate a patogenesi. Numerosi studi hanno dimostrato che l'etilene modula vite i geni di vite codificati per PR-5 e PR-2 [52] e hanno mostrato il ruolo che essi svolgono nei confronti di patogeni biotrofici e necrotrofici [53]. In linea con precedenti lavori riguardo a dischi fogliari di vite infettati con *P. viticola* [12], abbiamo anche osservato un accumulo dei trascritti per una PR1 [GenBank: AJ536326] e per una PR10 [GenBank: AJ291705] a 96 hpi.

Modulazione dei geni di biosintesi del resveratrolo e del metabolismo dei fenilpropanoidi.

L'accumulo di resveratrolo è strettamente controllato a livello trascrizionale dalla regolazione dello stato stazionario dei trascritti codificati per le stilbene sintasi [54], sia durante lo sviluppo [23] e dietro elicitazione [24-27]. Tuttavia, nessun regolatore trascrizionale è stato identificato finora. Come previsto, abbiamo trovato due isoforme di stilbene sintasi, [GenBank: S63225] [55] e [GenBank: X76892] [56], indotte nell'individuo resistente a 96 hpi. D'altra parte, non è stata osservata modulazione nei genotipi suscettibili. I tempi di induzione sono coerenti con i nostri risultati biochimici e con la letteratura [47]. In particolare, una evidente induzione dell'isoforma [GenBank: S63225] (12 volte quella rilevata in RT-qPCR), tra 12 e 96 hpi, è infatti compatibile con il profilo complesso di viniferine riscontrato nel figlio resistente a sei giorni dopo infezione.

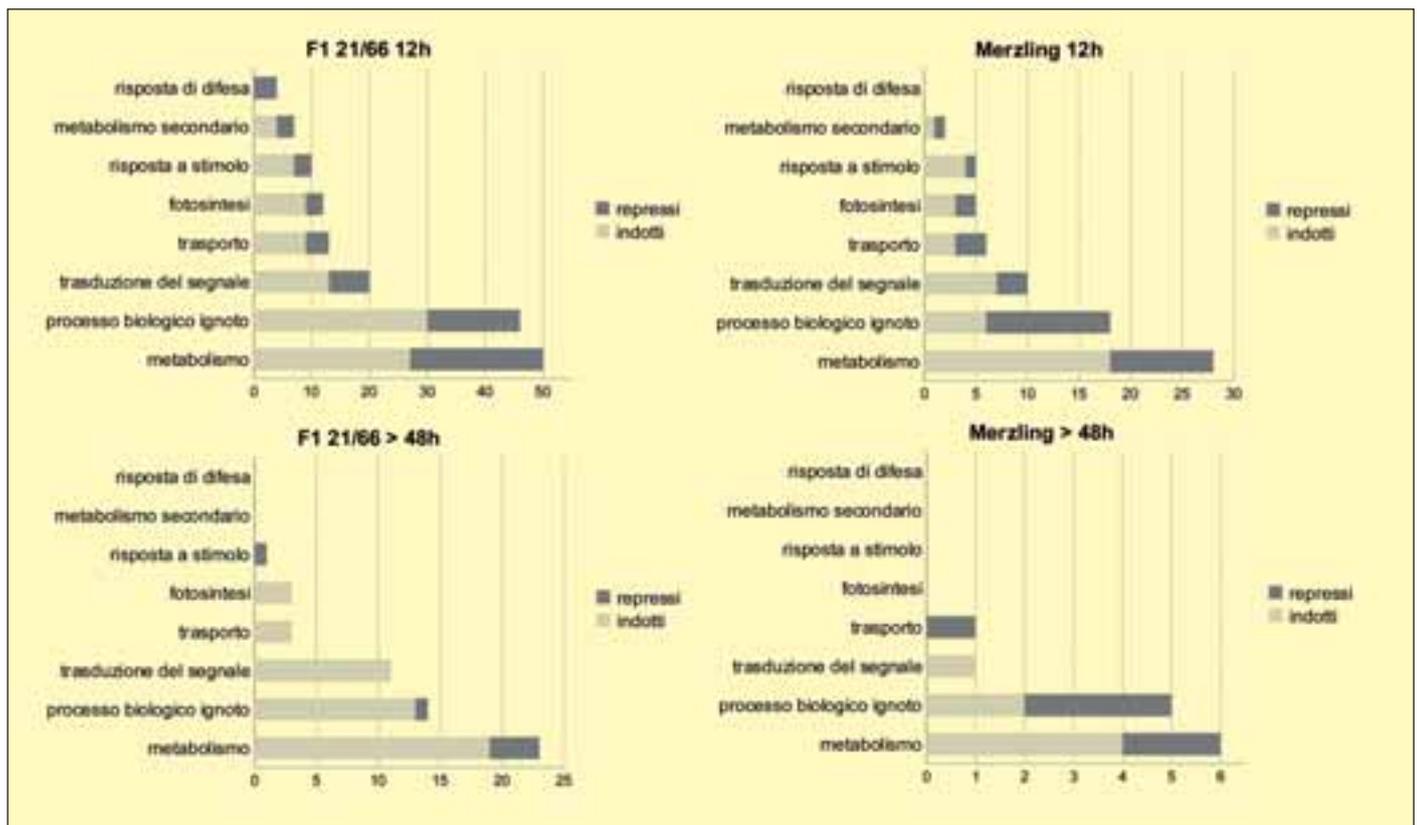
È interessante notare che l'analisi cDNA-AFLP ha rivelato l'induzione dell'espressione di due geni codificanti perossidasi [DFCI: TC81349, DFCI: TC56380] nel figlio resistente a 24 hpi. Le perossidasi sono in grado

di catalizzare l'ossidazione di *trans*-resveratrolo in presenza di H_2O_2 , dando luogo a un radicale del resveratrolo che oligomerizza a formare stilbenoidi oligomeri [57, 58]. Abbiamo trovato altri tre geni indotti appartenenti al metabolismo dei fenilpropanoidi, uno codificante una caffeoyl-CoA O-metiltransferasi [GenBank: Z54233], una flavonoide 3', 5'-idrossilasi [GenBank: CF404908] ed una diidroflavono-reduttasi [GenBank: X75964].

Sebbene non abbiamo verificato l'accumulo di monolignoli e proantocianidine nelle foglie infette, sono noti svolgere un ruolo nella risposta di difesa della pianta. I monolignoli sono essenziali per il rinforzo della parete cellulare [59] e le proantocianidine sono composti tossici per i patogeni [60, 61].

La risposta di difesa nelle interazioni biotroliche coinvolge anche una riprogrammazione del metabolismo primario [6]. Nel nostro studio, diversi geni associati alla degradazione di proteine sono risultati indotti da *P. viticola* nel genotipo resistente, come precedentemente riportato per altre interazioni pianta-patogeno [62]. È interessante notare che una ubiquitina ligasi con dominio E3-RING-H2 [DFCI: TC101906] e una proteina ubiquitina [DFCI: TC85973] sono state indotte al momento dell'infezione, come osservato in *V. riparia* [6]. Molti altri geni che codificano per gli enzimi catabolici di proteine (carbosi-peptidasi, aminopeptidasi) e di carboidrati (amilasi) sono stati indotti a 96 hpi. La maggior parte dei 26 geni modulati esclusivamente nei soggetti suscettibili è risultata indotta (74%), anche se non ha evidenziato un profilo di espressione coerente in entrambi i genotipi suscettibili.

Quest'analisi, quindi, non ci permette di trarre conclusioni sui meccanismi sottesi alla compatibilità vite-*P. viticola*, anche perché 16 di questi geni hanno mostrato lo stesso profilo cDNA-AFLP nel genotipo resistente. Tra i geni modulati, abbiamo tro-

Fig. 4 - Categorie funzionali di trascritti modulati in F1 21/66 e in Merzling dopo infezione con *P. viticola*

vato 15 geni la cui espressione modulata non ha seguito un criterio comune confrontando il genotipo resistente con i due suscettibili. Questo gruppo contiene geni che codificano per una aldolasi plasmidica [GenBank: JG391820] e per le proteine fotosintetiche come proteine leganti la clorofilla ab [DFCI: TC93431, GenBank: JG391764, DFCI: TC84281, DFCI: TC73356], un citocromo b [DFCI: TC78321] ed una ribuloso 1-5-bisfosfato carbossilasi / attivasi ossigenasica [GenBank: JG391868]. La maggior parte dei geni erano repressi in Teroldego già a 12 hpi ed altamente indotti nel figlio resistente, soprattutto in genotipi suscettibili nell'ambito di interazioni compatibili è stata già ampiamente riportata [10, 33, 63-65]. L'induzione dei geni fotosintetici in genotipi resistenti, come qui riportata, è stata descritta solo in pochi casi [66]. Questa potrebbe costituire una strategia alternativa adottata dalla cellula per ottenere energia per la risposta di

difesa, al contrario dell'induzione dell'attività invertasica, precedentemente descritta in casi di infezione da *P. viticola* [6].

Considerazioni conclusive

Questo lavoro riporta l'analisi biochimica e trascrittomico di individui resistenti e suscettibili selezionati da una popolazione d'incrocio di vite (Merzling x Teroldego), segregante per tratti quali la resistenza ed il contenuto di stilbenoidi.

È stata dimostrata una forte correlazione negativa tra le concentrazioni di viniferine stilbenoidi nelle foglie ed il procedere dell'infezione. Inoltre, il profilo globale del trascrittoma di individui resistenti e suscettibili dopo infezione ha portato all'identificazione di una serie di geni specificamente modulati nel genotipo resistente che dovrebbero essere presi in considerazione in programmi di allevamento futuri.

Materiali e metodi

Materiale vegetale, inoculo e metodi di infezione della pianta.

Una popolazione interspecifica derivata da Merzling (M) (ibrido complesso di *V. vinifera* discendente da *Vitis rupestris* e *Vitis lincedumii*) x *V. vinifera* cv Teroldego (T) è stata caratterizzata per la resistenza a *P. viticola* e per l'accumulo di composti stilbenoidi dopo infezione. Dei 255 individui della progenie, quelli selezionati sono stati replicati e mantenuti ogni anno come descritto in Vrhovsek et al. [36] in una serra con ciclo di temperatura 25 °C/20 °C giorno / notte, con un fotoperiodo di 16 h ed umidità relativa (RH) del 70 ± 10%. La preparazione dell'inoculo di *P. viticola* (Berk. e Curt) Berl. et De Toni e l'infezione fogliare sono stati eseguiti come in Vrhovsek et al. [36]. Le piante infette sono state poi trasferite in serra con un ciclo di temperatura 25 °C/20

°C giorno / notte, con un fotoperiodo di 16 h ed umidità relativa (RH) del 70 ± 10%. Piante di controllo sono state ottenute spruzzando acqua distillata in serra. Le piante sono state organizzate sulla base del disegno sperimentale specifico di ogni analisi (valutazione fenotipica, analisi stilbenoidi, analisi di espressione genica).

Valutazione fenotipica della resistenza a *P. viticola*.

Le linee parentali più 104, 87 e 86 dei 255 individui F1 sono stati valutati per la resistenza a *P. viticola* nelle annate 2005, 2006, 2007. Una reazione da parte della pianta è stata segnata come presenza o assenza di necrosi visibile a dieci giorni dall'infezione (dpi). La portata di sporulazione è stata stimata valutando visivamente l'area percentuale di sporulazione (%Sp) sulla superficie fogliare inferiore di tutte le foglie infette di tutti i replicati secondo le indicazioni in [67]. Un valore medio e un errore standard sono stati calcolati per ogni

individuo. L'entità della reazione della pianta ed il livello di sporulazione per individuo sono stati contemporaneamente valutati tramite un indice visivo, il descrittore OIV452, raccomandato dall'Ufficio Internazionale della Vite e del Vino [37]. Valori corrispondenti a categorie da 1 (la più suscettibile) a 9 (la più resistente) sono stati assegnati sulla base di assenza o presenza di necrosi visibile ed alle sue dimensioni, nonché del grado di area sporulante [37]. I numeri pari sono stati usati per descrivere le categorie intermedie. Inoltre l'assenza di sintomi a *P. viticola* è stata confermata in tutte le foglie delle piante di controllo. La distribuzione normale dei valori di sporulazione è stata valutata dal test di Kolmogorov-Smirnov applicato ai valori %Sp, trasformati con radice quadrata (RADQS) utilizzando il programma di analisi dati Statistica versione 6 (StatSoft, Tulsa, OK).

Analisi del contenuto di stilbenoidi.

La seconda e la terza foglia dall'apice di un replicato biologico per ogni genotipo sono stati raccolti a 6 dpi e a 0 hpmi durante la stagione 2005. Tutte le foglie raccolte sono state conservate a -20 °C fino all'analisi. La preparazione del campione e le condizioni per l'analisi HPLC-DAD-MS sono state le medesime descritte in Vrhovsek et al. [36]. I monomeri stilbenici e gli oligomeri stilbenoidi sono stati identificati confrontando il tempo di ritenzione, gli spettri MS ed UV con quelli di standard autentici, e quantificati mediante rivelazione UV-VIS a 280 nm e 310 nm con il metodo dello standard esterno. I dettagli relativi alla quantificazione dei singoli composti sono riportati in Vrhovsek et al. [36]. Tutte le concentrazioni sono espresse come mg/kg di peso fresco (fw).

Analisi cDNA-AFLP.

Le foglie per l'analisi (la seconda e la terza dall'apice) sono state raccolte da cinque replicati biologici, ciascuno di F1 21/66 e Merzling, a 12,

24, 48 e 96 hpi con *P. viticola* e a 0 hpmi (C) nell'estate del 2005, immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C. L'RNA totale è stato estratto da un campione costituito dalla seconda e terza foglia congelate, riunite, secondo Moser et al. [68], quantificato con Nanodrop 8000 (Thermo Scientific), e controllato per la qualità utilizzando lo strumento Agilent 2100 Bioana-lyzer (Agilent Technologies). La sintesi di cDNA a doppio filamento e la procedura di cDNA-AFLP sono state eseguite come precedentemente descritto in Polesani et al. [33], a partire da 2 µg di RNA totale ed utilizzando BstYI e MseI come enzimi di restrizione. Un totale di 128 amplificazioni selettive sono state eseguite con *primer* BstYI marcati con ³³P contenenti un ulteriore nucleotide selettivo per *primer*. I prodotti di amplificazione sono stati separati ed i gel sono stati analizzati come descritto in Polesani et al. [33]. I trascritti differenzialmente espressi tra campioni inoculati e di controllo sono stati identificati mediante ispezione visiva delle pellicole autoradiografiche, ed i loro profili sono stati ottenuti visivamente e sono stati assegnati al termine U a frammenti 'indotti in campioni infetti', D a quelle 'repressi in campioni infetti' ed S a quelli 'con lo stesso profilo dopo l'infezione o dopo il trattamento con acqua' (**File addizionale 3**). Per validare la riproducibilità dei dati di cDNA-AFLP, la reazione di amplificazione selettiva con 6 combinazioni di *primer* è stata replicata due volte partendo da due indipendenti prodotti di pre-amplificazione. Bande corrispondenti ai trascritti differenzialmente espressi sono stati asportate dal gel ed eluite in 100 ml di acqua sterile bidistillata. Un'aliquota di 5 ml è stata usata come stampo per la ri-amplificazione con *primers* non marcati identici a quelli utilizzati per l'amplificazione selettiva. I prodotti di PCR sono stati purificati mediante aggiunta di 1,5 ml di fosfatasi

esonucleasica (ExoSAPIT, Amersham) per ogni 5 ml di prodotto di PCR, che è stato incubato a 37 °C per 45 minuti, poi a 75 °C per 15 min e poi direttamente sequenziato.

Analisi ed annotazione delle sequenze.

Le sequenze sono state analizzate mediante ricerca di omologia con BLAST [69] contro le seguenti banche dati: banca dati EST all'NCBI [70], l'indice dei geni di vite DFCI (release 6.0) [71], una banca dati IASMA del genoma di vite (versione 3.0) [72], la banca dati RefSeq all'NCBI [73] ed UNIPROT [74]. I risultati del BLAST (Blast-n: E-value <10⁻¹⁰, blast-x: E-value <10⁻⁶) con i termini GO associati sono stati analizzati con lo strumento 'ARGOT' per l'annotazione sviluppato in casa [75] imponendo un alto livello di confidenza (Id > 80%). I risultati dell'annotazione automatica sono stati controllati manualmente ed integrati con i termini GO del 'processo biologico' supportati da evidenze in letteratura. Infine, le sequenze sono state assegnate a categorie funzionali. I dati di sequenza sono stati depositati presso la banca dati EST di NCBI [70] e sono accessibili attraverso i numeri di accessione GenBank: JG391664-JG391941.

Analisi microarray.

I geni considerati per la rappresentazione su microarray includevano quelli corrispondenti ai 278 frammenti di cDNA-AFLP che hanno mostrato differenze nell'intensità di banda in base al genotipo ed al trattamento e che hanno dato sequenze di buona qualità, in aggiunta ai 72 geni codificanti per proteine che sono riportate in letteratura come aventi un possibile o dimostrato ruolo nella difesa a patogeno. Per la maggior parte delle sequenze, due sonde, depositate in doppio, sono state disegnate in diverse regioni, mentre nel caso di sequenze non orientate, due sonde sono state disegnate in ogni direzione aggiungendo il suffisso 'RC' al nome della

sonda corrispondente al filamento Complementare. Un totale di 1530 sonde sono state sintetizzate su ciascun settore di un microarray di tipo 4x2240 CustomArray (CombiMatrix Corp., WA). Sulla matrice sono state incluse anche sonde da virus e batteri come controllo negativo (CombiMatrix Corp., WA) e quattro geni putativi di normalizzazione. Le sonde per l'ibridazione sono state generate da 18 preparazioni di RNA totale corrispondenti a due replicati biologici di foglie di F1 21/66, F1 22/73 e Teroldego inoculate con *P. viticola* e raccolte a 12 e 96 hpi, o spruzzate con acqua (C). L'RNA totale (1 µg) è stato amplificato utilizzando il kit di amplificazione 'Amino Allyl MessageAmpTMII aRNA' (Ambion, USA) ed il risultato aRNA amminoallilico è stato coniugato ad un marcatore fluorescente (Cy-5). L'aaRNA marcato purificato è stato quantificato con spettrofotometria (ATI Unicam) e 2 µg sono stati ibridati all'array CombiMatrix personalizzato secondo le istruzioni del produttore. Ogni ibridazione è stata ripetuta tre volte. Pre-ibridazione, ibridazione, lavaggio e rilevazione sono stati eseguiti secondo i protocolli del produttore [76]. I vetrini sono stati esaminati con un ScanArray4000XL (Perkin Elmer, USA) e le immagini TIF sono state esportate in MicroArray Imager 5.8 (CombiMatrix, USA) per l'analisi densometrica. I dati microarray sono stati analizzati secondo il procedimento descritto in [49] con alcune modifiche. Brevemente, un'ispezione visiva delle immagini è stata effettuata al fine di escludere spot danneggiati. Solo sonde con una intensità di segnale di almeno 500 unità di fluorescenza [77] per tutti i replicati biologici sono state considerate per ulteriori analisi. Una normalizzazione in scala è stata effettuata utilizzando *Actina* ed *Ufgt* (UDP-glucosio: flavonoide 3-O-glucosiltransferasi) come geni di riferimento. I valori mediani di intensità normalizzati sono

stati trasformati in Log2.

Set di dati di ogni individuo sono stati analizzati in modo indipendente dopo il calcolo del valore medio di espressione da valori normalizzati di replicati tecnici per ogni sonda (**File aggiuntivo 4**). Prima dell'analisi statistica, è stato calcolato un valore medio dei valori normalizzati di replicati tecnici di ibridazione (Log2-valore medio). Per ogni individuo, i valori normalizzati sono stati organizzati in tre gruppi corrispondenti ai punti temporali di raccolta a confronto. Tre set di dati con elevate quantità di geni differenzialmente espressi sono stati identificati mediante l'esecuzione di una analisi di significatività per Microarray (SAM) a confronto multiclasse [78] utilizzando 'TIGR Multiexperiment Viewer' [71] con impostato un tasso di 'False Discovery Rate' (FDR) <5%, come in [6]. Il risultato dell'analisi SAM è stata ulteriormente limitato a geni con un cambiamento nell'espressione di mRNA di 1,5 volte o più in almeno uno dei due punti di espressione analizzati. Per i geni in cui sono stati trovati due oligonucleotidi differenzialmente espressi, un valore medio è stato calcolato dai valori di intensità mediani ad ogni tempo (**File aggiuntivo 5**). I dati di espressione sono stati depositati nella banca dati 'Gene Expression Omnibus' di NCBI [79] e sono accessibili attraverso il numero di accessione della serie GEO: GSE28851.

Analisi Real-time RT-PCR.

L'RNA totale per la reazione RT-qPCR è stato lo stesso utilizzato per le ibridazioni con il vetrino. Per ciascun punto temporale, l'RNA è stato inizialmente trattato con 'RNase free-rDNaseI' (Ambion) e successivamente utilizzato per la sintesi del primo filamento di cDNA utilizzando il kit 'Superscript™ III Reverse Transcriptase' (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. L'amplificazione è stata effettuata usando una mix di reazione 'SYBR Green

PCR Master Mix', come descritto in [23], utilizzando primer gene-specifici disegnati all'interno della stessa regione genomica in cui sono stati localizzati gli oligonucleotidi per l'analisi microarray (vedi **file aggiuntivo 6** per le sequenze). Le condizioni di ciclo sono state: 50 °C per 2 min, 95 °C per 2 min, quindi 40 cicli di 95 °C per 15 sec e 60 °C per 1 min. Le analisi quantitative in triplicato sono state effettuate con un sistema di rilevazione si sequenza 'ABI PRISM 7000' (Applied Biosystems, Foster City, CA). I dati grezzi sono stati analizzati con il programma 'ABI-PRISM 7000 DS' per estrarre i valori Ct. I dati corretti nella linea di base sono stati importati nel software LinRegPCR per calcolare l'efficienza di reazione [80, 81].

L'espressione relativa di ciascun gene (target) è stata quindi calcolata secondo l'equazione di Pfaffl [82] utilizzando il gene *Actina* per la normalizzazione (riferimento) ed il controllo spruzzato con acqua come campione calibratore (controllo), che rappresenta l'espressione 1X del gene di interesse.

L'errore standard generale (SE) dell'espressione media normalizzata è stata ottenuta applicando il calcolo dell'errore sulla base della serie di Taylor come sviluppato per il programma REST © [83].

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è stata la valutazione della risposta di resistenza a *P. viticola* da parte della popolazione d'incrocio Merzling x Teroldego, attraverso l'analisi dopo infezione del contenuto di stilbenoidi nelle foglie dell'intera popolazione e del trascrittoma di individui resistenti e suscettibili.

L'analisi della risposta della popolazione all'infezione artificiale condotta per tre annate consecutive ha evidenziato come gli individui si distribuiscano in 9 classi dalla totale resistenza alla totale suscettibilità.

Inoltre, il profilo quantitativo degli stilbenoidi nella

popolazione per mezzo di HPLC-DAD-MS ha permesso l'identificazione di tre gruppi distinti sulla base di concentrazione e complessità di profilo. Gli individui alto-produttori erano caratterizzati dalla presenza di *trans-resveratrolo*, *trans-piceide*, *trans-pterostilbene* e fino a tredici diverse viniferine, nove delle quali mai identificate in vite.

L'accumulo di tali composti è consistente con un genotipo resistente e suggerisce che potrebbe contribuire alla risposta di resistenza. Uno studio preliminare tramite cDNA-AFLP ha identificato un set di geni modulati dall'oomicete in un genotipo resistente. Successivamente, tramite analisi microarray comparativa, l'espressione del set genico è stata valutata in genotipi della popolazione rispettivamente resistenti e suscettibili. È stato trovato un gruppo di 57 geni esclusivamente modulati nel genotipo resistente suggerendo un loro coinvolgimento nell'interazione incompatibile vite-*P. viticola*. L'annotazione funzionale di questi trascritti ha evidenziato la loro appartenenza alle categorie di risposta di difesa, fotosintesi, metabolismo primario e secondario, trasduzione del segnale e trasporto.

Abbreviazioni. *cDNA*: DNA complementare; *EST*: frammento di sequenza espresso; *GEO*: 'Gene Expression Omnibus'; *HPLC-DAD-MS*: Cromatografia liquida ad alta risoluzione con rivelatore a fotodiodi e spettrometria di massa; *NCBI*: Centro Nazionale per l'informazione biotecnologica; *RT-qPCR*: Reazione polimerasica a catena quantitativa con trascrizione inversa; *SAM*: analisi di significatività per Microarray; *TC*: sequenza consenso.

Ringraziamenti. Gli autori desiderano ringraziare Domenico Masuero per l'assistenza nelle analisi biochimica, il Dr. David Glissant per il sostegno negli esperimenti di ibridazione e nelle analisi dei dati microarray. Sono anche

molto grati al Dr. Alberto Ferrarini ed alla Dr. Annalisa Polverari per la lettura critica del manoscritto. Questo lavoro è stato sostenuto da progetto 'Resveratrolo' finanziato dal Fondo Unico della Provincia Autonoma di Trento.

Il materiale aggiuntivo (in inglese) è disponibile via Internet (<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/114/additional>)

Adattamento italiano del manoscritto dal titolo "Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses" degli autori Giulia Malacarne, Urska Vrhovsek, Luca Zulini, Alessandro Cestaro, Marco Stefanini, Fulvio Mattivi, Massimo Delledonne, Riccardo Velasco, Claudio Moser pubblicato dalla rivista BMC Plant Biology (Malacarne et al. 2011, 11:114. doi: 10.1186/1471-2229-11-114) disponibile al sito <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/114>. L'articolo è di tipo Open Access ed è distribuito secondo una licenza del tipo Creative Commons.

Bibliografia

1. Staudt G, Kassemeyer HH: Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis* 1995, 34:225-228.
2. Denzer H, Staudt G, Schlosser E: The behavior of *Plasmopara viticola* on resistant and susceptible grapevine varieties. *Vitis* 1995, 34: 113-117.
3. Kortekamp A, Zyprian E: Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *J Plant Physiol* 2003, 160:1393-1400.
4. Cadle-Davidson L: Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Dis* 2008, 92:1577-1584.
5. APS: *Compendium of grape diseases*. St. Paul, Minn., USA: APS Press; 1988.
6. Polesani M, Bortesi L, Ferrarini A, Zamboni A, Fasoli

- M, Zadra C, Lovato A, Pezzotti M, Delledonne M, Polverari A: General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics* 2010, 11:117.
7. Gessler C, Pertot I, Perazzolli M: *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Phytopathologia Mediterranea* 2011, 50:3-44.
8. Borie B, Jeandet P, Parize A, Bessis R, Adrian M: Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Am J Enol Viticult* 2004, 55:60-64.
9. Figueiredo A, Fortes AM, Ferreira S, Sebastiana M, Choi YH, Sousa L, Acioli-Santos B, Pessoa F, Verpoorte R, Pais MS: Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *J Exp Bot* 2008, 59:3371-3381.
10. Fung RWM, Gonzalo M, Fekete C, Kovacs LG, He Y, Marsh E, McIntyre LM, Schachtman DP, Qiu WP: Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiol* 2008, 146: 236-249.
11. Kortekamp A: Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of the Peronosporaceae using light- and epifluorescence-microscopy. *Mycol Res* 2005, 109:640-648.
12. Kortekamp A: Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Bioch* 2006, 44:58-67.
13. Vandelle E, Poinssot B, Wendehenne D, Bentejac M, Alain P: Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 2006, 19:429-440.
14. Allegre M, Daire X, Heloir MC, Trouvelot S, Mercier L, Adrian M, Pugin A: Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytol* 2007, 173:832-840.
15. Diez-Navajas AM, Wiedemann-Merdinoglu S, Greif C, Merdinoglu D: Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* 2008, 98:776-780.
16. Derckel JP, Baillieul F, Manteau S, Audran JC, Haye B, Lambert B, Legendre L: Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 1999, 89:197-203.
17. Jeandet P, Douillt-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M: Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agr Food Chem* 2002, 50:2731-2741.
18. Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H: Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 2004, 43:145-148.
19. Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring JL, Gindro K: The effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae*: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiol Biochem* 2011, 49:265-274.
20. Pezet R, Pont V: Identification of pterostilbene in grape berries of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol Bioch* 1988, 26:603-607.
21. Korhammer S, Reniero F, Mattivi F: An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry* 1995, 38:1501-1504.
22. Reniero F, Rudolph M, Angioni A, Bernreuther A, Cabras P, Mattivi F: Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. *Vitis* 1996, 35:125-127.
23. Gatto P, Vrhovsek U, Muth J, Segala C, Romualdi C, Fontana P, Pruefer D, Stefanini M, Moser C, Mattivi F *et al*: Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J Agr Food Chem* 2008, 56:11773-11785.
24. Langcake P, Pryce RJ: Production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to UV irradiation. *Phytochemistry* 1977, 16:1193-1196.
25. Schubert R, Fischer R, Hain R, Schreier PH, Bahnweg G, Ernst D, Sandermann H, Jr.: An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol Biol* 1997, 34:417-426.
26. Lijavetzky D, Almagro L, Belchi-Navarro S, Martinez-Zapater JM, Bru R, Pedreno MA: Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res Notes* 2008, 1:132.
27. Zamboni A, Gatto P, Cestaro A, Pilati S, Viola R, Mattivi F, Moser C, Velasco R: Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *BMC Genomics* 2009, 10:363.
28. Fischer BM, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Topfer R, Zyprian EM: Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor Appl Genet* 2004, 108:501-515.
29. Welter LJ, Gokturk-Baydar N, Akkurt M, Maul E, Eibach R, Topfer R, Zyprian EM: Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol Breeding* 2007, 20:359-374.
30. Marguerit E, Boury C, Manicki A, Donnart M, Butterlin G, Nemorin A, Wiedemann-Merdinoglu S, Merdinoglu D, Ollat N, Decroocq S: Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor Appl Genet* 2009, 118:1261-1278.
31. Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon AF, Cipriani G, Morgante M, Testolin R, Di Gaspero G: Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor Appl Genet* 2009, 120:163-176.
32. Moreira FM, Madini A, Marino R, Zulini L, Stefanini M, Velasco R, Kozma P, Grando MS: Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes* 2010, 7:153-167.
33. Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A: cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 2008, 9:142.
34. Wu J, Zhang Y, Zhang H, Huang H, Folta KM, Lu J: Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biol* 2010, 10:234.
35. Mattivi F, Vrhovsek U, Malacarne G, Masuero D, Zulini L, Stefanini M, Moser C, Velasco R, Guella G: Profiling of Resveratrol Oligomers, Important Stress Metabolites, Accumulating in the Leaves of Hybrid *Vitis vinifera* (Mer-zling x Teroldego) Genotypes Infected with *Plasmopara viticola*. *J Agric Food Chem* 2011, 59:5364-5375.
36. Vrhovsek U, Malacarne G, Masuero D, Zulini L, Guella G, Stefanini M, Velasco R, Mattivi F: Profiling and accurate quantification of *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, *trans*-pterostilbene and eleven viniferins induced by *Plasmopara viticola* in partially resistant grapevine leaves. *Aust J Grape Wine Res*, [epub ahead of print DOI: 10.1111/j.1755-0238.2011.00163.x].
37. Anonymous: OIV Descriptor list for grapevine varieties and *Vitis* species. Office International de la Vigne et du Vin (OIV), Paris; 1983.
38. Langcake P, Pryce RJ: Production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 1976, 9:77-86.
39. Langcake P: Disease resistance of *Vitis* spp and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene. *Physiol Plant Pathol* 1981, 18:213-226.

40. Pryce RJ, Langcake P: Alpha-viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* 1977, 16: 1452-1454.
41. Jean-Denis JB, Pezet R, Tabacchi R: Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006, 1112:263-268.
42. Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL *et al*: Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 2006, 313:1261-1266.
43. The Gene Ontology [<http://www.geneontology.org/>]
44. Jones JD, Dangl JL: The plant immune system. *Nature* 2006, 444:323-329.
45. Panstruga R, Parker JE, Schulze-Lefert P: SnapShot: plant immune response pathways. *Cell* 2009, 136:978.e1-3.
46. Landrault N, Larronde F, Delaunay JC, Castagnino C, Vercauteren J, Merillon JM, Gasc F, Cros G, Teissedre PL: Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J Agric Food Chem* 2002, 50:2046-2052.
47. Pezet R, Gindro K, Viret O, Spring JL: Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol Mol Plant P* 2004, 65:297-303.
48. Smith DA: Toxicity of phytoalexins. In *Phytoalexins*. Edited by Bailey JAaM, J. W. Glasgow, London: Blackie; 1982: 218-252.
49. Haegi A, Bonardi V, Dal'Aglio E, Glissant D, Tumino G, Collins NC, Bulgarelli D, Infantino A, Stanca AM, Delledonne M *et al*: Histological and molecular analysis of Rdg2a barley resistance to leaf stripe. *Mol Plant Pathol* 2008, 9:463-478.
50. Laquitaine L, Gomes E, Francois J, Marchive C, Pascal S, Hamdi S, Atanassova R, Delrot S, Coutos-Thevenot P: Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* 2006, 19:1103-1112.
51. Perazzolli M, Bampi F, Faccin S, Moser M, De Luca F, Ciccotti AM, Velasco R, Gesler C, Pertot I, Moser C: *Armillaria mellea* induces a set of defense genes in grapevine roots and one of them codifies a protein with antifungal activity. *Mol Plant Microbe Interact* 2010, 23:485-496.
52. Jacobs AK, Dry IB, Robinson SP: Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathol* 1999, 48:325-336.
53. Monteiro S, Barakat M, Picarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB: Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 2003, 93:1505-1512.
54. Richter H, Pezet R, Viret O, Gindro K: Characterization of 3 new partial stilbene synthase genes out of over 20 expressed in *Vitis vinifera* during the interaction with *Plasmopara viticola*. *Physiol Mol Plant P* 2006, 67:248-260.
55. Melchior F, Kindl H: Coordinate- and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis cv. Optima*. *Arch Biochem Biophys* 1991, 288: 552-557.
56. Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C: Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol* 1994, 24:743-755.
57. Pérez F, Villegas D, Mejia N: Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves. *Phytochemistry* 2002, 60:573-580.
58. Takaya Y, Terashima K, Ito J, He YH, Tateoka M, Yamaguchi N, Niwa M: Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron* 2005, 61: 10285-10290.
59. Whetten R, Sederoff R: Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 1995, 7:1001-1013.
60. Dixon RA, Xie DY, Sharma SB: Proanthocyanidins: a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* 2005, 165:9-28.
61. Mellway RD, Tran LT, Prouse MB, Campbell MM, Constabel CP: The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive *MYB134* gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar. *Plant Physiol* 2009, 150:924-941.
62. Delauré SL, van Hemelrijck W, De Bolle MFC, Cammue BPA, De Coninck BMA: Building up plant defenses by breaking down proteins. *Plant Science* 2008, 174:375-385.
63. Moy P, Qutob D, Chapman BP, Atkinson I, Gijzen M: Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Microbe Interact* 2004, 17:1051-1062.
64. Restrepo S, Fry WE, Smart CD: Understanding the potato - *Phytophthora infestans* compatible interaction. *Phytopathology* 2004, 94:S87.
65. Espinoza C, Vega A, Medina C, Schlauch K, Cramer G, Arce-Johnson P: Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. *Funct Integr Genomic* 2007, 7:95-110.
66. Wang X, Liu W, Chen X, Tang C, Dong Y, Ma J, Huang X, Wei G, Han Q, Huang L *et al*: Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC Plant Biol* 2010, 10:9.
67. OEPP/EPPO: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products. In: *EPPO Bulletin. Volume 27*. Edited by OEPP/EPPO; 1997: 385-387.
68. Moser C, Gatto P, Moser M, Pindo M, Velasco R: Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues. *Mol Biotechnol* 2004, 26:95-100.
69. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997, 25:3389-3402.
70. dbEST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>]
71. DFCI Grape Gene Index [<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gi-main.pl?gudb=grape>]
72. IASMA Genome Browser [<http://genomics.research.iasma.it/>]
73. dbRefSeq [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>]
74. UNIPROT [<http://www.uniprot.org/>]
75. Fontana P, Cestaro A, Velasco R, Formentin E, Toppo S: Rapid annotation of anonymous sequences from genome projects using semantic similarities and a weighting scheme in gene ontology. *PLoS One* 2009, 4:e4619.
76. Combimatrix Corporation [www.combimatrix.com]
77. Galbraith DW: Global analysis of cell type-specific gene expression. *Comp Funct Genomics* 2003, 4:208-215.
78. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:5116-5121.
79. Edgar R, Domrachev M, Lash AE: Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:207-210.
80. Ramackers C, Ruijter JM, Deprez RHL, A.F.M. M: Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosciences Letters* 2003, 339: 62-66.
81. Ruijter JM, Ramackers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM: Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. 2009, 37:e45.
82. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:e45.
83. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:e36.