



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento Scientifico e Tecnologico

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE AGRO-INDUSTRIALI

CICLO XIX

**CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO METABOLICO E
TRASCRIZIONALE DI UNA POPOLAZIONE DI *Vitis* spp.
SEGREGANTE PER LA RESISTENZA A *Plasmopara viticola***

S.S.D. PATOLOGIA VEGETALE (AGR/12)

Coordinatore: Ch.mo Prof. Massimo Delledonne

Tutore: Ch.mo Prof. Massimo Delledonne

Co-tutori: Dott. Riccardo Velasco

Dott. Claudio Moser

Dip. Genetica e Biologia Molecolare, Istituto Agrario S. Michele all'Adige (TN)

Dottoranda: Giulia Malacarne

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

“Siamo nani arrampicati sulle spalle di giganti. Così vediamo di più e più lontano di loro, non perché la nostra vista sia più acuta o la statura più alta, ma perché ci solleviamo in aria con tutta la loro statura gigantesca...”

Berardo di Chartres

Al mio papà

INDICE	I
ABBREVIAZIONI	IV
1 INTRODUZIONE	1
1.1 PREMESSA	1
1.1 GENETICA DELLA RESISTENZA	2
1.1.1 la teoria “gene per gene” e la sua evoluzione	2
1.1.2 Geni di resistenza (<i>R</i>) e geni di avirulenza (<i>AVR</i>)	3
1.1.3 La risposta ipersensibile	4
1.1 VITE E RESISTENZA A STRESS BIOTICI	5
1.1.4 un po’ di storia	5
1.1.5 Dal miglioramento genetico tradizionale agli approcci genomici per l’individuazione dei determinanti della resistenza a <i>P. viticola</i>	6
1.1.6 <i>Plasmopara viticola</i> , agente della peronospora in vite: ciclo di infezione e sintomatologia	7
1.1.7 Basi genetiche della resistenza a <i>P. viticola</i>	8
1.1 LA FAMIGLIA DEGLI STILBENI IN VITE	10
1.1.8 La biosintesi degli stilbeni	12
1.1.9 Geni di vite codificanti per la stilbene sintasi e regolazione della loro espressione	14
1.1.10 Ruolo degli stilbeni come fitoalessine	16
1.1 GENOMICA FUNZIONALE	19
1.1.11 Ruolo della trascrittomica nella genomica funzionale	19
1.1.12 Aflp-tp (Amplified Fragments Length Polymorphisms)	21
1.1.13 “Microarray”	22
1.1 GENOMA E GENOMICA FUNZIONALE IN VITE: STATO DELL’ARTE	25
2 SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA	27
3 MATERIALI E METODI	28
3.1 MATERIALE VEGETALE	28
3.2 INFEZIONE ARTIFICIALE CON <i>P. VITICOLA</i> IN SERRA E IN CAMPO	29

3.3	ANALISI FENOTIPICA	29
3.4	ANALISI DEGLI STILBENI	30
3.4.1	Campionamento del materiale vegetale	30
3.4.2	Preparazione del campione per HPLC-DAD-MS	30
3.4.3	Standard di corsa	31
3.4.4	Analisi HPLC-DAD-MS	32
3.4.5	Analisi statistica dei dati fenotipici e metabolici	34
3.5	MESSA A PUNTO DI UN METODO DI ISOLAMENTO DI VINIFERINE	34
3.5.1	Estrazione	35
3.5.2	Cromatografia “flash” su resina “Isolute ENV+” con HPLC preparativo	35
3.5.3	Cromatografia “flash” su resina “Toyopearl HW 40 S” con HPLC preparativo	36
3.5.4	Cromatografia su colonna “Discovery HS C18” con HPLC preparativo	37
3.6	ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DA TESSUTO FOGLIARE DI VITE	37
3.6.1	Misura dell’integrità, concentrazione e purezza dell’RNA estratto	39
3.7	ANALISI AFLP-TP	40
3.7.1	Campionamento del materiale vegetale	40
3.7.2	Sintesi di cDNA a doppio filamento	40
3.7.3	Digestione del cDNA	42
3.7.4	Preparazione e ligazione degli adattatori	44
3.7.5	Pre-amplificazione	45
3.7.6	Amplificazione selettiva	46
3.7.7	Corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide dei prodotti di PCR	48
3.7.8	Excisione delle bande dal filtro ed amplificazione del cDNA eluito	49
3.7.9	Purificazione e sequenziamento dei prodotti di amplificazione	50
3.7.10	Raggruppamento in “cluster” dei frammenti di cDNA-AFLP	51
3.7.11	Annotazione delle sequenze	51
3.8	REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION (RT)-PCR	52
3.8.1	Trattamento DNAsico	52
3.8.2	Sintesi del primo filamento di cDNA	53
3.8.3	Amplificazione del gene di actina di vite	53
3.8.4	“Real-time RT-PCR”	54
3.8.5	Analisi dei dati di “Real-time RT-PCR”	56
3.9	ANALISI MICROARRAY (CUSTOMARRAY™ 4x2K - COMBIMATRIX)	58

3.9.1	Campionamento del materiale vegetale	58
3.9.2	Disegno dei “probe” e del vetrino	58
3.9.3	Marcatura indiretta dell’rna “target”	59
3.9.4	Ibridazione del vetrino	63
3.9.5	Lavaggi del vetrino	66
3.9.6	Lettura del vetrino e quantificazione del segnale	66
3.9.7	“Stripping del vetrino”	67
3.9.8	Analisi dei dati microarray	68
4	RISULTATI	70
4.1	ANALISI FENOTIPICA DELLA POPOLAZIONE D’INCROCIO FREIBURG X ‘TEROLDEGO’	70
4.2	ANALISI DEGLI STILBENI NELLA POPOLAZIONE D’INCROCIO FREIBURG X ‘TEROLDEGO’	73
4.2.1	Messa a punto della caratterizzazione degli stilbeni	73
4.2.2	Caratterizzazione degli stilbeni nella popolazione di incrocio	76
4.2.3	Messa a punto di un metodo di isolamento di viniferine non caratterizzate in vite	78
4.3	RELAZIONE TRA LA RESISTENZA ALLA MALATTIA ED IL CONTENUTO IN STILBENI	80
4.4	ANALISI DEI PROFILI TRASCRIZIONALI NELL’INTERAZIONE VITE-<i>P. VITICOLA</i>	82
4.3.1	Estrazione dell’RNA totale da tessuto fogliare di vite	82
4.3.2	Isolamento ed identificazione di un set di bande differenzialmente espresse tramite analisi AFLP-TP	83
4.3.3	Identificazione di un set di geni con variazione di espressione significativa tramite analisi “microarray”	94
5	DISCUSSIONE	108
6	SOMMARIO	121
7	BIBLIOGRAFIA	123
8	APPENDICE	140
9	RINGRAZIAMENTI	164

ABBREVIAZIONI

°C: gradi Celsius

A: assorbanza

ACC: Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid

AFLP-TP: Amplified Fragments Length Polymorphisms- Transcript Profiling

aRNA: “amino allyl” acido ribonucleico

cDNA: acido deossiribonucleico complementare

CoA: coenzima A

Ct: “cycle treshold”

cv: cultivar

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA: acido deossiribonucleico

EDTA: acido etilendiamminicotetraetico sale bisodico

EtBr: etidio bromuro

FC: “fold-change”

FDR: “False Discovery Rate”

fw: peso fresco

g: grammi

gg: giorni

h: ore

hdi: ore dopo infezione

HPLC-DAD-MS: High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Mass
Spectrometry

HR: Hypersensitive Response

LD: limiti di rilevazione

LQ: limite di quantificazione

m/z: massa/carica

min: minuti

mRNA: acido ribonucleico messaggero

pb: paia basi

PCR: reazione a catena della polimerasi

PR: “pathogenesis related protein”

R²: coefficiente di determinazione

RNA: acido ribonucleico

rpm: rivoluzioni per minuto

S/N: rapporto segnale-rumore

SAM: Significance Analysis of Microarrays

SE: errore standard

sec: secondi

StSy: stilbene sintasi

UV: radiazione ultravioletta

v/v: volume per volume

w/v: “weight” per volume

Δ: “treshold”

1 INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

Negli ambienti naturali e agrari le piante sono circondate da un gran numero di agenti biotici, fonti di “stress”, quali funghi, batteri, virus e parassiti animali (nematodi, tignole, acari, etc.).

Quando una pianta ed un patogeno vengono in contatto, si instaura un’intima comunicazione (Keen, 2000). L’uno tenta di colonizzare l’ospite ed utilizzarne le risorse, l’altra, data la propria immobilità che le preclude di evitarne il contatto, è adattata a riconoscerlo e ad attivare una gamma di risposte di difesa (Wan *et al.*, 2002).

Innanzitutto la pianta può essere dotata di caratteristiche fisiche, nella costituzione della parete per esempio, e chimiche, come la presenza di sostanze antimicrobiche, che non si conciliano con le capacità patogenetiche del potenziale parassita, o possono essere più semplicemente inadatte a sostenere il metabolismo del patogeno. In questi casi si parla di resistenza pre-infezionale, che non richiede alcun tipo di reazione attiva da parte dell’ospite ed agisce generalmente a livello di specie. Si attua una resistenza post-infezionale dopo attivazione, in seguito al riconoscimento del presunto patogeno, di meccanismi di difesa estremamente efficaci volti alla localizzazione dell’infezione. In entrambi i casi l’interazione ospite-patogeno risulta incompatibile; la compatibilità si realizza invece quando il parassita riesce a colonizzare l’ospite, che non lo sa riconoscere, e a svolgere almeno parte del proprio ciclo vitale a sue spese.

Lo studio delle interazioni pianta-patogeno e dei meccanismi di difesa desta da sempre un grande interesse non solo per le conoscenze che ne derivano, riguardo alla fisiologia e alla biochimica vegetale ed in particolare ai meccanismi di segnalazione operanti nel corso di una risposta di difesa, ma anche per le numerose ricadute applicative nel miglioramento genetico delle varietà e nella difesa delle colture (Buchanan *et al.*, 2000).

1.1 GENETICA DELLA RESISTENZA

1.1.1 LA TEORIA “GENE PER GENE” E LA SUA EVOLUZIONE

Il tipo di risposte difensive che le piante originano nei confronti dei potenziali patogeni è qualitativamente molto simile. Ancor prima dell'ingresso del patogeno, si può instaurare un livello basale di resistenza, che si osserva anche nella pianta suscettibile ed è patogeno non specifica, necessario ma non sufficiente a bloccare lo sviluppo e la diffusione del parassita.

Pertanto una pianta resistente ad un certo patogeno si distingue da una suscettibile per la capacità di riconoscerlo come tale. Il riconoscimento è reso possibile da un sistema di sorveglianza, grazie al quale le piante riescono a discriminare tra segnali provenienti dalle proprie cellule, da organismi benefici, o da potenziali patogeni.

In un lavoro ormai storico volto al miglioramento genetico del lino, Flor avanza quella che ancora oggi è nota come teoria del “gene per gene”, secondo la quale la resistenza razza-specifica dipende da un singolo gene dell'ospite, a cui corrisponde un singolo gene nel patogeno, e la mancanza di anche uno solo dei due determina suscettibilità (Flor, 1947).

Da questa osservazione la classe di interazioni più altamente studiate sono state le cosiddette relazioni “gene per gene”: quando il prodotto di un gene dominante di avirulenza (*AVR*) viene riconosciuto direttamente dal prodotto di un gene dominante di resistenza (*R*) dell'ospite, la proteina *R* ed il macchinario ad esso associato attivano delle rapide e forti difese che fanno fallire l'infezione (Gabriel e Rolfe, 1990).

L'interazione fisica tra recettore e ligando è stata direttamente dimostrata in pochissimi casi (Leister e Katagiri, 2000): al primo caso evidenziato in pomodoro (*AVRPto/PTO*) si aggiunge il legame specifico tra *AVR-Pita* del fungo *Magnaporthe grisea* e il dominio LRR del recettore citoplasmatico *Pi-ta* di riso (Jia *et al.*, 2000).

Il “modello di guardia”, proposto da van der Biezen e Jones nel 1998, permette allora di riformulare la teoria del “gene per gene”: l'effettore *AVR* agirebbe da fattore di virulenza interagendo con un “target di patogenicità” a livello dell'ospite, annullando la resistenza basale da esso promossa. Il recettore *R*, nel ruolo di guardia, riconoscerebbe il complesso a due componenti come fattore di avirulenza, iniziando così una risposta di resistenza (van der Biezen e Jones, 1998b).

A livello genetico c'è una sovrapposizione tra i *loci* coinvolti nella resistenza mediata da geni *R* e quella basale, che suggerisce come i due tipi di resistenza condividano componenti comuni (Glazebrook *et al.*, 1997). La suscettibilità è dovuta quindi sia ad un minor livello di

espressione basale dei geni correlati con la difesa, sia al mancato riconoscimento del patogeno da parte dell'ospite, ma non ad una deficienza dei meccanismi di resistenza: le differenze nei profili di espressione genica fra le due classi di genotipi sono di tipo quantitativo e temporale più che qualitativo (Katagiri, 2004).

1.1.2 GENI DI RESISTENZA (*R*) E GENI DI AVIRULENZA (*AVR*)

Con il progredire degli strumenti disponibili per la ricerca in campo biochimico e soprattutto molecolare è stato possibile clonare numerosi geni *R* in diverse specie vegetali. Fatta eccezione per il primo gene clonato (Hm1 di mais), tutti i geni successivamente individuati mostrano caratteristiche strutturali consone al ruolo di recettori e trasduttori del segnale.

Geni *R*, con specificità per una grande varietà di patogeni virali, batterici e fungini, codificano proteine con una serie di domini conservati e ascrivibili a classi ben definite di geni di resistenza. Una delle classi più rappresentate e per questo funzionalmente più importanti comprende proteine con domini LRR (Leuchin Reach Repeats), il cui ruolo sarebbe duplice: riconoscere il ligando ed interagire con altre proteine appartenenti alla cascata di trasduzione del segnale (Dixon *et al.*, 1996).

L'analisi di sequenza di geni appartenenti a questa classe mostra la presenza di un altro dominio caratteristico di legame per nucleotidi (NBS), associato a sequenze di tipo "coiled-coil", o a domini di tipo TIR.

Il riconoscimento elicitore-recettore può avvenire a livello intracellulare come extracellulare, a livello della cellula ospite (Figura 1).

L'inibitore della proteasi extracellulare (EBI) di *Phytophthora infestans* lega e inibisce la proteasi nell'apoplasto di pomodoro (Tian *et al.*, 2005), così come il fattore di avirulenza AVR2 dal fungo *Cladosporium fulvum* lega la cistein proteasi extracellulare RCR3 di pomodoro, complesso che è riconosciuto dal dominio extracellulare della proteina CF2 (Rooney, 2005). I recentemente identificati Avr1b-1 da *Phytophthora sojae* (Shan *et al.*, 2004), AvrL567 da *Melampsora lini* (Dodds *et al.*, 2004), ATR13, ATR1^{NdWsb} e AVR3a dagli oomiceti *Hyaloperonospora parasitica* e *Phytophthora infestans*, patogeni di *Arabidopsis*, vengono invece traslocati, tramite gli austori, nel citoplasma dell'ospite, dove vengono riconosciuti dalle proteine *R* dell'ospite (Allen *et al.*, 2004, Rehmany *et al.*, 2005, Armstrong *et al.*, 2005).

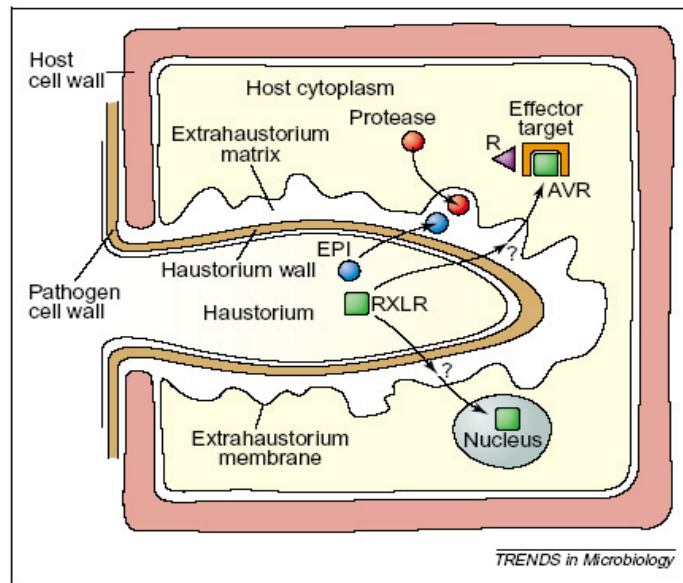


Figura 1 Interazione intra- ed extracellulare tra i fattori di avirulenza di un oomicete e i target di patogenicità a livello della cellula ospite (da (Birch et al., 2006))

1.1.3 LA RISPOSTA IPERSENSIBILE

Uno dei meccanismi di resistenza che ha sempre richiamato grande attenzione da parte dei ricercatori è la cosiddetta resistenza per ipersensibilità, o risposta ipersensibile (HR, da Hypersensitive Response).

L'HR, manifestazione della maggior parte delle interazioni “gene per gene”, è caratterizzata a livello fenotipico da una rapida morte cellulare in prossimità del sito d'infezione (necrosi), in modo da creare una barriera fisica che si pensa contribuisca a bloccare la crescita del patogeno (Heath, 2000).

Alla HR si associa per lo più una resistenza ad altissima efficacia. Esistono infatti numerose evidenze sperimentali riguardo al fatto che la HR non sia una semplice degenerazione in seguito all'infezione e al rilascio di sostanze tossiche da parte del patogeno, ma una forma di morte cellulare programmata (PCD, Programmed Cell Death), simile all'apoptosi animale, dovuta all'attivazione di una serie di processi codificati dal genoma vegetale. Trattandosi di un “programma di suicidio”, richiede attività trascrizionale e sintesi *ex novo* di enzimi e comporta l'attivazione e la regolazione di un complesso “network” di eventi cellulari, spesso correlati tra loro tramite precise molecole segnale (Lam e del Pozo, 2000, Greenberg, 1997).

La risposta ipersensibile viene considerata una tipica risposta di resistenza nei confronti di funghi biotrofi, in quanto le cellule invase dal patogeno necrotizzate non offrono più supporto trofico al patogeno, bloccandone lo sviluppo. Inoltre essa rappresenta un mezzo di contenimento efficace anche nei confronti di funghi necrotrofi.

La HR, per quanto sia la forma di resistenza più frequentemente associata ad un'interazione "gene per gene", non è l'unica. È bene ricordare infatti che ci sono esempi, sebbene limitati, di resistenze molto efficaci governate dai geni R, che non sono di tipo ipersensibile.

La formazione delle lesioni necrotiche locali è comunque sempre accompagnata dall'attivazione di numerose altre risposte difensive, di tipo trascrizionale e non, che agiscono in maniera coordinata temporalmente e spazialmente nel determinare la resistenza e che non appaiono diverse e meno efficaci nei casi in cui non viene attivata una risposta ipersensibile.

1.1 VITE E RESISTENZA A STRESS BIOTICI

1.1.4 UN PO' DI STORIA

La vite, la cui specie più interessante dal punto di vista economico e commerciale è costituita da *Vitis vinifera* L., è coltivata in circa 60 paesi grazie alla sua adattabilità a climi e a suoli differenti. L'origine della maggior parte delle cultivar di *V. vinifera* oggi esistenti è dovuta all'incrocio non controllato tra piante coltivate e spontanee e alla domesticazione di quest'ultime. Tuttavia le caratteristiche di resistenza ai patogeni tipiche della vite selvatica sono andate scomparendo nella vite coltivata.

Nella seconda metà del XIX secolo in Europa si sono diffuse malattie provenienti dall'America che hanno messo seriamente in difficoltà le coltivazioni tradizionali viticole:

- la fillossera della vite (*Phylloxera vastatrix*), un afide parassita che attacca le radici e/o l'apparato epigeo della pianta;
- la peronospora della vite (agente *Plasmopara viticola*), l'oidio (agente *Uncinula necator*/*Oidium tuckeri*) e la muffa grigia (agente *Botrytis cinerea*), malattie causate da funghi che attaccano foglie e grappoli.

Le fonti di resistenza a tali malattie si possono trovare in molte specie native dei continenti americano ed asiatico. Le specie che portano una resistenza completa a peronospora ed oidio appartengono al sottogenere *Muscadinia* (Staudt e Kassemeyer, 1995), che ha un assetto cromosomico leggermente diverso dal resto del genere *Vitis* ($2n=40$ e non 38) e quindi difficile da incrociare (Paquet *et al.*, 2001). Tuttavia resistenze a peronospora ed odio si trovano anche in altre specie appartenenti al sottogenere *Euvitis*, comprendente anche la vite europea, tra cui *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. lincecumii*, *V. labrusca*, *V. amurensis*, *V. rotundifolia*, *V. aestivalis*, *V. cinerea* e *V. berlandieri*. L'ibridazione tra queste specie avviene facilmente (Alleweldt *et al.*, 1990).

1.1.5 DAL MIGLIORAMENTO GENETICO TRADIZIONALE AGLI APPROCCI GENOMICI PER L'INDIVIDUZIONE DEI DETERMINANTI DELLA RESISTENZA A *P. VITICOLA*

Se la fillossera è stata arginata utilizzando portinnesti di specie di origine americana, resistenti, a livello radicale, a tale patogeno, più problematico è stato invece trovare mezzi di lotta alternativi al costante trattamento dei vigneti con prodotti anticrittogamici per combattere l'oidio, la peronospora e la muffa grigia.

L'applicazione dei metodi tradizionali di miglioramento genetico, basati su programmi d'incrocio e selezione, ha avuto uno scarso successo per alcune caratteristiche biologiche della vite, comuni a molte specie arboree: il lungo ciclo di generazione, l'elevata eterozigosi e la forte depressione da inincrocio rendono difficile il raggiungimento degli obiettivi.

Occorre poi sottolineare le difficoltà che si sono incontrate nell'ottenimento di ibridi resistenti con cui si volevano produrre vini di qualità: le viti di origine americana, utilizzate negli incroci come fonte di resistenza, hanno trasmesso aromi indesiderati, dando origine a vini dal gusto non gradevole (Alleweldt e Possingham, 1998).

Pertanto l'introggressione di caratteri di resistenza alle principali malattie della vite deve andare di pari passo al potenziamento delle caratteristiche qualitative del frutto.

In quest'ambito lo sviluppo di approcci genomici ha dato un forte impulso al miglioramento genetico tradizionale consentendo di ridurre i tempi necessari ad evidenziare la presenza di caratteri interessanti, ovvero senza dover attendere la loro espressione fenotipica nell'individuo adulto.

Negli ultimi anni sono sorti numerosi lavori in vite per l'individuazione di marcatori molecolari associati a *loci* di resistenza a *U. necator* e a *P. viticola*, per la mappatura fisica dei *loci* stessi (Luo *et al.*, 2001, Donald *et al.*, 2002, Di Gaspero e Cipriani, 2002, Barker *et al.*, 2005) e per l'individuazione di QTL di resistenza ai due patogeni ("Quantitative Trait Locus") (Marino *et al.*, 2003, Merdinoglu *et al.*, 2003, Fisher *et al.*, 2004, (Douceff *et al.*, 2004).

Approcci genomici come la selezione assistita da marcatori molecolari o la generazione di piante transgeniche sono alla base del trasferimento dei tratti di resistenza in cultivar classiche o d'élite di *V. vinifera*, col fine di aumentare le proprietà agronomiche della vite, preservandone le caratteristiche di qualità (Bisson *et al.*, 2002).

La recente integrazione di trascrittomica e metabolomica inoltre sta assumendo un ruolo fondamentale perché consentirebbe di identificare sinergicamente vie trascrizionali e

biochimiche alla base della qualità della bacca o della resistenza alle malattie in vite (da Silva *et al.*, 2005).

1.1.6 *PLASMOPARA VITICOLA*, AGENTE DELLA PERONOSPORA IN VITE: CICLO DI INFEZIONE E SINTOMATOLOGIA

Plasmopara viticola (Berk e Curtis) Berl. et De Toni, l'agente causale della peronospora in vite, è un fungo biotrofico, appartenente all'ordine degli oomiceti, parassita obbligato di *V. vinifera* e di alcune altre specie di *Vitis* (Langcake, 1980).

La fonte primaria di inoculo è costituita dalle oospore, cioè spore di conservazione di origine gamica che si formano nelle foglie morte cadute a terra. Alla ripresa vegetativa, se ci sono le condizioni di temperatura ed umidità ottimali (20°C, umidità relativa > 80%) le oospore germinano producendo degli sporangi che liberano delle zoospore. Queste germinano e penetrano nei tessuti della foglia o dell'acino attraverso le aperture stomatiche, formando una vescicola d'infezione.

In un'interazione compatibile dalla vescicola d'infezione si generano delle ife secondarie che, attraverso lo sviluppo di strutture di sostentamento (austori), si espandono dal sito di infezione alle cellule vicine, traendo nutrimento dalle cellule stesse.

In un'interazione incompatibile invece la pianta ospite è in grado di riconoscere elicitatori specifici rilasciati dal fungo al momento dell'infezione, portando alla morte dello stesso tramite risposta ipersensibile limitata ad una o più cellule (Figura 2).

Le foglie sono gli organi che più di frequente, e generalmente prima degli altri, vengono raggiunti da *P. viticola*.

La pianta è suscettibile fin da quando la lamina fogliare è appena sviluppata e persiste per tutto il periodo di sviluppo della foglia stessa.

Nelle foglie giovani o di media età il primo sintomo della malattia è costituito da una decolorazione visibile sulla pagina fogliare superiore, la cosiddetta "macchia d'olio", di forma rotondeggiante, se al centro della foglia, o semicircolare, se ai bordi. In corrispondenza di essa, sulla pagina fogliare inferiore dopo qualche giorno si osserva una tipica muffa biancastra, indice della sporulazione del parassita che libera le zoospore per un nuovo ciclo di infezione.

Se la pianta è resistente o comunque parzialmente resistente, la zona di invasione delle ife fungine è circoscritta dagli elementi fibro-vascolari. La prima manifestazione consiste in

piccole tacche poligonali (peronospora a mosaico), ingiallite o arrossate per infiltrazioni antocianiche, da cui fuoriesce una leggera sporulazione.

Le maggiori differenze tra parziale e totale resistenza riguardano la grandezza delle lesioni necrotiche e l'intensità della sporulazione: le varietà a resistenza intermedia (*Vitis rupestris*) sviluppano necrosi diffusa e poca sporulazione, mentre le varietà resistenti (*Vitis rotundifolia*) sviluppano macchie necrotiche puntiformi senza sporulazione con risposta ipersensibile (Dai *et al.*, 2002).

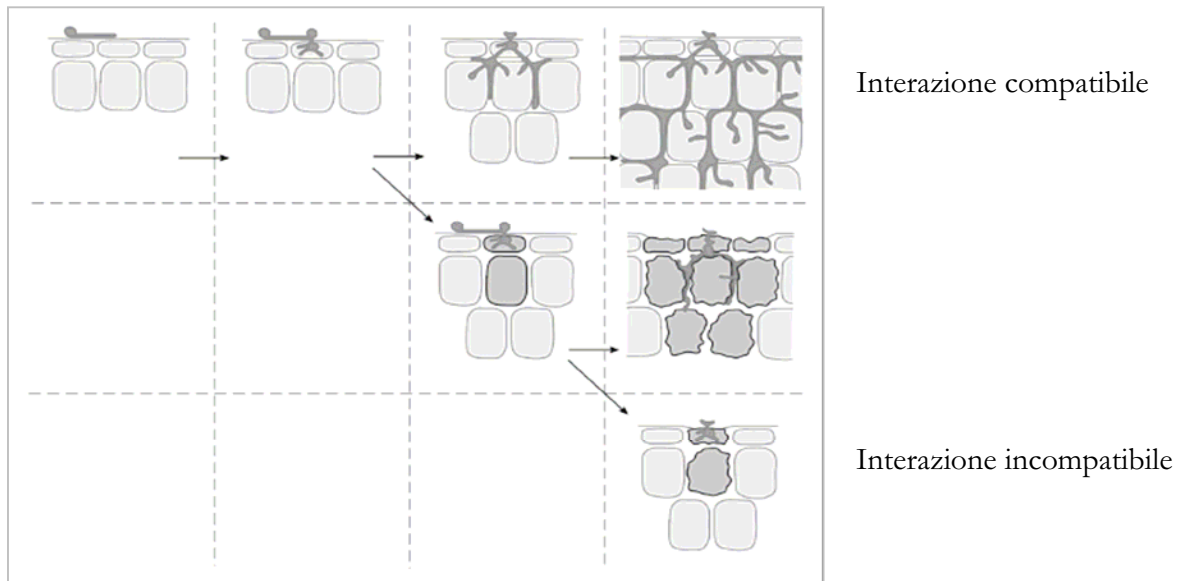


Figura 2 Rappresentazione schematica dei primi eventi di infezione di *P. viticola* in un'interazione compatibile ed incompatibile in *Vitis* spp. (da Kamoun *et al.*, 1999)

1.1.7 BASI GENETICHE DELLA RESISTENZA A *P. VITICOLA*

RICONOSCIMENTO DEL PATOGENO FUNGINO

Langcake fu il primo a formulare l'esistenza di un meccanismo di tipo “gene per gene” alla base del riconoscimento degli austeri di *P. viticola*: le varietà di *Vitis* spp. resistenti riconoscono specifici elicitori rilasciati dal patogeno portando alla morte dello stesso tramite risposta ipersensibile (HR) (Langcake, 1981).

La resistenza a *P. viticola*, portata da specie americane ed asiatiche, sarebbe dovuta a due principali sistemi genetici: un singolo gene, che determina la reazione di ipersensibilità, per il quale *V. vinifera* è omozigote recessiva e le specie resistenti sono omozigoti dominanti e alcuni geni che determinano l'inibizione della crescita del micelio nell'ospite (Reisch e Pratt, 1996).

A questo proposito la caratterizzazione molecolare della popolazione segregante derivante dall'incrocio tra *Muscadinia rotundifolia* e ibridi di *V. vinifera* ha permesso l'identificazione di due “major loci” di resistenza a *P. viticola*, denominati *Rpv1* e *Rpv2*, (Riconoscimento di *Plasmopara*

viticola) confermando i risultati ottenuti da Fisher *et al.* (2004). In particolare il fenotipo di resistenza al fungo mediata dai due *loci* è differente a 7 giorni dall'infezione: RPV2 rallenta lo sviluppo del micelio fungino, impedendone completamente la sporulazione e porta alla formazione di piccole lesioni necrotiche attribuibili a risposta ipersensibile. RPV1 invece consente un minimo sviluppo miceliare, associato ad una lieve sporulazione (Schmidlin *et al.*, 2006).

Esistono inoltre altre evidenze, tra cui quella in tabacco e in altre specie del genere *Benthamiana*, in cui il riconoscimento dei fattori di avirulenza dell'oomicete *Pseudomonas infestans* in alcuni casi dipende da un singolo componente genico, in altri invece da un complesso controllo genico, che porta a risposta ipersensibile variabile in intensità (Kamoun *et al.*, 1999)

In conclusione la resistenza totale agli oomiceti è determinata da un "set" di *loci* R dominanti e la manifestazione di fenotipi intermedi di resistenza e suscettibilità è determinata dalla combinazione delle diverse varianti all'eliche di tali *loci* (Kamoun *et al.*, 1999).

L'isolamento *in vitro* dei fattori di avirulenza degli oomiceti, tra cui *P. viticola*, è reso difficile dalla loro modalità di nutrizione biotrofica, che richiede cellule ospite vive per crescere e svilupparsi.

Esistono molti lavori in *Arabidopsis* sull'identificazione di geni di resistenza RPP (Riconoscimento di *Peronospora parasitica*), che riconoscono in maniera specifica i prodotti di avirulenza del patogeno codificati dai geni ATR (*Arabidopsis thaliana* recognized) di *Peronospora parasitica* (Parker *et al.*, 1997, Botella *et al.*, 1998, McDowell *et al.*, 1998, Rehmany *et al.*, 2005, Armstrong *et al.*, 2005).

EVENTI A VALLE DEL RICONOSCIMENTO DEL PATOGENO FUNGINO

Non essendo stati ancora isolati i fattori di avirulenza dell'oomicete poco si sa dei meccanismi a valle dell'interazione *P.viticola*/vite.

In *Arabidopsis* a valle del riconoscimento RPP-ATR si è vista l'attivazione di "pathway" di difesa diversi, in alcuni punti convergenti, dipendenti o non dall'accumulo di acido salicilico e caratterizzati da specifici trasduttori del segnale (Eulgem *et al.*, 2004).

In un lavoro realizzato con piantine *in vitro* di *Vitis* spp. resistenti a *P. viticola* hanno mostrato come all'infezione con il patogeno fungino segua una serie di eventi in ordine cronologico che vanno dall'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno associata alla risposta ipersensibile, all'accumulo di composti fenolici a livello di parete, all'attivazione trascrizionale

di geni codificanti enzimi di sintesi di fitoalessine e proteine connesse a patogenesi (PR) (Kortekamp e Zyprian, 2003).

In particolare la sintesi di callosio a livello degli stomi infettati e non (Gindro *et al.*, 2003, Hamiduzzaman *et al.*, 2005), l'indurimento di parete e la produzione di stilbeni, le fitoalessine delle *Vitaceae*, rappresentano eventi fondamentali nella risposta ipersensibile a *P. viticola* in vite (Dercks e Creasy, 1989, Dai *et al.*, 1995, Pezet *et al.*, 2004 a-b). Il livello di callosio stomatico, il livello di produzione di stilbeni e la densità di sporulazione divengono quindi degli ottimi parametri isto- e bio-chimici in base ai quali caratterizzare il grado di resistenza e suscettibilità a *P. viticola* di cultivar di *Vitis* spp. (Gindro *et al.*, 2006).

Sulla base di queste evidenze la caratterizzazione trascrizionale in *Vitis* spp. dopo infezione con patogeni fungini dei geni codificanti per gli enzimi di sintesi di derivati del metabolismo fenilpropanoidi (lignina, proantocianidine, stilbeni) ha assunto quindi particolare rilevanza (Busam *et al.*, 1997a, Bezier *et al.*, 2002, Borie *et al.*, 2004, Richter *et al.*, 2006, Kortekamp, 2006).

Infine anche l'espressione costitutiva o indotta dei geni codificanti proteine PR, tra cui gli enzimi litici β -1,3-glucanasi e glucanasi (PR2, PR3 e 4), è indicatrice della resistenza a *P. viticola*, la cui parete cellulare è costituita da chitina e glicano (Robert *et al.*, 2002, Busam *et al.*, 1997b, Kortekamp, 2006).

È stata anche perseguita l'introduzione in vite di geni eterologhi codificanti per proteine PR che ha dimostrato il ruolo di tali proteine nella resistenza a patogeni fungini in vite.

I primi lavori pubblicati hanno riguardato la trasformazione di cultivar di *V. vinifera* con un gene di *Trichoderma* codificante una endochitinasi (Kikkert, 1997) e di embrioni somatici di vite con un gene di riso codificante una chitinasi (Yamamoto *et al.*, 2000). Uno dei problemi di questo sistema consiste nel fatto che all'acquisita resistenza all'attacco fungino segue l'ottenimento di un vino a scarsa limpidezza dovuta all'instabilità a lungo termine di tali proteine (Ferreira *et al.*, 2004).

L'esplorazione quindi di altri meccanismi di resistenza alternativi all'espressione di proteine PR, quali ad esempio la produzione di fitoalessine, può diventare una buona alternativa.

1.1 LA FAMIGLIA DEGLI STILBENI IN VITE

Gli stilbeni costituiscono un gruppo di composti fenolici, tra cui oligomeri e glucosidi, in configurazione *cis* e *trans*, lo scheletro dei quali è basato sulla struttura del *trans*-resveratrolo

(3,5,4'-triidrossistilbene). In vite gli stilbeni hanno ruoli diversi a seconda degli organi in cui vengono sintetizzati, il principale dei quali è quello di agire come composti antimicrobici (fitoalessine) (Jeandet *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda gli stilbeni costituiti da una sola unità di resveratrolo ad oggi in vite sono stati identificati i seguenti composti:

- il *trans*-pterostilbene (3,5-dimetossi-4'-idrossistilbene), derivato del resveratrolo dimetilato (Langcake, 1981);
- il *trans*-piceide ed il *cis*-piceide (3-O- β -D-glicoside del resveratrolo) (Waterhouse e Lamuela-Raventos, 1994; Waffo-Teguo *et al.*, 1996);
- *trans* e *cis*-astringina (3-O-D-glicoside del 3'-idrossiresveratrolo) (Merillon *et al.*, 1997);
- *trans* e *cis*-resveratrol-oside (4'-O- β -D-glicoside del resveratrolo) (Waffo-Teguo *et al.*, 1998);
- il piceatannolo (*trans*-3,3',4,5'-tetraidrossi-stilbene)-3-O- β -glucopiranoside (Waffo-Teguo *et al.*, 1998);
- due nuovi glucosidi monomerici (il resveratrolo 3,5-O- β -diglucoside ed il resveratrolo 3,5,4'-O- β -triglucoside) isolati recentemente in colture di *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (Larronde *et al.*, 2005);

Per quanto riguarda invece gli stilbeni costituiti da più unità di resveratrolo, è noto che, tramite dimerizzazione ossidativa ad opera di specifiche perossidasi, il resveratrolo viene convertito in composti oligomerici, chiamati viniferine (Langcake e Pryce 1977a; Langcake e Pryce 1977b; Langcake, 1981).

Ad oggi in vite sono stati identificati i seguenti oligomeri del resveratrolo, la maggior parte dei quali sono viniferine:

- l' α -viniferina, il deidrotrimero del resveratrolo (Langcake e Pryce, 1977);
- l' ε -viniferina, il deidrodimero ciclico del resveratrolo (Langcake e Pryce 1977a);
- la β -viniferina, il tetrametro ciclico del resveratrolo (Langcake e Pryce 1997a);
- le γ -viniferine, che costituiscono gli oligomeri del resveratrolo ad alto peso molecolare (Langcake e Pryce 1997a);
- il trimero gnetina H, il tetrastilbene *r*-viniferina (Mattivi e Reniero, 1992), 1a *r*-2-viniferina (Korhammer *et al.*, 1995) e due oligomeri l'ampelopsina e il suo dimero, l'opeafenolo, in cui il doppio legame non aromatico è stato perso a causa della formazione di un anello a 7 membri, caratterizzati ed isolati dalle radici di vite (Reniero *et al.*, 1996);

- tre oligomeri, rispettivamente di 3, 4 e 7 unità di resveratrolo (Mattivi *et al.*, 1996);
- due glucosidi di dimeri stilbenici (deidrodimero 11-O- β -D-glucopiranoside e il deidrodimero 11'-O- β -D-glucopiranoside), isolati da colture cellulari di *V. vinifera* (Waffo-Teguo *et al.*, 2001);
- la δ -viniferina, un isomero della ϵ -viniferina, identificata in foglie di piante di vite stressate (Pezet *et al.*, 2003);
- il deidrodimero *trans*- λ -viniferina, un isomero di ϵ - ed δ -viniferina, l'ultimo composto identificato, in foglie di vite infettate con *P. viticola* (Jean-Denis *et al.*, 2006).

1.1.8 LA BIOSINTESI DEGLI STILBENI

La biosintesi degli stilbeni segue la via del metabolismo dei fenilpropanoidi, che fornisce il *p*-coumaroil-CoA per la condensazione, operata dalla stilbene sintasi (StSy), con tre unità di acetato, che derivano dal malonil-CoA. Da tale reazione si ha il rilascio di 4 molecole di CO₂ e la formazione di resveratrolo.

Il *p*-coumaroil-CoA è un metabolita chiave in questo “*pathway*” di sintesi in quanto substrato anche della calcione sintasi (CHS), che con la medesima reazione di condensazione porta al rilascio di 3 molecole di CO₂ e alla formazione di narigerin calcione e quindi di antocianine (Sparvoli *et al.*, 1994) (Figura 3).

Il fatto che StSy e CHS agiscano sul medesimo substrato giustifica un'omologia di sequenza del 70-75% tra le due proteine, un comune introne in una regione conservata e una cisteina conservata, essenziale per l'attività di entrambi gli enzimi (Schroder *et al.*, 1988; Lanz *et al.*, 1991). L'analisi della relazione filogenetica tra StSy e CHS è stata oggetto di molti lavori, spesso in contrasto tra loro. Se in un lavoro in *Pinus sylvestris* è emerso come due StSy abbiano un'omologia di sequenza rispetto alle CHS più alta di quella nei confronti di StSy di altre piante (Fliegmann *et al.*, 1992), nello studio filogenetico condotto da Goodwin *et al.* (2000) in molte specie vegetali è emerso come StSy e CHS appartengano ad alberi indipendenti.

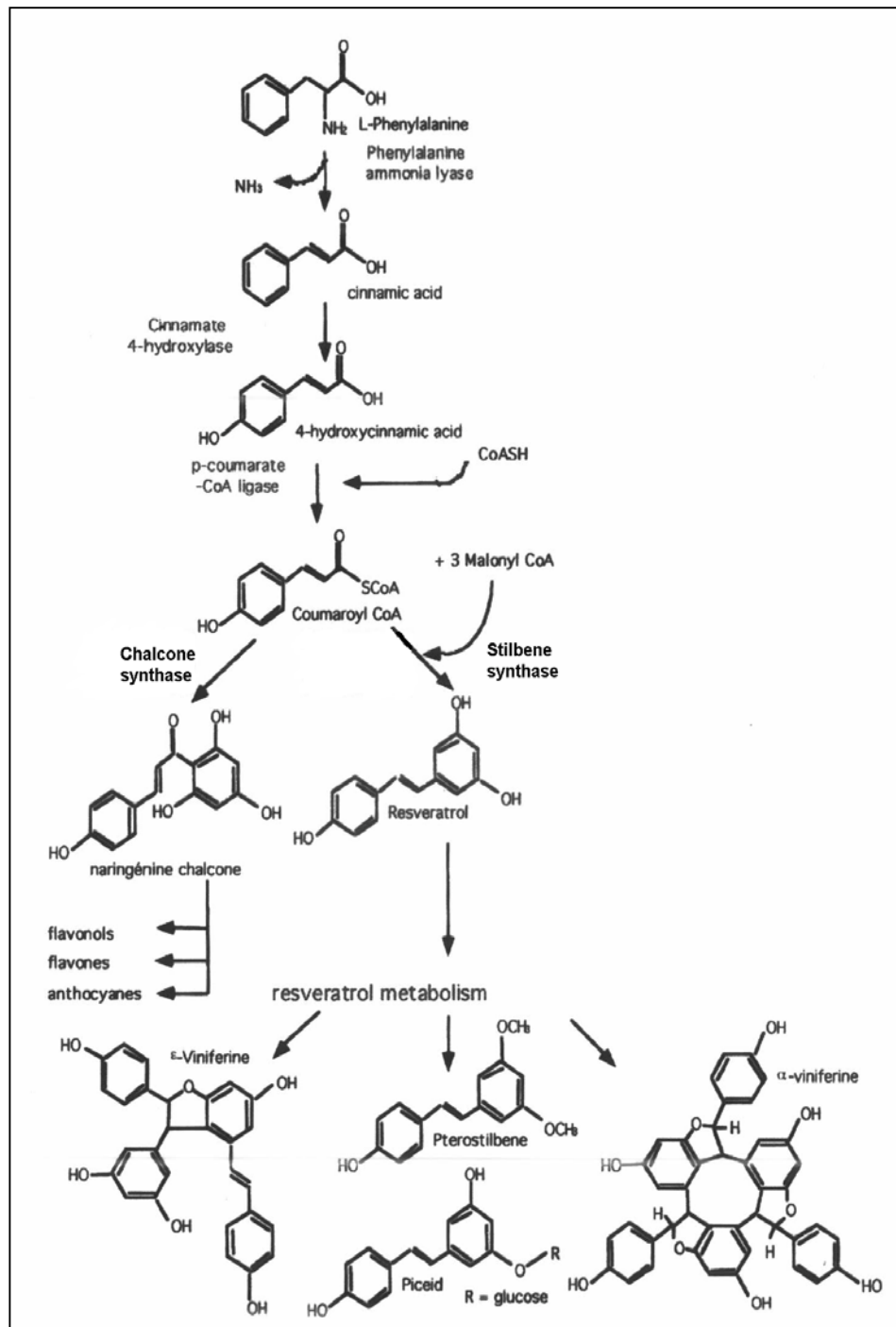


Figura 3 Pathway biosintetico degli stilbeni

I meccanismi di biosintesi di molti derivati monomerici del resveratrolo e la loro regolazione non sono ancora noti, sebbene ipotizzati (Pezet *et al.*, 2004a).

È noto invece che l'ossidazione del resveratrolo a viniferine in vite è controllata da tre isoenzimi perossidasi: A1, di natura acida, e B3, di natura basica, localizzati entrambi nella parete cellulare e nell'apoplasto, e da B5, di natura fortemente basica e localizzato nel

vacuolo (Zapata *et al.*, 1992). I tre isoenzimi sembrano essere legati a meccanismi di difesa, sia costitutivi che inducibili in seguito all'attacco di patogeni fungini (Zapata *et al.*, 1992).

In figura 4 sono riportate le strutture chimiche dei principali derivati del resveratrolo, con indicati i meccanismi enzimatici alla base della loro sintesi.

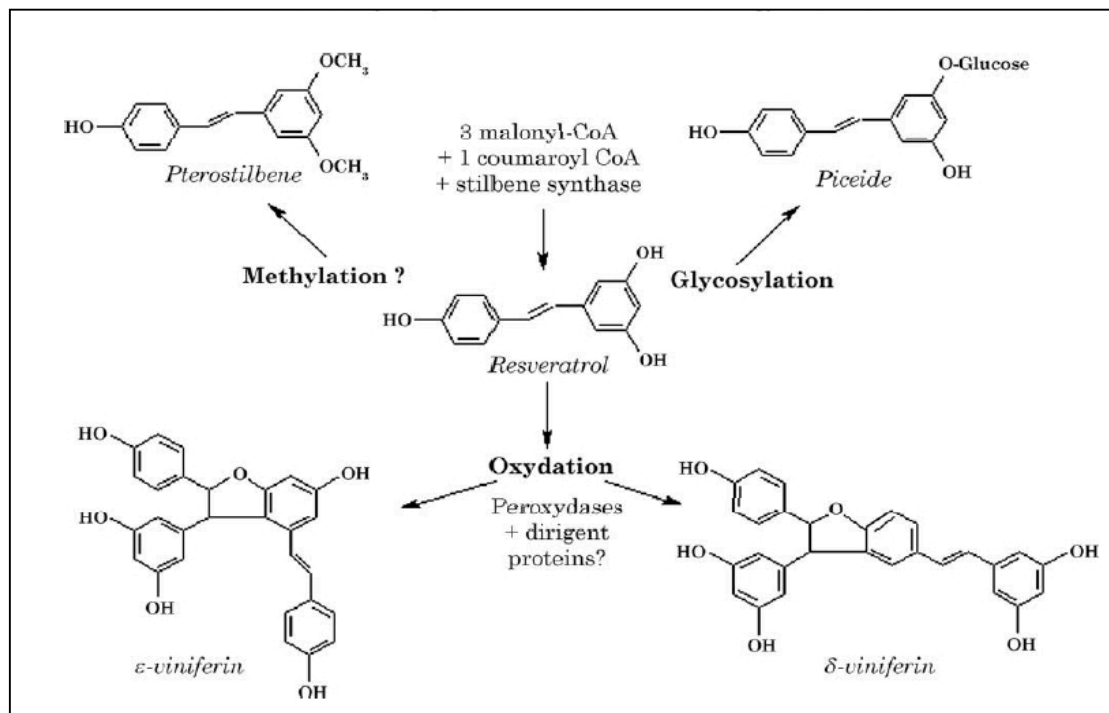


Figura 4 Strutture chimiche ed enzimi di sintesi del resveratrolo e dei principali suoi derivati ? = meccanismo enzimatico non ancora completamente caratterizzato (Pezet *et al.*, 2004)

1.1.9 GENI DI VITE CODIFICANTI PER LA STILBENE SINTASI E REGOLAZIONE DELLA LORO ESPRESSIONE

Le stilbene sintasi, analogamente alle fenilalanina ammonio liasi, sono codificate da una famiglia multigenica in *V. vinifera* L. (Sparvoli *et al.*, 1994).

Esiste una serie di lavori riguardanti l'identificazione dei vari membri di questa famiglia genica. Quattro geni codificanti per StSy (*pSV21*, *pSV25*, *pSV696*, *pSV368*) sono stati inizialmente isolati da una libreria a cDNA, ottenuta da sospensioni cellulari di *V. vinifera* cv. Optima (Melchior e Kindl, 1991).

Da una libreria genomica di *V. vinifera* cv. Optima è stato poi isolato un frammento genomico di 13 Kb contenente due geni completi (*Vst1* e *Vst2*) all'estremità 3' e la porzione di un terzo gene (*Vst3*) in direzione opposta rispetto agli altri due. Da analisi di sequenza a livello nucleotidico ed amminoacidico, è emerso che la sequenza promotrice presenta delle marcate

differenze tra *Vst1* e *Vst2*, facendo presupporre una diversa regolazione a livello trascrizionale e che la sequenza amminoacidica di *Vst1* (392 aa), *Vst2* (392 aa) e di *Vst3* (296 aa) presenta poche sostituzioni, ma molto conservate (Wiese *et al.*, 1994).

Nel lavoro di Goodwin *et al.* (2000) è stata isolata una nuova stilbene sintasi da *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpelier.

Infine in un recente lavoro di caratterizzazione dei geni codificanti stilbene sintasi in 4 varietà di *Vitis* spp. dopo interazione con *P.viticola*, è emerso che la vite ha 3 singole copie geniche codificanti per la CHS e circa 25 singole copie geniche codificanti per la StSy, di cui 3 finora non identificate. Tale lavoro rappresenta il punto di partenza per la caratterizzazione trascrizionale dei vari membri della famiglia in diverse varietà di *Vitis* spp. in risposta a stress biotici e abiotici (Richter *et al.*, 2006).

Sebbene infatti sia stata riportata un'espressione costitutiva del gene per la StSy (Sparvoli *et al.*, 1994), la sua espressione è spesso regolata da stress biotici, evento che giustifica una delle principali funzioni degli stilbeni come composti antimicrobici.

Esperimenti di delezione di porzioni dell'estremità 5' del promotore del gene *Vst1*, condotti in piante transgeniche di tabacco, hanno infatti evidenziato l'esistenza di una regione responsabile della risposta all'ozono (tra -430 pb e -280 pb dal codone di inizio della trascrizione), di una regione di risposta ai patogeni (tra -280 pb e -140 pb dal codone di inizio della trascrizione) (Schubert *et al.*, 1997) e di una regione minima di risposta all'etilene (tra -280 pb e -40 pb dal codone di inizio della trascrizione) (Grimming *et al.*, 2002).

Numerosi lavori hanno evidenziato inoltre l'espressione differenziale, temporalmente regolata, dei diversi membri della famiglia genica delle stilbene sintasi.

In colture cellulari di *V. vinifera* cv. Optima, trattate con *Phytophthora cambivora*, l'mRNA della StSy si accumula a 6 h e a 20 h dal trattamento (Melchior e Kindl, 2001).

I due picchi nell'espressione dei geni per la StSy, diversi temporalmente, corrispondono all'espressione di due diversi gruppi di geni codificanti per l'enzima, sulla base dei ritrovamenti a livello di sequenza nucleotidica: quelli espressi presto (*Vst1*), ma con rapida degradazione delle molecole di mRNA prodotte, e quelli espressi più tardi e attivati lentamente (*Vst2*), ma con trascritti più stabili (Wiese *et al.*, 1994).

Due picchi nel profilo di mRNA della StSy sono stati descritti anche in foglie di piante cresciute *in vitro* di *V. vinifera* e trattate con raggi UV (Borie *et al.*, 2004), come recentemente in piante transgeniche di frumento in cui sono stati inseriti i geni completi *Vst1* e *Vst2* dopo elicitazione con fattori abiotici e biotici (Serazetdinova *et al.*, 2005).

Risultati simili sono stati ottenuti anche in un'analisi di espressione genica in cultivar resistenti e suscettibili di *Vitis* spp. inoculate con *U. necator*. Essi hanno evidenziato che il gene codificante la StSy1 (S63225) viene indotto a 12 h e represso a 48 h dopo infezione nella cultivar suscettibile (Qiu W., *personal communication*).

1.1.10 RUOLO DEGLI STILBENI COME FITOALESSINE

La sintesi degli stilbeni in vite è costitutiva solo in alcuni organi della pianta.

Trans-resveratrolo ed ϵ -viniferina sono infatti presenti negli steli lignificati e nello xilema, dove sembrano essere coinvolti nel meccanismo di resistenza del legno alla decomposizione (Hart e Shrimpton, 1979), e nei vinaccioli (Bavaresco *et al.*, 1999), mentre *trans*- e *cis*- resveratrolo nei semi. Inoltre *trans*-resveratrolo, *trans*-piceide, ϵ -viniferina, ampelosina, opofenolo, gnetina H, r-viniferina e r-2-viniferina sono state isolate dalle radici (Mattivi e Reniero, 1992).

In altri organi della pianta, come le foglie e la bacca, gli stilbeni vengono indotti, come già evidenziato, per lo più in seguito a stress biotici, comportandosi come fitoalessine.

Le fitoalessine sono metaboliti secondari a basso peso molecolare che manifestano attività biologiche nei confronti di un ampio spettro di patogeni e si accumulano negli organi e tessuti vegetali invasi dai patogeni, in concentrazioni sufficientemente alte da inibire la crescita *in vivo* del patogeno. L'accumulo di tali composti in pianta deve essere rapido e la variazione nella concentrazione degli stessi è responsabile delle variazioni nella suscettibilità (Hart, 1981).

La prima descrizione della presenza di resveratrolo in foglie di *V. vinifera* dopo infezione con *B. cinerea* o trattamento con raggi UV, ma non in seguito a ferita, è stata fatta da Langcake e Pryce: la sintesi di questa fitoalessina tuttavia non è una risposta specifica, dal momento che viene registrata anche dopo infezione con *P. viticola* ed *U. necator* (Langcake e Pryce, 1976, Langcake e Lovell, 1980). Esistono numerosi lavori infatti in cui si descrive la correlazione tra la produzione di stilbeni in *Vitis* spp. dopo infezione con *B. cinerea* e *P. viticola* e la resistenza a tali patogeni (Pool *et al.*, 1981, Langcake, 1981, Stein e Hoss, 1984).

Anche il trasferimento dei geni di vite, codificanti la stilbene sintasi, in piante che non sintetizzano stilbeni, ha permesso di chiarire il ruolo di questi composti nella difesa a patogeni fungini. I geni completi *Vst1* e *Vst2* di *V. vinifera* cv. Optima sono utilizzati per la generazione di piante transgeniche di tabacco (Hain *et al.*, 1990), pomodoro (Thomzik *et al.*, 1993), riso (Stark-Lorenzen *et al.*, 1997), orzo e frumento (Serazetdinova *et al.*, 2005), melo (Szankowski *et al.*, 2003), papaia (Zhu *et al.*, 2004) e kiwi (Kobayashi *et al.*, 2000) e in tutti i casi, eccetto il kiwi, si è verificata la presenza del transgene dopo trattamento con patogeni fungini o dopo

esposizione ad UV. I geni di vite sono quindi inducibili e l'incremento della resistenza può essere dovuto alla capacità della pianta, dopo espressione del gene della stilbene sintasi, di sintetizzare in breve fitoalessine (Hain *et al.*, 1993).

La fitotossicità degli stilbeni è legata alla capacità di alterare la morfologia fungina. Il trattamento di conidi di *B. cinerea* con dosi sub-letali o letali di resveratrolo o pterostilbene induce anomalie citologiche, come la formazione di tubi germinativi curvati, l'arresto della crescita dei tubi germinativi, la granulazione del citoplasma dei conidi, la distruzione delle membrane plasmatiche (Adrian *et al.*, 1997).

A livello ultrastrutturale, lo pterostilbene è in grado di indurre, in conidi dormienti di *B. cinerea*, modificazioni del sistema delle membrane endocellulari, causando in particolare la distruzione delle membrane del reticolo endoplasmico, nucleare e mitocondriale. Questi fenomeni sono associati all'arresto della respirazione, durante il quale il citoplasma si coagula in numerose vescicole e si assiste ad una completa disorganizzazione delle creste mitocondriali. La successiva distruzione della membrana plasmatica è associata alla morte dei conidi (Pezet e Pont, 1990).

I 4'-idrossistilbeni, tra cui il resveratrolo, inoltre, sono in grado di agire come agenti disaccoppianti nel trasporto elettronico e nella fosforilazione (Perez e Pont, 1995). A livello subcellulare, gli idrossistilbeni inibiscono alcune ATPasi fungine e inducono la dissociazione di proteine "chaperone" e "co-chaperone", associate frequentemente al citoscheletro (Kindl, 2000).

Esistono però risultati contraddittori derivanti da esperimenti condotti per studiare l'attività antifungina del resveratrolo, che hanno dato origine ad un dibattito reale riguardo al ruolo di tale stilbene come fitoalessina.

La prima analisi volta a testare l'attività inibitoria del resveratrolo sulla germinazione dei conidi dormienti di *B. cinerea* e di spore di *Cladosporium cucumerinum* ha evidenziato una bassa attività di tale composto, che potrebbe essere solo il precursore di composti a più alta tossicità (Langcake e Pryce, 1976). In realtà in questi primi studi sarebbero state utilizzate concentrazioni di resveratrolo al di sopra del suo punto di solubilità, per cui altre prove sono state eseguite per ovviare a tale problema, evidenziando l'esistenza di una reale inibizione da parte del resveratrolo della crescita radiale del micelio di *B. cinerea* e di *Phomopsis viticola* (Hoos e Blauch, 1990) e dell'inibizione della germinazione dei conidi di *B. cinerea* in coltura liquida (Adrian *et al.*, 1997).

GRADO DI TOSSICITÀ DEGLI STILBENI

Esistono numerosi lavori che dimostrano il diverso grado di tossicità degli stilbeni nei confronti di *P. viticola* (Langcake e Pryce, 1977, Pezet *et al.*, 2004a). Il resveratrolo di per sé non è un composto altamente tossico in virtù del suo carattere idrofilico (Dercks e Creay, 1989, Perez e Pont, 1995), così come il suo derivato glicosilato piceide, anche a concentrazioni superiori a 1mM (Pezet *et al.*, 2004b). La δ -viniferina, dimero ossidativo del resveratrolo, si è invece dimostrata cinque volte più tossica della ϵ -viniferina e può essere quindi considerata come un reale mediatore della resistenza a *P. viticola* (Pezet *et al.*, 2003 e 2004a). Anche lo pterostilbene, un derivato demetilato del resveratrolo, è cinque volte più attivo di quest'ultimo nell'inibire la germinazione dei conidi di *B. cinerea* (Langcake, 1981, Pezet e Pont, 1990, Adrian *et al.*, 1997), sebbene la sua concentrazione sia sempre molto bassa per essere un reale contribuente al meccanismo di resistenza (Pezet *et al.*, 2004a-b).

Andando a valutare il contenuto in stilbeni da 4 a 48 ore dall'infezione con *P. viticola* in diverse varietà di *V. vinifera*, da suscettibili a resistenti, si è visto come nelle suscettibili si ha una precoce produzione di resveratrolo, rapidamente glicosilato nel derivato non tossico piceide, mentre in quelle resistenti si verifica un rapido ma progressivo accumulo di resveratrolo, che viene dimerizzato, ad opera di specifiche perossidasi, in ϵ - e δ -viniferine (Pezet *et al.*, 2004b).

VARIABILITÀ NELLA PRODUZIONE DI FITOALESSINE

La variabilità nella produzione delle fitoalessine stilbeniche dipende dal genotipo, ma anche dai cambiamenti ambientali e dallo stadio di sviluppo della pianta (Barlass *et al.*, 1987).

Dercks e Creasy (1989), analizzando 17 varietà di *Vitis* spp. variabili nella resistenza a *P. viticola*, dimostrano una buona correlazione tra la resistenza al patogeno e la capacità di sintesi di resveratrolo ed ϵ -viniferina dopo trattamento UV. Le specie resistenti producono una quantità di resveratrolo cinque volte più alta di quella prodotta dalle specie suscettibili e la sintesi dipende anche dalla densità dell'inoculo (Dercks e Creasy, 1989, Sbaghi *et al.*, 1995).

L'età della foglia è uno dei fattori responsabili della variabilità nella sintesi di stilbeni, infatti le foglie più giovani, più suscettibili all'infezione fungina, avrebbero una minore capacità biosintetica di stilbeni rispetto alle foglie più vecchie meno suscettibili (Langcake e Pryce, 1976). Tuttavia la minor suscettibilità delle foglie più vecchie potrebbe essere dovuta alla progressiva chiusura degli stomi, che frena quindi l'infezione da parte del patogeno e conseguentemente non induce la sintesi di stilbeni (Stein e Blach, 1985).

Anche la capacità della bacca di sintetizzare stilbeni sembra essere sottoposta a forti cambiamenti nel corso dello sviluppo della bacca stessa. Studi preliminari hanno mostrato

come in *Vitis* spp. la sintesi di resveratrolo inducibile diminuiva dall'invasiatura alla maturazione in bacche irradiate con UV (Creasy e Coffee, 1988, Bais *et al.*, 2000), così come in bacche esposte a *B. cinerea* (Jeandet *et al.*, 1995b, Bavaresco *et al.*, 1997). Il calo delle biosintesi di resveratrolo nella bacca in maturazione darebbe una spiegazione all'aumento della suscettibilità della bacca ai patogeni fungini in questa precisa fase di sviluppo. La competizione, a livello di substrato, tra calcon sintasi e stilbene sintasi è stata suggerita come spiegazione enzimatica alla base del fenomeno (Jeandet *et al.*, 1995b). Tuttavia in un studio successivo Mattivi *et al.* (2000) hanno mostrato come il contenuto in stilbeni di due varietà di *V. vinifera* a bacca rossa aumentava da invasiatura a maturazione, senza evidenze di infezione da parte di *P. viticola*. In accordo con questo inaspettato ritrovamento Versari *et al.* (2001) hanno in seguito riportato come il contenuto in resveratrolo totale in bacche sane della varietà Corvina (*V. vinifera* L.) cresceva durante la maturazione.

1.1 GENOMICA FUNZIONALE

La genomica funzionale è la disciplina in cui vengono studiati e messi in atto gli approcci sperimentali volti a determinare la funzione dei geni ed è caratterizzata dall'utilizzo di sistemi ad alta resa e di metodologie su larga scala combinate con l'analisi computazionale e statistica dei risultati. Il termine “genomica funzionale” coniuga la parola genomica, coniata recentemente per descrivere la disciplina scientifica di mappatura, sequenziamento ed analisi dei genomi, con l'aggettivo “funzionale” ad indicare la transizione ad una successiva fase di determinazione della funzione dei geni presenti nel genoma di un organismo.

L'obiettivo ultimo della genomica funzionale è quindi quello di riempire il divario esistente tra sequenza genica e funzione biologica.

La strategia fondamentale, alla base di un approccio di genomica funzionale, consiste nell'espansione dell'investigazione biologica dallo studio di singoli geni o proteine allo studio, in maniera sistematica, di tutti i geni o proteine coinvolte in un determinato processo contemporaneamente (Hieter and Boguski, 1997).

1.1.11 RUOLO DELLA TRASCRITTOMICA NELLA GENOMICA FUNZIONALE

Un ruolo fondamentale nella determinazione e nell'annotazione della funzione genica è svolto dall'analisi di espressione genica o caratterizzazione trascrizionale di un determinato processo. Cambiamenti nella fisiologia di un organismo o di una cellula sono infatti accompagnati dalla modulazione nei profili di espressione, spesso coordinata, di geni appartenenti ad una singola

via metabolica o di segnalazione. Questa caratteristica può essere quindi il punto di partenza per fare delle ipotesi sulla funzione di geni ignoti.

Alcune tecniche classiche per l'analisi dell'espressione genica come il 'Northern Blot' (Alwine *et al.*, 1977) non risultano però adatte ad un approccio di genomica funzionale perché permettono l'analisi contemporanea di un numero limitato di geni.

Negli ultimi anni però, in base anche alle nuove necessità imposte dagli sviluppi nell'ambito della conoscenza dei genomi, è stata sviluppata una serie di nuove tecnologie capaci di analizzare un numero elevato di geni contemporaneamente, o addirittura di compiere analisi su scala genomica. Esse si possono suddividere in tecnologie basate sull'informazione di sequenza, sulla visualizzazione di frammenti di cDNA derivati dai trascritti e sull'ibridazione.

Le prime sono tecniche dispendiose e laboriose da realizzare, tra le quali il sequenziamento di EST è forse quella più conosciuta. Essa tuttavia non è nata per l'analisi dei profili trascrizionali, ma per la determinazione del livello di espressione dei geni sulla base della frequenza con cui le EST corrispondenti compaiono in una libreria a cDNA (Ewing *et al.*, 1999) o come punto di partenza per la produzione di "oligo-microarray".

Tra le tecniche basate sull'amplificazione e visualizzazione dei frammenti di cDNA derivati dai trascritti ritroviamo il Differential Display (Liang and Pardee, 1992) e l'AFLP-TP (Amplified Fragments Length Polymorphisms) (Breyne *et al.*, 2003). Il Differential Display è la prima tecnica, tra questa tipologia, ad essere stata sviluppata e risulta essere molto conveniente, anche in termini economici, per analizzare i profili di espressione anche di organismi di cui non è nota la sequenza genomica. Presenta però dei problemi legati alla scarsa riproducibilità tra diversi laboratori, risolti dalla tecnica AFLP-TP che utilizza delle condizioni di amplificazione più stringenti. Entrambe le tecniche non permettono però l'analisi veloce di un numero elevato di campioni.

Infine le tecnologie basate sull'ibridazione si distinguono in "macroarray" (Jordan, 1998) e "microarray" (Schena *et al.*, 1995, Lockhart *et al.*, 1996), nel primo caso su filtro, che consente di monitorare alcune migliaia di geni contemporaneamente, nell'altro caso su vetro, per l'analisi di interi genomi, a partire da quantità molto piccole di materiale di partenza.

Il "microarray" è sicuramente la tecnologia che negli ultimi anni ha avuto il maggiore successo (van Hal *et al.*, 2000), in quanto sia l'affidabilità che i costi la rendono una scelta adeguata per analisi di espressione genica su ampia scala, soprattutto in organismi già sequenziati per cui sono disponibili vetrini commerciali già pronti. D'altra parte le tecnologie basate sulla visualizzazione di frammenti derivati dai trascritti, soprattutto l'AFLP-TP, rivestono ancora un ruolo importante in organismi di cui non sono ancora disponibili le sequenze genomiche

complete. Tali caratteristiche fanno dell'AFLP-TP e del "microarray" le due principali alternative per la caratterizzazione trascrizionale su ampia scala.

1.1.12 AFLP-TP (Amplified Fragments Length Polymorphisms)

La tecnica AFLP è nata una decina di anni fa per la generazione di marcatori molecolari e si basa sull'amplificazione selettiva di frammenti di restrizione da un digerito totale di DNA genomico. La tecnica è stata poi applicata anche all'analisi degli mRNA per la determinazione dei profili trascrizionali (Bachem *et al.*, 1996) con il nome di cDNA-AFLP o AFLP-TP. Tale metodica si è dimostrata uno strumento efficiente per la determinazione quantitativa dei profili trascrizionali.

Il protocollo AFLP-TP può essere suddiviso in tre passaggi fondamentali:

- la restrizione del cDNA e la ligazione di adattatori a sequenza nota, complementari ai siti di restrizione;
- l'amplificazione pre-selettiva e selettiva di "set" di frammenti di restrizione: la prima viene ottenuta con degli oligonucleotidi "primer" complementari alle sequenze degli adattatori, la seconda estendendo la sequenza dei "primer" all'interno dei frammenti di restrizione, amplificando così solo quei frammenti in cui l'estensione dell'oligonucleotide corrisponde ai nucleotidi che fiancheggiano i siti di restrizione. L'utilizzo di basi selettive riduce il numero di frammenti visualizzati dopo corsa su gel di poliacrilammide, diminuendo la complessità dei profili osservati;
- l'analisi su gel di poliacrilammide dei frammenti amplificati.

L'introduzione di fasi di cattura con sfere magnetiche, intermedie alle reazioni di taglio, in modo da ottenere un unico frammento per trascritto, ha ridotto ulteriormente il numero di frammenti totali da analizzare ed è stato applicato con successo all'analisi quantitativa dei profili di trascrizione a livello genomico (Breyne *et al.*, 2003) (Figura 5).

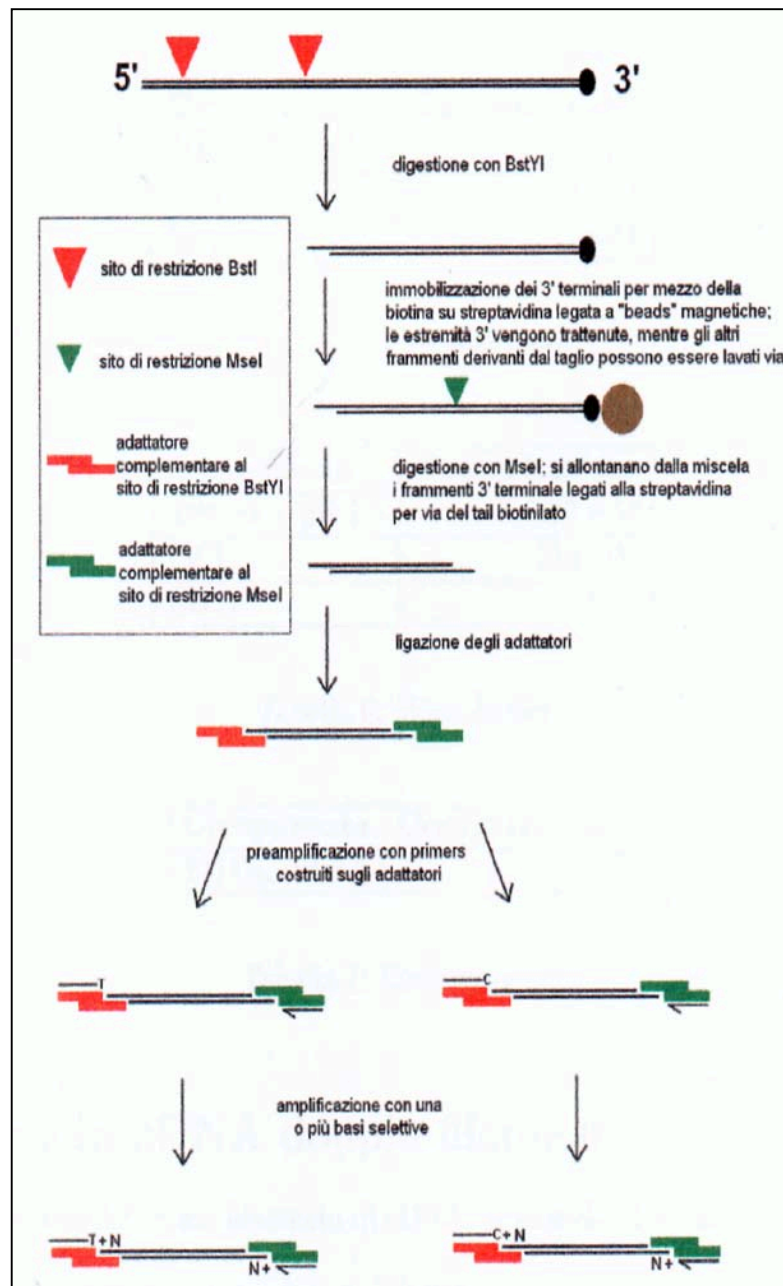


Figura 5 Schema della procedura cDNA-AFLP

1.1.13 "MICROARRAY"

La tecnologia "microarray", nata una decina di anni fa, è sicuramente la più diffusa tra le tecnologie di caratterizzazione dei profili trascrizionali attualmente in uso (van Hal *et al.*, 2000). Con l'utilizzo dei "microarray" i livelli di mRNA sono monitorati attraverso una reazione di ibridazione, definita "reverse-northern": frammenti di DNA o oligonucleotidi ("probe") ad

alta densità, corrispondenti ognuno a geni specifici, vengono immobilizzati su un supporto di vetro o silicio ed ibridati con popolazioni di molecole di mRNA marcati (“target”), isolate da campioni di interesse di cui si vuole determinare il profilo trascrizionale. La marcatura avviene tramite incorporazione di un nucleotide fluorescente in una reazione di retrotrascrizione. Il segnale di ibridazione, ottenuto per ogni “spot”, riflette, dopo quantificazione, il livello di ogni singolo trascritto all’interno della popolazione di mRNA presa in esame

Il principale progresso della tecnologia DNA “microarray”, comparata alle tecniche convenzionali, deriva dalle dimensioni ridotte dell’array”, che consente di ottenere sensibilità elevate, l’analisi in parallelo di un più ampio numero di geni e ha il vantaggio di richiedere quantità ridotte di materiale di partenza.

Sono stati sviluppati due diversi tipi di “microarray”, quelli a cDNA e quelli ad oligonucleotidi: i primi vengono prodotti depositando su vetrino dei prodotti di amplificazione di cloni derivanti ad esempio da librerie a cDNA, i secondi invece vengono prodotti disegnando sonde con sequenza complementare a regioni uniche di interesse, di cui però è nota la sequenza (Reymond, 2001).

“Microarray” ad oligonucleotidi sono quelli commercializzati da Affymetrix, Operon e Combimatrix. In particolare la ditta Combimatrix (www.combimatrix.com) attualmente vende vetrini di tre densità, bassa (4 x 2.240 “spot”), media (12.000 “spot”) e alta (90.000 “spot”).

La tecnologia Combimatrix si basa sull’utilizzo di un semiconduttore “CMOS” per dirigere la sintesi di ciascun oligonucleotide in risposta ad comando digitale. In particolare ogni microelettrodo, in 94 µm di diametro, digitalmente stimolato, è in grado di scatenare una reazione elettrochimica necessaria alla sintesi dell’oligonucleotide. Alla metodologia di sintesi *in situ* basata su metodiche fotolitografiche, non flessibile e molto costosa, utilizzata per esempio da Affymetrix, si va affiancando una metodologia di sintesi basata su semiconduttori, flessibile e molto meno costosa, in quanto consente una progettazione personale e un riutilizzo, fino a dieci volte, del vetrino.

Inoltre un alto livello di specificità è ottenuto disegnando “probe” da 35-40 pb, mentre sensibilità e riproducibilità sono il risultato dell’utilizzo di “probe” multipli per ogni gene di interesse.

I “microarray” Combimatrix sono vetrini a singolo colore, per cui ogni “array” viene ibridato con un solo campione di “target” marcato. La marcatura dell’mRNA avviene tramite incorporazione di nucleotidi modificati con un gruppo aminico (ammino allyl UTP) a cui è possibile legare il fluoroforo (Cy5) con una reazione di accoppiamento chimico.

Dopo ibridazione l'array viene letto utilizzando un apparato di scansione dotato di laser per l'eccitazione dei fluorofori, che ha una risoluzione di 5-10 μm sufficiente a scandire "spot" di un diametro attorno ai 100 μm . Una volta acquisito il segnale per ogni "spot", i dati grezzi vengono pre-processati, eliminando gli "spot" di scarsa qualità.

In un passaggio successivo i dati subiscono un processo di normalizzazione per la rimozione degli errori che principalmente si distinguono in sperimentali e sistematici (Benes and Muckenthaler, 2003). Negli ultimi anni è stata sviluppata una serie di metodi per la normalizzazione, di cui i più comunemente utilizzati includono:

- *normalizzazione globale*, che utilizza tutti i geni presenti sull'array: l'assunzione di base di questo metodo è che la maggior parte dei geni presenti su vetrino non sia differenzialmente espressa. Esso è perciò valido nel caso di vetrini con un elevato numero di geni, di cui la maggior parte non selezionata sulla base di differenze di espressione tra i campioni in analisi (per esempio vetrini da 12.000 a 90.000 "spot" Combimatrix);
- *normalizzazione basata su geni costitutivi/invarianti*, che non presentano variazioni di espressione tra le condizioni prese in esame, e che utilizza quantità note di geni di controllo esogeni ("spikes"), aggiunti durante l'ibridazione. Questi due metodi sono utilizzabili con vetrini con un ridotto numero di geni o con vetrini "dedicati", ovvero generati a partire da geni selezionati sulla base di esperimenti precedenti, la maggior parte dei quali si presume essere differenzialmente espressa (per esempio vetrino 4 x 2.240 "spot" Combimatrix).

Di solito gli esperimenti "microarray" consistono di più replicati tecnici e biologici dello stesso esperimento, per cui sono stati sviluppati ulteriori metodi per normalizzare i segnali anche tra i diversi vetrini, correggendo eventuali difformità nella distribuzione dei segnali (Smyth and Speed, 2003).

Infine lo scopo ultimo dell'analisi "microarray", indipendente dal tipo di disegno sperimentale, è l'identificazione dei geni differenzialmente espressi tra una o più coppie di campioni analizzate.

Nei primi lavori basati sui "microarray" essi venivano identificati attraverso il metodo del "fold change", basato sulla selezione dei geni differenzialmente espressi in base ad una soglia fissata, come ad esempio di incremento o decremento di espressione di 2 volte. Tuttavia tale metodo non prevede un test statistico e non c'è un valore che indichi il livello di confidenza nella scelta di geni differenzialmente espressi o non.

Sebbene alcune delle variazioni tecniche possano essere rimosse attraverso la normalizzazione, la variazione biologica casuale e le variazioni fisiologiche che esistono tra un campione e un altro richiedono appropriati metodi statistici (Cui and Churchill, 2003).

Un metodo statistico sviluppato specificamente per “microarray” è l’analisi SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher *et al.*, 2001), che si basa su una serie di *t*-test modificati per trovare geni che presentano differenze nella loro espressione tra i campioni analizzati statisticamente significative.

1.1 GENOMA E GENOMICA FUNZIONALE IN VITE: STATO DELL’ARTE

Il genoma di vite è costituito da 475Mpb, le stesse dimensioni del genoma di riso e quattro volte quello di *Arabidopsis* e sarà ben presto disponibile alla comunità scientifica internazionale. Le sequenze espresse di *Vitis* spp. (trascrittoma) depositate in banche dati sono anch’esse numerose e sono state generate da diversi organi e tessuti di *Vitis* spp., in diversi stadi di sviluppo (Ablett *et al.*, 2000, Terrier *et al.*, 2001, Pacey-Miller *et al.*, 2003, Moser *et al.*, 2005). Attualmente sono depositate al “National Center for Biotechnology information” (NCBI) 316.756 EST (gennaio 2007) e al “TIGR Grape Gene Index” 191.616 EST (rilascio 5.0, 21 giugno 2006).

Il sequenziamento delle EST di *Vitis* spp. negli ultimi anni ha aumentato la disponibilità di sequenze di cDNA ed ha permesso la prima generazione di “microarray” pubblici (GeneChip® Affymetrix). Le EST costituiscono un’importante risorsa non solo per l’identificazione di nuovi geni, ma anche per analisi di espressione genica sia all’interno di *Vitis* spp. che di altre specie di piante con geni omologhi a quelli di vite (Terrier *et al.*, 2001, da Silva *et al.*, Moser *et al.*, 2005).

Numerosi esperimenti di trascrittomica condotti finora in vite hanno riguardato il processo di maturazione della bacca, che è stato studiato attraverso “differential screening” in *V. vinifera* cv. Schiraz (Davies and Robinson, 2000), tramite “AFLP-TP” in *V. vinifera* cv. Chardonnay (Venter *et al.*, 2001), con “microarray” a cDNA e ad oligonucleotidi in *V. vinifera* cv. Shiraz (Terrier *et al.*, 2005, Waters *et al.*, 2005) e in *V. vinifera* cv. Pinot noir (Affymetrix Vitis GeneChip®) (Pilati *et al.*, submitted).

Inoltre “microarray” a cDNA ad alta densità sono stati utilizzati anche per lo studio della dormienza in vite (Pacey-Miller *et al.*, 2003), mentre lo “screening” *in silico* di banche dati di EST ha permesso di identificare due monoterpene sintasi di *V. vinifera* coinvolte nella sintesi dei monoterpeni (Martin and Bohlmann, 2004).

Un approccio combinato di analisi su larga scala di profili trascrizionali (Vitis GeneChip® (Affymetrix) e metabolici è stato utilizzato in germogli di *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon per identificare geni e “pathway” metabolici, comuni e divergenti, nella risposta a stress idrico e salino (Cramer *et al.*, 2006).

Non esistono molti lavori di caratterizzazione trascrizionale su larga scala dell'interazione pianta-patogeno in vite, se non un recente lavoro con “microarray” ad oligonucleotidi (Vitis GeneChip®, Affymetrix) riguardante l'interazione compatibile tra *V. vinifera* ‘Carmenere’ e ‘Caberbet-Sauvignon’ e il cloestovirus-3, agente dell'arricciamento fogliare (Espinoza *et al.*, 2006).

Inoltre è in corso un lavoro riguardante l'analisi comparativa con GeneChip® Affymetrix dei cambiamenti trascrizionali in seguito ad infezione con *U. necator* in *V. vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ e in *V. aestivalis* ‘Norton’, rispettivamente suscettibile e resistente al patogeno (Fung *et al.*, 2007).

Non esiste nessun lavoro, pubblicato ad oggi, di caratterizzazione trascrizionale dopo infezione con *P. viticola* in *Vitis* spp. , sebbene ne esistano numerosi in *Arabidopsis* riguardo alla resistenza a patogeni fungini da utilizzare a confronto (Eulgem *et al.*, 2004, Schenk *et al.*, 2000, Bruggmann *et al.*, 2005, Michel *et al.*, 2006).

È in corso di produzione un lavoro, analogo e complementare al progetto di ricerca oggetto di questo lavoro di dottorato, sulla caratterizzazione dei cambiamenti trascrizionali dopo infezione con *P. viticola* in *V. vinifera* ‘Regent’, con lo scopo di individuare “set” di geni rispettivamente derivanti dalla pianta ospite e dal patogeno (Polverari *et al.*, 2007).

2 SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA

La maggior parte delle varietà di *Vitis vinifera* oggi coltivate è stata generata dall'incrocio non controllato tra viti addomesticate e viti selvatiche e tale processo è stato accompagnato da una graduale perdita dei tratti di resistenza ai patogeni portati dalla vite selvatica. Tra gli agenti causali di malattie che colpiscono foglie e grappoli della vite coltivata, uno dei principali è costituito da *Plasmopara viticola*, fungo biotrofico appartenente all'ordine degli oomiceti.

Ad oggi risultano tuttavia poco noti i meccanismi molecolari alla base della resistenza alle malattie nelle diverse specie di vite.

L'obiettivo principale di questo progetto di dottorato è stato quello di approfondire, mediante lo studio della modulazione dei profili trascrizionali e metabolici, i meccanismi alla base del processo di resistenza della vite a *P. viticola*, per identificare geni e metaboliti coinvolti in tale processo.

Lo studio è stato condotto su alcuni individui di una popolazione F_1 , derivante dall'incrocio tra Freiburg 993-60 (ibrido complesso di *V. vinifera*, *V. rupestris* e *V. lincecumii*) e la cultivar di *V. vinifera* 'Teroldego', rispettivamente parzialmente resistente e suscettibile a *P. viticola*.

L'obiettivo è stato perseguito tramite l'impiego di tecniche di caratterizzazione trascrizionale e metabolica su ampia scala, quali AFLP-TP e "microarray" da un lato ed HPLC-DAD-MS dall'altro.

La tecnica AFLP-TP è stata utilizzata per identificare ed isolare un gruppo di trascritti putativamente differenzialmente espressi in un'interazione incompatibile vite/*P. viticola*. Nell'analisi sono stati infatti monitorati i cambiamenti trascrizionali a 12, 24, 48, 96 ore dall'infezione fungina nelle foglie del parentale Freiburg, fonte della resistenza nell'incrocio, e dell'individuo F_1 21/66, caratterizzato da quasi totale resistenza al patogeno.

La successiva costruzione di "oligo-array" a tecnologia Combimatrix, a partire dalle sequenze dei trascritti isolati nell'analisi AFLP-TP, ha permesso di estendere rapidamente l'analisi trascrizionale ad individui suscettibili al patogeno, quali il parentale 'Teroldego' e l'individuo F_1 22/73.

L'analisi HPLC-DAD-MS, condotta parallelamente su 105 individui dell'incrocio, ha confermato l'accumulo di fitoalessine (stilbeni) dopo infezione fungina ed ha evidenziato una correlazione significativa tra la sintesi di stilbeni e la resistenza al patogeno fungino.

3 MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALE VEGETALE

La popolazione F_1 oggetto di studio é derivante da un incrocio, realizzato presso IASMA (Istituto Agrario di S.Michele all'Adige), tra Freiburg 993-60 (ibrido complesso di *Vitis vinifera*, *Vitis rupestris* e *Vitis lincecumii*), parzialmente resistente a *Plasmopara viticola*, e 'Teroldego' (cultivar di *V. vinifera*), suscettibile al patogeno. La progenie in campo è costituita da 255 individui.

Alcuni individui della popolazione di incrocio sono stati selezionati, replicati per talea ed organizzati per l'infezione artificiale con *P. viticola* secondo un preciso piano sperimentale in ogni annata:

1) nel **2005**:

- le talee radicate di 5 individui e del parentale Freiburg (3 repliche per genotipo) sono state destinate alla messa a punto di un metodo per la caratterizzazione del contenuto in stilbeni;
- le talee radicate di 105 individui e dei parentali sono state destinate alla caratterizzazione fenotipica (3 repliche biologiche per genotipo) ed alla caratterizzazione del contenuto in stilbeni (3 repliche biologiche per genotipo);
- altre talee del parentale Freiburg 993-60 e dell'individuo F_1 21/66 (filare/genotipo), sono state destinate all'analisi AFLP-TP, 1 replica biologica per genotipo per ogni tempo dall'infezione artificiale con *P. viticola* (12, 24, 48, 96 h) ed 1 replica per genotipo per il controllo con acqua (0h);

3) nel **2006**:

- le talee radicate di 89 individui e dei parentali sono state destinate alla caratterizzazione fenotipica;
- altre talee dell'individuo F_1 21/66, F_1 22/73 e del parentale 'Teroldego' sono state destinate all'analisi "microarray", 3 repliche biologiche per genotipo per ciascun tempo dall'infezione (12 e 96 h) e 3 repliche biologiche per genotipo per il controllo con acqua (0h).

Nel 2006 inoltre 17 individui della popolazione di incrocio sono stati selezionati direttamente in campo e destinati alla messa a punto di un metodo di isolamento di viniferine non ancora caratterizzate.

3.2 INFEZIONE ARTIFICIALE CON *P. VITICOLA* IN SERRA E IN CAMPO

L'inoculo di *P. viticola* utilizzato per l'infezione è stato prelevato da piante di *V. vinifera* cv. Pinot grigio, infettate circa 10 giorni prima ed indotte a sporulare mediante bagnatura e mantenimento ad un'umidità relativa prossima al 100%. La muffa bianca emersa dalla pagina inferiore delle foglie è stata spennellata in acqua bidistillata fredda (temperatura di 4°C) fino a raggiungere una concentrazione di circa $10^4/10^5$ conidi/ml.

L'infezione delle talee radicate in vaso è stata eseguita in cella climatica ad una temperatura di 24°C, spruzzando sulla pagina fogliare inferiore l'inoculo liquido freddo di *P. viticola* e mantenendo le piante sotto un telo di plastica, con umidificazione continua, per tutta la notte, per favorire l'infezione da parte del fungo.

L'infezione delle piante in campo è stata eseguita nel tardo pomeriggio selezionando, dove possibile, 3 germogli per pianta e spruzzando sulla pagina inferiore delle prime 10-12 foglie espanse l'inoculo liquido freddo di *P. viticola*. I germogli infettati sono stati coperti con sacchetti di plastica fino al mattino successivo, in modo da mantenere un'umidità elevata ed evitando il disseccamento dell'inoculo.

3.3 ANALISI FENOTIPICA

A 10 gg dall'infezione artificiale con *P. viticola* in cella climatica, le piante inoculate, destinate alla caratterizzazione fenotipica, sono state fatte sporulare, bagnandole e coprendole durante la notte con un telo.

Su tutte le foglie di ogni individuo è stata stimata la percentuale di area fogliare infetta, valutando la percentuale di sporulazione sulla pagina fogliare inferiore e la presenza di necrosi e di risposta ipersensibile sulla pagina superiore fogliare, in base ai criteri OEPP/EPPO (1997).

Sono stati poi calcolati la media e l'errore standard della percentuale di sporulazione sulla pagina inferiore di tutte le foglie di tutte le repliche di ogni individuo (% Sp $\pm$ SE).

3.4 ANALISI DEGLI STILBENI

3.4.1 CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE VEGETALE

Le foglie delle repliche inoculate con *P. viticola* (trattato) e spruzzate con acqua (controllo) in cella climatica, destinate alla messa a punto del metodo di caratterizzazione del contenuto in stilbeni, sono state campionate secondo il seguente disegno sperimentale:

- prelievo a 6 gg dall'infezione di tutte le foglie a partire dall'apice di 3 repliche biologiche per genotipo;
- prelievo a 0h, dopo trattamento con acqua bidistillata, della 3° foglia dall'apice di 3 repliche biologiche di ciascun genotipo;
- prelievo a 48h e a 6 gg dall'infezione della 3° foglia dall'apice di 3 repliche biologiche di ciascun genotipo per ogni tempo;

Le foglie sono state conservate a -80°C fino alla preparazione del campione per l'analisi HPLC-DAD-MS (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Mass Spectrometry).

La 3° foglia di ogni replica inoculata, destinate alla caratterizzazione degli stilbeni nella popolazione d'incrocio, sono state campionate insieme a 6 giorni dall'infezione con *P. viticola* e conservate a -80°C fino alla preparazione del campione per l'analisi HPLC-DAD-MS.

3.4.2 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER HPLC-DAD-MS

Nell'analisi HPLC è stata utilizzata acqua MilliQ, tutti gli altri solventi sono stati forniti da Carlo Erba e presentano un grado di purezza per HPLC.

Le foglie campionate e conservate a -80°C sono state macinate in azoto liquido e una quantità di macinato compresa tra 0,2-0,3 g è stata trasferita in una falcon da 50 ml. Al macinato sono stati aggiunti 40 ml di metanolo e 50 μl di una soluzione 200 mg/l di *trans*-4-idrossistilbene (standard interno) in etanolo assoluto, così da ottenere un estratto grezzo.

Lo standard interno è stato aggiunto per quantificare le perdite causate dai vari passaggi di lavorazione, in base a cui eventualmente correggere i dati.

L'estratto è stato centrifugato per 7 min a 6500 rpm. Il sopranatante è stato recuperato e filtrato su filtro PTFE da 0,45 μm (13 mm "syringe-tip filters", Millipore), trasferito in un

pallone da 50 ml e ridotto di volume fino a circa 0,5 ml utilizzando un evaporatore rotante Büchi RE 121 (*Büchi*).

L'estratto grezzo concentrato è stato purificato eseguendo un'estrazione in fase solida su cartuccia con resina di polistirene/divinilbenzene Isolute ENV+ 100 mg/3 ml (*International Sorbent Technology*), attivata con 2 ml di metanolo e 5 ml di acqua deionizzata.

Sopra la cartuccia è stata poi posizionata una siringa contenente una soluzione, ottenuta miscelando 40 ml di acqua deionizzata con l'estratto concentrato, che è stata fatta passare goccia a goccia attraverso la resina.

Terminato il caricamento del campione, la cartuccia è stata lavata con 5 ml di acqua deionizzata e poi eluita con circa 3 ml di acetato di etile. La frazione in acetato di etile è stata poi raccolta in un pallone e portata a secco con evaporatore rotante. Il residuo secco è stato poi risospeso in una soluzione di 250 µl di metanolo e 250 µl di acqua deionizzata, che è stata poi filtrata su filtro Millex-GV da 0,22 µm (syringe driven unit, *Millipore*) e raccolta in una vial LC prima dell'iniezione in HPLC.

3.4.3 STANDARD DI CORSA

Lo standard di *trans*-resveratrolo è stato fornito da *Sigma* e presenta un grado di purezza superiore al 98%.

Lo standard di *trans*-piceide è stato isolato da un estratto metanolico di radici essiccate di *Polygonum cuspidatum* e purificato applicando le seguenti tecniche:

- cromatografia *flash* su resina Isolute ENV+ (*International Sorbent Technology*);
- cromatografia *flash* su resina Isolute Flash-Si (*International Sorbent Technology*);
- HPLC preparativa a fase inversa su colonna Lichrospher 100 RP 18, 10 µm (*Merck*);
- cristallizzazione in acetato di etile con esano.

Lo standard presenta una purezza cromatografica per HPLC maggiore del 98% (Mattivi *et al.*, 1995).

Gli standard di *cis*-piceide e *cis*-resveratrolo sono stati ottenuti per fotoisomerizzazione dei rispettivi isomeri *trans* in seguito a esposizione a radiazione UV (Mattivi *et al.*, 1995).

Lo standard interno (*trans*-4-idrossistibene) è stato fornito da *Aldrich* e presenta un grado di purezza superiore al 98%.

3.4.4 ANALISI HPLC-DAD-MS

La caratterizzazione degli stilbeni nelle foglie infettate è stata condotta con il sistema HPLC Waters 2690 equipaggiato con un rivelatore UV-VIS Waters 996 DAD (*Waters Corp.*), uno spettrometro di massa quadrupolare con sistema di ionizzazione *elettrospray* (ESI) Micromass ZQ LC-MS (*Micromass*) ed un software Empower (*Waters Corp.*). La separazione è stata condotta utilizzando una colonna Zorbax (SB-Aq, 5µm, 2,1 mm x 150 mm, *Agilent Technologies*) e una precolonna Zorbax (SB-Aq, 5µm, 2,1 mm x 12,5 mm, *Agilent Technologies*).

La fase mobile utilizzata nella corsa cromatografia era costituita dall'1% di acido acetico in acqua (solvente A) e acetonitrile (solvente B). Prima di ogni analisi la colonna è stata equilibrata per 7 minuti con un flusso di 0,25 ml/min al 5% di B.

La separazione è stata condotta a 40°C in 27 minuti, nelle seguenti condizioni:

- gradiente lineare dal 5% al 70% di B in 25 min;
- gradiente lineare dal 70% al 95% di B in 0,1 mini;
- 95% di B per 2 minuti;
- gradiente lineare dal 95% al 5% di B in 0,1 min.

Il flusso utilizzato è stato di 0,25 ml/min e il volume di iniezione di 4 µl.

L'identificazione dei composti è stata eseguita in base al tempo di ritenzione in colonna, informazione desumibile dal cromatogramma UV-VIS, allo spettro UV-VIS e allo spettro di massa (MS).

Lo spettro UV-VIS è stato registrato da 220 a 400 nm, con rilevazione a 280 e 310 nm.

L'uscita del sistema HPLC è stata collegata inoltre all'interfaccia ESI dello spettrometro di massa attraverso uno *splitter* in grado di dividere il flusso secondo un rapporto 9:1 (90% scarico, 10% spettrometro).

Le condizioni operative dello spettrometro di massa sono state le seguenti:

- voltaggio del capillare =3000 V,
- voltaggio estrattore =6 V,
- temperatura della sorgente =105°C,
- temperatura di desolvatazione =200°C,
- flusso del gas (N₂) nel cono =30 l/h,
- flusso del gas di desolvatazione (N₂) =450 l/h.

Lo strumento ha operato in modalità SIM (Single Ion Monitoring) positiva (ES+) secondo i seguenti canali di acquisizione durante tutta la corsa cromatografica (da 0 a 30 min):

- SIM (single ion monitoring) a m/z 229, con voltaggio del cono (CV) di 25 V per la rilevazione di *trans* e *cis* resveratrolo;
- SIM a m/z 229, CV 40 V per la rilevazione di *trans* e *cis* piceide;
- SIM a m/z 245, CV 25 V per la rilevazione di *trans*-pterostilbene;
- SIM a m/z 455,3, CV 60 V per la rilevazione dei dimeri del resveratrolo;
- SIM a m/z 681, CV 70 V per la rilevazione trimeri del resveratrolo;
- SIM a m/z 907,2 CV 80 V per la rilevazione dei tetrametri del resveratrolo;
- Scansione a CV 25 V in un intervallo di m/z compreso tra 100 e 1500;
- Scansione a CV 40 V in un intervallo di m/z compreso tra 100 e 1500;
- Scansione a CV 80 V in un intervallo di m/z compreso tra 100 e 1500.

In seguito si è passati alla quantificazione dei composti in base al segnale UV-VIS e dello spettrometro di massa a seconda del tipo di composto.

La quantificazione del *trans*-resveratrolo è stata effettuata in base ad una curva di calibrazione a 7 punti, ottenuta iniettando 7 soluzioni di standard di *trans*-resveratrolo a concentrazione diversa, in un intervallo compreso tra 0,5 mg/l e 40 mg/l, e utilizzando il segnale dello spettrometro di massa in modalità SIM a m/z 229, con CV 25 V con un coefficiente di correlazione pari a 0,9998.

La quantificazione del *trans*-piceide è stata effettuata in base ad una curva di calibrazione a 7 punti, ottenuta iniettando 7 soluzioni di standard di *trans*-piceide a concentrazioni diverse, in un intervallo compreso tra 0,5 mg/l e 40 mg/l, e utilizzando il segnale dello spettrometro di massa in modalità SIM a m/z 229 con CV 40 V con un coefficiente di correlazione pari a 0,9998.

I limiti di rilevazione ($S/N > 3$) e di quantificazione ($S/N > 10$) a partire da 0,2 g di macinato fogliare sono stati:

- per *trans*-resveratrolo: LD= $7,34 \times 10^{-3} \mu\text{g/g fw}$; LQ= $0,025 \mu\text{g/g fw}$;
- per *trans*-piceide: LD= $2,3 \times 10^{-3} \mu\text{g/g fw}$; LQ= $7,7 \times 10^{-3} \mu\text{g/g fw}$;

Per il *trans*-resveratrolo è stata inoltre costruita una retta di taratura a 7 punti, in un intervallo compreso tra 0,5 mg/l e 40 mg/l, ottenuta in base al segnale del rilevatore UV-VIS a 310 nm, con un coefficiente di correlazione di 0,9977 (LD= $0,42 \times 10^{-3} \mu\text{g/g fw}$ e LQ= $1,37 \times 10^{-3} \mu\text{g/g fw}$). In base alla curva di calibrazione ottenuta sono stati poi quantificati le viniferine e lo pterostilbene.

La concentrazione di *trans*- ϵ -viniferina è stata espressa, in base al segnale UV-VIS a 310 nm, come concentrazione di *trans*-resveratrolo moltiplicata per un fattore 2, il numero di unità costitutive di resveratrolo per molecola.

Per quanto riguarda la δ -viniferina entrambi gli isomeri (*cis* e *trans*) vengono co-eluiti per cui essa viene quantificata come δ -viniferina totale (*trans*+*cis*- δ -viniferina). La quantificazione di *trans*+*cis*- δ -viniferina in base al segnale UV-VIS a 310 nm è stata espressa come concentrazione di *trans*-resveratrolo moltiplicata per un fattore 2, il numero di unità costitutive di resveratrolo per molecola.

Allo stesso modo è stato quantificato il *trans*-pterostilbene, la cui concentrazione è stata espressa come concentrazione di *trans*-resveratrolo.

La quantificazione dello standard interno, *trans*-4-idrossistilbene, è stata effettuata in base ad una curva di calibrazione a 7 punti, ottenuta iniettando 7 soluzioni di standard interno a concentrazioni diverse, in un intervallo compreso tra 0.5 mg/l e 40 mg/l, e utilizzando il segnale del rilevatore UV-VIS a 310 nm con un coefficiente di correlazione di 0,9976 (LD=1,35x10⁻³ µg/g fw e LQ=4,5 x10⁻³ µg/g fw).

Le concentrazioni di *trans*-resveratrolo, *trans*-piceide, *trans*-pterostilbene, *trans*- ϵ -viniferina e *trans*- δ -viniferina sono state quindi corrette in funzione della percentuale di recupero dello standard interno.

3.4.5 ANALISI STATISTICA DEI DATI FENOTIPICI E METABOLICI

Il test di normalità con il metodo di Kolmogorov-Smirnov applicato ai valori continui di percentuale di superficie fogliare sporulante (%Sp) e l'analisi di correlazione tra la % Sp e il contenuto in stilbeni (µg/g) sono stati eseguiti con il pacchetto di analisi statistica SPSS vs 11.01 (SPSS Inc., Chicago, USA).

3.5 MESSA A PUNTO DI UN METODO DI ISOLAMENTO DI VINIFERINE

Per la messa a punto del metodo sono state utilizzate le prime 10 foglie di 2-3 germogli di 17 individui, campionate a 6 giorni dall'infezione artificiale con *P. viticola* eseguita sulle piante in campo. Le foglie campionate da ciascun individuo sono state poi riunite per avere il maggior quantitativo possibile per l'estrazione in HPLC.

Nell'analisi è stata utilizzata acqua MilliQ, tutti gli altri solventi sono stati forniti da *Carlo Erba* e presentano un grado di purezza per HPLC.

3.5.1 ESTRAZIONE

Il materiale fogliare infettato con *P. viticola* è stato pesato, trasferito in un pallone da 5l, in cui sono stati aggiunti circa 4l di metanolo, e lasciato a macerare nel solvente per 2 giorni al buio, a temperatura ambiente e in atmosfera satura di azoto, in modo da evitare possibili reazioni di ossidazione. Dopo 2 gg il solvente è stato recuperato e ridotto ad un volume di 200 ml con evaporatore rotante. Anche il materiale fogliare è stato recuperato e sottoposto ad una seconda estrazione; in questo caso le foglie sono prima state macinate in metanolo e al macinato è stato aggiunto metanolo fino ad un volume di 500 ml. Il materiale è stato lasciato a macerare nel solvente per 1 giorno al buio, a temperatura ambiente e in atmosfera satura di azoto dopo di che il solvente è stato recuperato e il macinato è stato eliminato.

Al fine di valutare la quantità di stilbeni presenti e l'efficienza dell'estrazione, 5 ml di entrambi gli estratti sono stati prelevati, portati ad un volume di 0,5 ml (concentrato 10 volte) con evaporatore rotante, purificati su cartuccia Isolute ENV+ 100 mg/3ml (*International Sorbent Technology*) e preparati per l'analisi HPLC-DAD-MS secondo la stessa metodica preparativa utilizzata per la caratterizzazione degli stilbeni.

3.5.2 CROMATOGRAFIA “FLASH” SU RESINA “ISOLUTE ENV+” CON HPLC PREPARATIVO

La corsa cromatografica è stata condotta con HPLC preparativo “Shimadzu SCL-10 AVP”, equipaggiato con un rilevatore UV-VIS Shimadzu SPD-10 AVP, con pompe 8A e un “software Class VP” (*Shimadzu Corp.*).

Per la cromatografia *flash* sono stati utilizzati 20 g di resina di “polistirene/divinilbenzene ENV+ bulk isolute sorbent” (*International Sorbent Technology Ltd*), con dimensione dei granuli compresa tra 40-70 μm e dimensione media dei pori di 60 μm . La resina è stata impaccata con acqua in una colonna “Isolute SPE syringe column” (*IST Ltd*) da 150 ml, chiusa alle estremità con due dischi “Isolute spe accessories” (*IST Ltd*). La resina impaccata è stata poi attivata con 200 ml di metanolo e 300 ml di acqua.

Il sopranatante proveniente dalla prima estrazione (200 ml), dopo essere stato filtrato a pressione ridotta su filtro “Durapore” da 0,22 μm (*Millipore*), è stato mescolato a 10 g di resina

attivata e portato a secco con evaporatore rotante. La resina è stata risospesa in circa 50 ml di acqua, riunita alla resina rimasta nella colonna e reimpaccata con 200 ml di acqua.

La colonna è stata montata sul sistema HPLC, senza collegarla al rivelatore UV-VIS, ed eluita a temperatura ambiente, ad un flusso di 25 ml/min, con la seguente sequenza di solventi:

- 500 ml Acqua;
- 2 l Miscela pentano:diclorometano (2:1);
- 500 ml Acetato di etile;
- 500 ml Metanolo.

Le frazioni in pentano/diclorometano, acetato di etile e metanolo sono state portate a secco con evaporatore rotante, risospese in 50 ml di metanolo (concentrate 4 volte rispetto all'estratto) e iniettate in HPLC-DAD-MS per verificare la presenza di stilbeni. La frazione in acqua è stata invece iniettata tal quale.

3.5.3 CROMATOGRAFIA “FLASH” SU RESINA “TOYOPEARL HW 40 S” CON HPLC PREPARATIVO

Questa corsa cromatografica è stata eseguita con lo stesso sistema HPLC impiegato nella precedente cromatografia, utilizzando però 20 g di resina “Toyopearl HW 40 S” (*Tosoh Corp*). La resina è stata impaccata con acqua in una colonna “Isolute SPE syringe column” (*IST Ltd*) da 150 ml, chiusa alle estremità con due dischi “Isolute spe accessories” (*IST Ltd*).

La soluzione metanolica contenente gli stilbeni, proveniente dalla precedente cromatografia, è stata mescolata a 10 g di resina, precedentemente impaccata e portata a secco con evaporatore rotante.

La resina secca è stata risospesa in circa 50 ml di acqua e caricata in testa alla colonna; la colonna è stata reimpaccata con 200 ml di acqua.

La colonna è stata poi montata sul sistema HPLC, lavata con 500 ml di acqua ad un flusso di 10 ml/min e collegata, dopo lavaggio, al rivelatore DAD. Il cromatogramma UV-VIS è stato registrato a 280 nm.

La fase mobile utilizzata nella separazione cromatografica era costituita da acqua (solvente A) e da metanolo (solvente B).

La corsa cromatografica è stata eseguita a temperatura ambiente in 80 minuti, ad un flusso costante di 10 ml/min, nelle seguenti condizioni:

- gradiente lineare da 0% a 100% di solvente B in 60 minuti;
- 100% di solvente B fino ad 80 minuti.

Tutto il materiale eluito dalla colonna è stato raccolto in frazioni da 25 ml.

Tutte le frazioni raccolte sono state iniettate tal quali in HPLC-DAD-MS per verificarne il contenuto in stilbeni.

3.5.4 CROMATOGRAFIA SU COLONNA “DISCOVERY HS C18” CON HPLC PREPARATIVO

La separazione finale dei composti stilbenici è stata eseguita con HPLC preparativo (Shimadzu SCL-10 AVP), utilizzando una colonna “Discovery HS C18” (*Supelco*) di 250x50 mm, a granulometria di 10 µm, ed una pre-colonna “Pelliguard LC-18”. A protezione della colonna è stato montato, a monte della pre-colonna un filtro PEEK da 2 µm (*Gilson*).

La fase mobile utilizzata nella separazione cromatografica era costituita da acqua (solvente A) e da acetonitrile (solvente B).

Prima dell’analisi la colonna è stata lavata con 300 ml di acetonitrile e poi condizionata con 500 ml di acetonitrile al 25% in acqua.

Le frazioni contenenti stilbeni provenienti dalla precedente cromatografia sono state riunite, portate a secco e risospese in 50 ml di metanolo; 5 ml di questa soluzione sono stati iniettati in colonna e la corsa cromatografica è stata eseguita a temperatura ambiente, ad un flusso di 40 ml/min, con un gradiente lineare da 25% a 55% del solvente B in 60 minuti.

Tutto il materiale eluito in corrispondenza dei picchi è stato raccolto separatamente e iniettato tal quale in HPLC-DAD-MS per identificare i singoli composti.

3.6 ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DA TESSUTO FOGLIARE DI VITE

L’estrazione di RNA totale è stata condotta secondo il protocollo sviluppato da Moser *et al.* (2004), che permette di ottenere RNA di buona qualità da tessuti ricchi di metaboliti secondari e polisaccaridi che possono interferire nei processi di purificazione, nella quantificazione e nelle successive manipolazioni enzimatiche. Il metodo richiede l’utilizzo di un tampone di borato (pH alcalino) addizionato con adiuvanti ed una serie di precipitazioni selettive.

Ogni campione destinato all’analisi di espressione genica è stato macinato finemente in azoto liquido e la polvere è stata raccolta in una falcon da 50 ml, pre-raffreddata in azoto liquido e conservata a -80°C.

Sono stati distribuiti 0,4 g di polvere di ciascun campione in provette da 2 ml, a cui sono stati aggiunti 1,4 ml di tampone XT (Tabella 1), precedentemente riscaldato a 80°C. È stata quindi effettuata un'incubazione ad 80°C per 2 min in agitazione.

Il β -mercaptoetanolo presente nel tampone di estrazione XT protegge l'RNA dalla degradazione mediata dalle RNasi.

Tabella 1 Composizione del tampone XT

Componente	Concentrazione finale
sodio borato decaidrato	0,2 M
EDTA pH 8,0	0,03 M
SDS	1% (w/v)
sodio deossicolato	1% (w/v)
β -mercaptoetanolo	2% (v/v)
Spermidina	0,5% (w/v)
Igepal	1% (v/v)
PVP-4 (PM 40.000)	2% (w/v)
PH	9

Al termine dei 2 min di incubazione a 80°C è stato aggiunto 1 mg di proteinasi K per campione, allo scopo di digerire le proteine. I campioni sono quindi stati incubati per 1 h a 42°C in agitazione.

In seguito ai campioni sono stati aggiunti 135 μ l di una soluzione di KCl 2M, in modo tale da raggiungere una concentrazione finale di 160 mM. I campioni sono quindi stati mescolati e posti in ghiaccio per 45 min.

Allo scadere dei 45 min, i residui cellulari sono stati eliminati per precipitazione mediante una centrifugazione a 15.000 g per 15 min a 8°C.

Il sopranatante è stato quindi trasferito in una nuova provetta da 2 ml a cui sono stati aggiunti 375 μ l di una soluzione di LiCl 8 M (concentrazione finale 2 M) e 15 μ l di β -mercaptoetanolo, concentrazione finale pari a 1% (v/v). I campioni sono stati quindi incubati in ghiaccio a 4°C per tutta la notte.

L'RNA, precipitato durante la notte per azione del LiCl, è stato recuperato effettuando una centrifugazione a 15.000 g per 25 min a 8°C.

Il sopranatante è stato poi eliminato ed il pellet ottenuto è stato lavato con 1 ml di una soluzione pre-raffreddata di LiCl 2 M e centrifugato a 15.000 g per 15 min a 8°C. Questo passaggio è stato eseguito due volte in quanto dopo il primo lavaggio il pellet è ancora leggermente pigmentato.

Il "pellet" è stato disciolto a temperatura ambiente in 600 μ l di una soluzione 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5. È stato quindi aggiunto 1/10 del volume iniziale di una soluzione di potassio

acetato 2 M (KCH_3COO), pH 5,5. I campioni sono stati incubati in ghiaccio per 10 min. Il materiale insolubile, costituito principalmente da polisaccaridi, è stato eliminato mediante centrifugazione a 15.000 g per 15 min a 8°C. Il sopranatante, contenente l'RNA, è stato trasferito in nuove provette da 1,5 ml. L'RNA è stato precipitato aggiungendo 0,9 volumi di isopropanolo freddo, effettuando un'incubazione a -20°C per 1 h ed una successiva centrifugazione a 15.000 g per 25 min a 8°C.

Il "pellet" è stato lavato con 1 ml di etanolo 80% (v/v) e l'RNA è stato recuperato tramite centrifugazione a 15.000 g per 15 min a 8°C.

Il sopranatante è stato quindi eliminato e, dopo aver fatto evaporare l'etanolo, l'RNA è stato risospeso in 50 μl di H_2O DEPC e conservato a -80°C.

Tabella 2 Composizione dell' H_2O DEPC*

Componente	Volume
H_2O MilliQ	100ml
DEPC	100 μl

*Lasciare tutta la notte in agitazione ed autoclavare.

3.6.1 MISURA DELL'INTEGRITÀ, CONCENTRAZIONE E PUREZZA DELL'RNA ESTRATTO

L'integrità dell'RNA e la contaminazione di DNA genomico sono state valutate tramite una corsa elettroforetica su gel di agarosio per RNA all'1% (w/v) in tampone TAE 1X (Tabella 3), contenente etidio bromuro (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Su gel è stato caricato 1 μl di ogni campione di RNA, diluito in 8 μl di acqua e 1 μl di "Loading buffer" (Tabella 4). La corsa è stata effettuata per 30 minuti a 80 V costanti.

La qualità e la concentrazione dell'RNA sono state anche valutate tramite misure spettrofotometriche dei campioni con lo strumento "Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator" (Amersham Pharmacia Biotech), misurando l'assorbanza (A) a 230, 260, 280 nm. La concentrazione è stata determinata dalla misura dell'assorbanza a 260 nm secondo la formula:

$$\text{Concentrazione dell'RNA } (\mu\text{g}/\text{ml}) = 40 \times A_{260} \times \text{fattore di diluizione}$$

considerando che il valore di assorbanza uguale ad 1, misurata a 260 nm, corrisponde ad una concentrazione di RNA pari a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. I rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} indicano rispettivamente eventuali contaminazioni da proteine, polisaccaridi o polifenoli.

Tabella 3 Composizione del tampone TAE 1X

Componente	Concentrazione
Tris-Acetato, pH 8,0	40mM
EDTA	1mM

Tabella 4 Composizione del Loading Buffer

Componente	Concentrazione
blu di bromofenolo	0,05 % (w/v)
Saccarosio	40% (w/v)
EDTA pH 8.0	0,1M
sodio lauril solfato	0,5% (w/v)

3.7 ANALISI AFLP-TP

3.7.1 CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE VEGETALE

Quattro repliche di Freiburg 993-60 e dell'individuo F₁ 21/66 (filare/n°individuo) sono state infettate artificialmente con *P. viticola* in cella climatica. Inoltre una replica per individuo è stata tenuta come controllo, spruzzando acqua bidistillata sulla pagina fogliare inferiore.

Di ogni replica sono state campionate insieme la seconda e la terza foglia dall'apice, rispettivamente a 12, 24, 48, 96 hdi (ore dopo infezione). Come controllo (0 h) sono state prelevate la seconda e la terza foglia della replica spruzzata con acqua bidistillata.

Le foglie di ciascun campione sono state poste immediatamente in azoto liquido e conservate a -80°C prima di procedere all'estrazione dell'RNA totale secondo il protocollo descritto al paragrafo relativo.

3.7.2 SINTESI DI cDNA A DOPPIO FILAMENTO

La sintesi del cDNA destinato all'analisi AFLP-TP è stata ottenuta mediante un oligo-dT biotinilato, caratteristica fondamentale per gli sviluppi successivi.

Per eliminare tracce di DNA genomico, l'RNA totale è stato trattato con 1 volume di LiCl 4M, lasciandolo in incubazione per una notte a -20°C, a cui è seguita una centrifugazione a 12000 g per 30 min. Il "pellet" è stato poi lavato con 1 ml di etanolo 80% (v/v) e l'RNA è stato recuperato tramite centrifugazione a 15.000 g per 15 min a 8°C.

Dopo aver eliminato il sopranatante ed aver fatto evaporare l'etanolo, l'RNA è stato risospeso in 50 µl di H₂O DEPC.

SINTESI DEL PRIMO FILAMENTO DI cDNA

In un tubo da 1,5 ml è stata assemblata una miscela di reazione da 40 µl con i seguenti componenti :

- 10 µg RNA totale
- 1 µl oligo-dT₂₅-biotinilato (437ng/ µl-*Promega*)
- 4 µl H₂O DEPC
- 8 µl First Strand buffer 5X (Tabella 5)
- 4 µl 0,1 M DTT
- 2 µl dNTPs 10mM
- 1 µl Superscript III (200 U/ µl- *Invitrogen*)
- H₂O DEPC a 40 µl

e si è incubato 2 h a 50°C o alla T (°C) ottimale per la trascrittasi inversa.

Tabella 5 Composizione First Strand buffer 5X

Componente	Concentrazione
Tris HCl pH 8,3	250 mM
MgCl ₂	15 mM
KCl	375 mM

SINTESI DEL SECONDO FILAMENTO DI cDNA

In un tubo da 1,5 ml è stata assemblata una miscela di reazione da 160 µl con i seguenti reagenti:

- 16 µl Second strand buffer 10X (Tabella 6)
- 3 µl dNTPs 10mM
- 15 unità *E.coli* ligasi
- 50 unità *E.coli* polimerasi I
- 1,6 unità RNase-H
- H₂O DEPC a 160 µl

e si è incubato 1 h a 12°C and 1 h a 22°C.

Tabella 6 Composizione Second strand buffer 5X

Componente	Concentrazione
Tris-HAc, pH 8,3	18,8 mM
MgCl ₂	4,6 mM
DTT	3,8 mM
NAD ⁺	0,15 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM

La purificazione del cDNA a doppio filamento è stata eseguita mediante l'impiego del kit "Qiaquick PCR purification kit" (*Qiagen*) basato su colonnine contenenti resina in grado di legare il DNA. Questo kit serve per purificare frammenti di DNA a singolo o doppio filamento (nell'intervallo da 100 bp a 10 Kb) da nucleotidi, "primer", enzimi, sali che potrebbero interferire con le successive reazioni di legazione, taglio e sequenziamento. L'efficienza di adsorbimento del DNA alla resina dipende sia dal pH (se il pH è minore o uguale a 7,5 si ha un adsorbimento del 95%) che dalla concentrazione salina.

Al termine del protocollo il DNA è stato eluito dalla resina con 45 µl di acqua MilliQ sterile. L'eluizione con TE (Tabella 7) è da evitare, poiché l'EDTA, che agisce come chelante di ioni, può interferire negativamente con le successive reazioni enzimatiche che possono necessitare degli ioni quali cofattori.

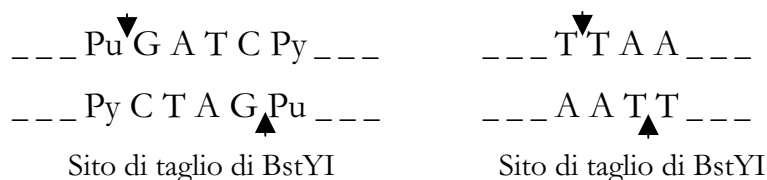
Per valutare la qualità della reazione di retrotrascrizione si è eseguita una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% di 10 µl di cDNA a doppio filamento e i campioni sono stati quantificati con uno spettrofotometro eseguendo la misura dell'assorbanza a 280 nm.

Tabella 7 Composizione del Buffer TE

Componente	Concentrazione
Tris HCl pH 8,0	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM

3.7.3 DIGESTIONE DEL cDNA

Il cDNA è stato digerito in due reazioni separate, usando prima l'enzima di restrizione BstYI , un "rare cutter" che riconosce sequenze di 6 pb e poi l'enzima di restrizione MseI, un "frequent cutter" che riconosce sequenze di 4 pb.



PRIMA DIGESTIONE

È stata eseguita assemblando una miscela di reazione in 40 µl con i seguenti reagenti:

- 20 µl cDNA (circa 200ng)
- 10 unità BstYI
- 4 µl RL-buffer 10X (Tabella 8)
- 2 µl DTT 0,1M
- H₂O MilliQ a 40 µl

e si è incubato 2 h a 60°C.

Tabella 8 Composizione RL-buffer 5X

Componente	Concentrazione
Tris-HAc pH 7,5	10mM
MgAc	10mM
KAc	50 mM
DTT	5 mM
BSA	50ng/µl

IMMOBILIZZAZIONE DEI FRAMMENTI DI cDNA ALL'ESTREMITÀ 3'BIOTINILATA

I frammenti di cDNA biotinilati all'estremità 3' sono stati separati da quelli non biotinilati attraverso legame a delle “Dynabeads” con ancorate delle molecole di streptavidina (*Dyna*). È stata eseguita la seguente procedura:

- 10 µl di “Dynabeads” sono state lavate con 100 µl di STEX 2X (Tabella 9) e risospese in 40 µl di STEX 2X (lo stesso volume della reazione di restrizione del cDNA);
- le sferette sono state aggiunte ai 40 µl di cDNA digerito con BstYI, per un volume totale di 80 µl (STEX 1X), pipettando durante l'operazione;
- la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti, agitando delicatamente;
- le “Dynabeads” sono state collezionate con un magnete, il sopranatante è stato eliminato e si è eseguito un lavaggio con 100 µl di STEX 1X;
- il lavaggio con 100 µl di STEX 1X è stato ripetuto quattro volte;
- le sferette sono poi risospese in 30 µl di TE (Tabella 7) e sono state trasferite in un nuovo tubo.

Tabella 9 Composizione STEX 1X

Componente	Concentrazione
NaCl	1000 mM
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM
Triton X-100, pH 8,0	0,1 %

SECONDA DIGESTIONE

È stata eseguita assemblando una miscela di reazione in 40 µl con i seguenti reagenti:

30 µl di sospensione con le “beads”

10 unità MseI

4µl RL-buffer 10X

2µl DTT 0.1M

H₂O MilliQ a 40 µl

e si è incubato 2 h a 37°C tenendo in leggera agitazione.

Con la seconda digestione sono stati liberati in soluzione i frammenti BstYI-MseI.

Infine le “Dynabeads” sono state recuperate ponendo le eppendorf su supporto magnetico e il sopranatante è stato trasferito in un nuovo tubo.

3.7.4 PREPARAZIONE E LIGAZIONE DEGLI ADATTATORI

La funzione degli adattatori è quella di costituire dei siti di “annealing” per i “primer”, consentendo reazioni di PCR ad elevata stringenza. Gli adattatori sono oligonucleotidi a doppio filamento non fosforilati, che sfruttano il gruppo fosfato, lasciato libero sul frammento dalla digestione enzimatica per potersi ligare correttamente. Vengono forniti come filamenti oligonucleotidici individuali e quindi devono essere fatti appaiare prima dell'utilizzo.

In due provette distinte da 200 µl sono quindi state miscelate uguali quantità di oligonucleotidi a singolo filamento, sia per la coppia BstYI-F e BstYI-R che per la coppia MseI-F e MseI-R. La miscela composta dai due filamenti complementari è stata posta a 95°C per 5 min. Terminata l'incubazione si è lasciato raffreddare lentamente, in modo da consentire l'appaiamento tra i filamenti e quindi la formazione dell'adattatore a doppio filamento.

L'adattatore per il sito di taglio BstYI è stato preparato alla concentrazione di 5 pmol/µl, mentre l'adattatore per MseI alla concentrazione di 50 pmol/µl.

Sequenza degli oligo utilizzati per la preparazione degli adattatori

BstYI-F: 5'- CTCGTAGACTGCGTAGT-3'

BstYI-R: 5'- GATCACTACGCAGTCTAC-3'

MseI-F: 5'- GACGATGAGTCCTGAG-3'

MseI-R: 5'- TACTCAGGACTCAT-3'

In seguito alla miscela contenente il cDNA digerito (40 µl) si è aggiunta una miscela di reazione costituita dai seguenti reagenti:

1 µl adattatore BstYI (5 pmol)

1 µl adattatore MseI (50 pmol)

1 µl dNTPs 10mM

0,5µl DTT 0.1M

1 µl "RL-buffer" 10X

1 unità T4 DNA ligasi

10 unità BstYI

H₂O MilliQ a 10 µl

e si è incubato 3 h a 37°C.

3.7.5 PRE-AMPLIFICAZIONE

Terminata la ligazione, i frammenti sono stati quindi pre-amplificati tramite PCR utilizzando un "primer" di sequenza complementare all'adattatore per il sito di taglio di MseI (MseI+0) e uno complementare all'adattatore per il sito di taglio di BstYI più una timina o una citosina all'estremità 3' (BstYI-T+0 e BstYI-C+0).

Tale amplificazione consente di compiere una prima selezione dei frammenti presenti nella miscela e per aumentare la concentrazione di quelli selezionati.

Per ogni reazione di pre-amplificazione è stata assemblata una miscela di reazione in 50 µl con i seguenti reagenti:

5,0 µl di template (la reazione di ligazione viene diluita due volte con TE)

1,5 µl "primer" BstYI-T+0 o BstYI-C+0 (50ng/µl)

1,5 µl "primer" MseI+0 (50ng/µl)

1,0 µl dNTPs10mM

1 unità Taq polimerasi

5 µl PCR-buffer 10X

H₂O milliQ a 50 µl

Ciclo termico:

94°Cx 30 sec

56°Cx 60 sec 25 cicli

72°Cx 60 sec

La reazione di pre-amplificazione è stata poi controllata con corsa su gel di agarosio all'1% (w/v).

Sequenze dei “primer” utilizzati nella reazione di pre-amplificazione:

BstYI-T+0: 5'- GACTGCGTAGTGATCT-3'

BstYI-C+0: 5'- GACTGCGTAGTGATCC-3'

MseI+0: 5'- GATGAGTCCTGAGTAA-3'

3.7.6 AMPLIFICAZIONE SELETTIVA

I prodotti della reazione di pre-amplificazione sono stati utilizzati come templati per una seconda reazione di amplificazione tramite PCR, utilizzando “primer” selettivi BstYI-T+N o BstYI-C+N combinato con un “primer” selettivo MseI+NN in cui N=A,T,C,G.

Tale amplificazione consente di ridurre il numero di frammenti da separare poi su gel di poliacrilammide.

Prima di procedere all'amplificazione selettiva, si è proceduto alla marcatura dei “primer forward” (BstYI-T+N/-C+N).

MARCATURA DEL “PRIMER FORWARD”

La marcatura dei “primer” avviene tramite fosforilazione con [33 P-γ-ATP] dell'estremità 5' del “primer” BstYI.

Per ciascuna marcatura è stata assemblata una reazione in 0,5 µl con i seguenti reagenti:

0,1 µl BstYI-T+N/-C+N (50ng/µl)

0,1 µl ³³P-γ-ATP (2000 Ci/mmol 50 pmol; *Amersham*)

0,05 µl T4-buffer 10X (Tabella 10)

0,2 U T4-chinasi

H₂O a 0,5 µl

e si è incubato 1 h a 37°C e in seguito 10 min a 80°C (inattivazione enzimatica).

Tabella 10 Composizione T4-buffer 10X

Componente	Concentrazione
Tris-HCl, pH 7,5	250 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	50 mM
Spermidina (3HCl form)	5 mM

REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE PER PCR

Per ogni reazione di amplificazione selettiva è stata assemblata una miscela di reazione in 20 µl con i seguenti reagenti:

5,0 µl di miscela di pre-amplificazione (diluizione 1:600)

0,5 µl “primer” marcato BstYI-T+N/-C+N

0,6 µl “primer” MseI+NN

0,4 µl dNTPs 10mM

2,0 µl PCR-buffer 10X

0,6 unità HotStartTaq DNA Polimerasi (*Qiagen*)

H₂O MilliQ a 20 µl

Ciclo termico:

95°C x 15 min

13 cicli 94°C x 30 sec

65°C x 30 sec calo di 0.7°C/ciclo

72°C x 1 min

23 cicli 94°C x 30 sec

56°C x 30 sec

72°C x 1 min

In totale sono state utilizzate 128 combinazioni di “primer” così ottenute:

64 combinazioni da: “primer” BstYI-T+N (x4) x “primer” MseI+NN (4x4)

64 combinazioni da: “primer” BstYI-C+N (x4) x “primer” MseI+NN (4x4)

3.7.7 CORSA ELETTROFORETICA SU GEL DI POLIACRILAMMIDE DEI PRODOTTI DI PCR SELETTIVA

Dopo amplificazione selettiva, i campioni sono stati analizzati su gel di poliacrilammide utilizzando acrilammide “Sequagel 6” (*National Diagnostic*).

Il prodotto “Sequagel 6” consta di due soluzioni:

- “SequaGel monomer”, contenente urea 7 M e una miscela di acrilammide e bisacrilammide (19:1 w/w) in acqua deionizzata;
- “SequaGel complete buffer”, contenente TBE 5X (Tabella 11) e TEMED in acqua deionizzata.

Per innescare la polimerizzazione è stato aggiunto APS 10 % . Il gel è stato colato tra i due vetri, separati da spaziatori laterali che determinano lo spessore del gel (400 μm), e collocato in posizione orizzontale per favorire lo scorrimento dell’acrilammide tra le due superfici. Il gel è stato lasciato polimerizzare per 1 h a temperatura ambiente e poi è stato montato verticalmente all’interno dell’apparato elettroforetico contenente il tampone di corsa TBE 1X (Tabella 11).

Al prodotto di amplificazione selettiva (20 μl) è stato aggiunto un ugual volume di “Formdye” (Tabella 12). I tubi contenenti la miscela, data dal prodotto di reazione più il colorante, sono stati denaturati a 95°C per 5 min, in modo da denaturare e concentrare il campione e posti successivamente in ghiaccio.

La corsa è stata impostata secondo i seguenti parametri:

tempo: 2h e 30 min

potenza: 115 W (costanti)

temperatura: 50°C

Finita la corsa si è proceduto al disassemblaggio dell’apparato elettroforetico, facendo attenzione che il gel di poliacrilammide rimanesse adeso al vetro idrofilico. Il gel è stato poi fatto aderire ad un foglio di carta Whatman 3MM, è stato coperto con pellicola trasparente ed è stato essiccato per 2h ad 80°C in un essiccatore (*Bio-Rad*).

Alla fine dell’essiccazione è stata tolta la pellicola e si è proceduto all’acquisizione del segnale per autoradiografia. Il gel è stato posto in una cassetta per autoradiografia con una lastra Kodak Biomax MR (*Sigma*) ed è stato lasciato in esposizione per 12-16 ore.

Tabella 11 Composizione del tampone TBE 1X

Componente	Concentrazione
Tris-borato	45 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM

Tabella 12 Composizione del tampone Formdye

Componente	Concentrazione
Formammide	98% (v/v)
Xylene cianolo	0,1% (v/v)
Blu di bromofenolo	0,1% (v/v)
EDTA 0.5 M	2% (v/v)

3.7.8 EXCISIONE DELLE BANDE DAL FILTRO ED AMPLIFICAZIONE DEL cDNA ELUITO

Per recuperare le bande dal gel di poliacrilammide essiccato su filtro di carta, il filtro è stato sovrapposto, nel modo più esatto possibile, alla lastra fotografica, grazie all'utilizzo di indicatori fluorescenti (GLOGOS® AUTORAD MARKERS (*Stratagene*), applicati agli angoli del filtro ed impressi anch'essi sulla lastra dopo emissione di fluorescenza.

Una volta individuate le bande d'interesse, la loro posizione è stata contrassegnata in modo preciso sulla lastra e si è proceduto alla loro excisione con l'uso di un bisturi.

Ogni banda è stata quindi posta in una provetta con 100 µl di TE (Tabella 7), a 4°C, per una notte, per consentire l'eluizione del DNA da gel.

Dopo l'eluizione è stata eseguita un'amplificazione tramite PCR. In ogni reazione sono stati utilizzati come templatò il frammento di cDNA eluito dal filtro e come combinazione di "primer" la stessa con cui il frammento era stato isolato nell'amplificazione selettiva.

È stata assemblata quindi una miscela di reazione in 50 µl con i seguenti reagenti:

- 5,0 µl di DNA eluito da banda
- 0,66 µl "primer" BstYI-T/-C+N (50 ng/µl)
- 0,6 µl "primer" MseI+NN (50 ng/µl)
- 0,4 µl dNTPs 10mM
- 2,0 µl PCR-buffer 10X
- 1 unità HotStartTaq DNA Polimerasi (*Qiagen*)
- H₂O milliQ a 50 µl

Ciclo termico:

95°C 15 min
35 cicli 94°C 40 sec
56°C 1 min
72°C 40 sec
72°C 5 min

Al termine della reazione, 5 µl del volume di ciascun campione sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1% (w/v) in tampone TAE 1X (Tabella 3). Il prodotto di PCR è stato poi quantificato tramite l'utilizzo del marcatore molecolare "MassRuler™ DNA Ladder Mix" (*Fermentas*).

Nel caso dopo corsa elettroforetica siano state visualizzate due bande, si è proceduto all'isolamento di ciascuna banda con il kit di eluizione di acidi nucleici Nucleospin® (*Macherey-Nagel*).

3.7.9 PURIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE

I prodotti di PCR sono stati purificati da dNTPs e "primer" con la miscela enzimatica ExoSAP-IT (*Amersham*) prima di essere sequenziati.

ExoSAP-IT è una miscela di esonucleasi I e fosfatasi alcalina di gamberetto, che permette l'eliminazione di nucleotidi ed oligonucleotidi che potrebbero interferire nella successiva reazione di sequenziamento.

Per ogni prodotto di PCR è stata quindi assemblata una reazione di purificazione in 6,5 µl:

5 µl di prodotto di PCR
1,5 µl ExoSAP-IT (*Amersham*)

e si è incubato 1h a 37°C e 15 min a 75°C (disattivazione enzimatica).

Dopo purificazione è stato prelevato un volume tale da ottenere una quantità di prodotto purificato 2X (2-4 ng/100 pb), a cui si è aggiunta una quantità di "primer" BstYI-T+N/-C+N 2X (6.4 pmol), come richiesto dal servizio di sequenziamento di DNA del C.R.I.B.I. (Università di Padova). I campioni sono quindi stati liofilizzati a 60°C e mandati a sequenziare. Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite con il metodo di Ranger, tramite l'uso di dideossinucleotidi (BigDye ®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, *Applied Biosystems*) e di

corse elettroforetiche su sequenziatori automatici a capillari come ABI3700XL e 3700 a 96 capillari, o ABI3100 a 16 capillari (*Applied Biosystems*).

3.7.10 RAGGRUPPAMENTO IN “CLUSTER” DEI FRAMMENTI DI cDNA-AFLP

Sulla base del loro profilo di espressione i frammenti di cDNA-AFLP, corrispondenti a trascritti putativamente differenzialmente espressi, sono stati raggruppati in gruppi di co-espressione.

Per questo scopo è stato effettuato un “clustering” gerarchico con il metodo “average-linkage cluster analysis”, con il “software” GENESIS (http://genome.tugraz.at/genesiscient/genesiscient_download.shtml), un programma versatile per l’analisi di dati, che include algoritmi per il “clustering”.

3.7.11 ANNOTAZIONE DELLE SEQUENZE

Gli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento sono stati processati utilizzando il programma Phred (Ewing *et al.*, 1998), per assegnare un valore di qualità ad ogni base, eliminando le regioni a bassa qualità.

Per avere il massimo dell’informazione riguardo alle sequenze, esse sono state allineate, attraverso il programma *blastn* della suite BLAST (Altschul *et al.*, 1997), con le sequenze consenso (TC), assemblate a partire da sequenze EST (E_xpressed S_equence T_ag), sia presenti nelle banche dati pubbliche GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) sia nella banca dati IASMA (<http://genomics.research.iasma.it>). Sono stati considerati significativi i risultati con valori di $E < 10^{-10}$ e identità $> 90\%$.

L’annotazione funzionale della sequenze è stata eseguita tramite ricerca di similarità di sequenza contro la banca dati di proteine a funzione note UniProt (www.ebi.uniprot.org) con il programma *blastx* della suite BLAST (Altschul, 1997). Sono stati considerati significativi i risultati con valori di $E < 10^{-6}$ e identità $> 40\%$.

In seguito, tramite l’utilizzo del programma “GoRetriver” sviluppato a IASMA, (Fontana *et al.*, 2006), alle sequenze sono stati assegnati automaticamente dei termini di Gene Ontology (GO) (www.geneontology.org). Il Gene Ontology fornisce un vocabolario strutturato e controllato che permette di descrivere un prodotto genico secondo tre diverse proprietà:

- funzione molecolare (*molecular_function*),

- processo biologico (*biological_process*),
- componente cellulare (*cellular_component*).

“GoRetriver” si avvale dei risultati di similarità dell’analisi *blastx* e dei termini GO associati alle sequenze “target” ed estrapola i termini GO più rilevanti associandoli ad ogni sequenza in esame.

I termini GO, relativi all’ontologia *biological_process*, sono stati rivisti manualmente, sostituendo o aggiungendo un nuovo termine GO, sulla base di evidenze sperimentali presenti in letteratura.

3.8 REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION (RT)-PCR

La metodica “Real-time RT-PCR” è una reazione di PCR altamente sensibile in cui l’accumulo del prodotto viene monitorato nel corso della reazione, permettendo studi quantitativi, assoluti o relativi. È quindi particolarmente adatta a studiare il profilo di espressione genica.

La tecnica di rivelamento più semplice consiste nel sintetizzare prodotti di PCR in presenza del colorante fluorescente SYBR Green® in grado di legarsi al solco minore del DNA a doppio filamento.

Sugli stessi campioni di RNA utilizzati nell’analisi AFLP-TP sono state quindi eseguite delle reazioni di “Real-time RT-PCR”, che hanno permesso di ottenere una quantificazione di tipo relativa dell’espressione dei geni di interesse.

3.8.1 TRATTAMENTO DNASICO

Prima di passare alla sintesi del cDNA a singolo filamento per la reazione di “Real-time RT-PCR”, i campioni di RNA sono stati purificati enzimaticamente da contaminazioni di DNA genomico per evitare di avere una quantificazione scorretta dell’RNA di partenza.

Per ogni campione è stata assemblata una miscela di reazione in 20 µl con i seguenti reagenti:

- 5 µg di RNA totale
- 2 µl di DNase I Amp Grade (*Invitrogen*)
- 2 µl di DNase Reaction Buffer 10X
- H₂O DEPC a 20 µl

e si è incubato per 10 min in ghiaccio.

In seguito si è aggiunto 1 µl di EDTA 25 mM e si è incubato per 10 min a 65°C per disattivare l’enzima.

3.8.2 SINTESI DEL PRIMO FILAMENTO DI cDNA

L'RNA totale di ogni campione trattato con DNasiI è stato retrotrascritto utilizzando l'enzima "SuperScriptTM III" (200 U/ μ l) (*Invitrogen*). La trascrittasi inversa "SuperScriptTM III" è un enzima modificato in modo tale da ridurre la sua attività RNasica ed aumentare la sua stabilità termica. L'enzima può essere quindi utilizzato per la sintesi di cDNA a temperature comprese tra i 45 e i 60°C, garantendo così un aumento di specificità, una miglior resa ed un maggior numero di prodotti "full-length" rispetto ad altre trascrittasi inverse. Dal momento che quest'enzima non è inibito in maniera significativa da rRNA e tRNA, si può partire dall'RNA totale per la sintesi del cDNA.

Per ogni campione di RNA totale, è stata assemblata una miscela di reazione in 13 μ l con i seguenti reagenti:

1 μ g di RNA trattato con Dnasi I

1 μ l di primer oligo(dT)₂₀ (50 μ M)

H₂O DEPC a 13 μ l

e si è incubato a 65°C per 5 minuti.

La miscela è stata quindi posta in ghiaccio per almeno 1 min e ad essa sono stati poi aggiunti i seguenti reagenti per un totale di 20 μ l:

4 μ l di First-Strand Buffer 5X

1 μ l di DTT 0,1 M

1 μ l di RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor (40 U/ μ l)

1 μ l di SuperScript III RT (200 U/ μ l)

Il tutto è stato mescolato gentilmente e incubato a 50°C per 60 minuti.

La reazione è stata quindi inattivata a 70°C per 15 minuti, raffreddando poi i campioni in ghiaccio.

Per eliminare le molecole di RNA in eccesso, ad ogni campione è stato poi aggiunto 1 μ l di *E.coli* RNase H (2 U/ μ l) (*Invitrogen*) e si è incubato a 37°C per 20 min.

3.8.3 AMPLIFICAZIONE DEL GENE DI ACTINA DI VITE

Il funzionamento corretto della reazione di sintesi del primo filamento di cDNA è stato verificato mediante amplificazione per PCR con la coppia di primer disegnati sulla sequenza codificante l'actina di *Vitis vinifera* (TC45156), utilizzando come template il cDNA sintetizzato:

Act-F: 5'-CATGCTATCCTTCGTCTTGAC-3'

Act-R: 5'-ATCAGGCAGCTCATAGTTCTTC-3'

Per ogni campione di cDNA è stata assemblata una miscela di reazione in 25 µl con i seguenti reagenti:

2,5 µl Hot Start Buffer 10X
0,5 µl dNTPs 10 mM
0,5 µl Act-F
0,5 µl Act-R
1 µl cDNA stampo
1U HotStartTaq DNA Polymerase (*Qiagen*)
H₂O MilliQ a 25 µl

Ciclo termico:

95°C 15 min
35 cicli 94°C 30 sec
58°C 30 sec
72°C 1 min
72°C 7 min

Al termine dell'amplificazione 5 µl di ciascun campione sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (w/v) in tampone TAE 1X (Tabella 3).

3.8.4 “REAL-TIME RT-PCR”

Ogni reazione di “Real-time RT-PCR” è stata condotta a partire dal cDNA a singolo filamento (diluizione 1:20) ed utilizzando “primer” specifici per i geni di interesse identificati in AFLP-TP. Inoltre è stata utilizzata la miscela di reazione Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (*Invitrogen*), che contiene la Platinum[®]Taq DNA Polymerase, il SYBR[®] Green I, Tris-HCl, KCl, MgCl₂ (6 mM), dNTPs (400 µM), DNA glicosilasi (UDG) e stabilizzatori.

I “primer” sono stati disegnati con il programma “Primer Express[®]v 2.0” (*Applied Biosystems*) secondo i seguenti parametri e condizioni:

- lunghezza dell'amplicone compresa tra 70 e 150 bp;
- T_m di 58-60°C per ciascun “primer”;

- lunghezza dei “primer” compresa tra 20 e 23 bp;
- i primi 5 nucleotidi all'estremità 3' di ogni “primer” con al massimo due guanine e/o citosine;
- evitare la formazione di strutture di appaiamento all'interno della sequenza di ciascun “primer” e tra le sequenze dei due “primer”

In Tabella 13 sono riportate le coppie di “primer” disegnate per le sequenze di interesse, corrispondenti ai frammenti di cDNA-AFLP:

Tabella 13: Sequenza dei “primer” usati negli esperimenti di “Real-time RT-PCR”, corrispondenti ai frammenti di cDNA-AFLP.

Frammento cDNA-AFLP	Descrizione	Sequenza "primer" (5'-3')	T annealing (°C)
BC2M11-309	Putative relA/spoT homologous protein RSH2	For-GTGTCTGATGAGTGGTGGTTT Rev-ATACATTCCATCACGACAAA	60
BT3M33-232	Putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase	For-CAGATGCTACAAGGACTCAAT Rev-AAAGTCCGAGCCCATTGTA	59
BC1M31-391	PVR3-like protein (Fragment)	For-GAGTGAGGATGATTTGATGACA Rev-GAGCAAAGGCAAGTCAAATCA	60
BT4M12-88	P-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase isoform 1	For-CAAAAGGATGGCTGTGGATA Rev-CCATTAGGGTCATCGAACATT	59
BT3M11-6/8	Hypothetical protein F3C22_140	For-CCATTGTCACCCCTTTCTTT Rev-CATCAAACACTACCCACACAAA	60
BC2M34-412	Putative ethylene response factor 5	For-CTCCAATCATCAGGCAACA Rev-CCATTCTTCACCGACTGTAA	59
BT3M12-10	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	For-TGGGCTACATTGCTCCTGAA Rev-CCTTTTCCCACCATTTCCA	59
BT1M13-32	NAC domain protein NAC1	For-GTTCACAAATAGAGGCTGGTT Rev-CCAAGGCACCATAAGCAATA	59
BT2M13-72	Putative nitrilase-associated protein	For-GGCAGAACTGTGGCAACTTTA Rev-CACAACAGCAAACAACCCAAA	60
BT3M34-239	Beta-1,3 glucanase precursor	For-GGCTATGTTTGATTCCACTGT Rev-GGCAAGTTGTCACCCCTCCATT	60
BC3M11-328	Putative WRKY4 regulation of transcription factor	For-CTTCCACCTTCTTCCACCTTA Rev-ATCCACACAATCTCCTCTCTTA	60
BT2M14-76	Flavonol synthase (Fragment)	For-CAGTGAGTGTTGAATGGATAA Rev-TCTCACGCAGCAACAAATAA	58
BC3M43-454	Flavonoid 3', 5'-hydroxylase-like protein	For-TAAGCGTAGAGAGCCGAGTT Rev-CGTCCCTCTGCATTCAATT	59
BT2M14-75	Putative bHLH regulation of transcription factor	For-CCTGGAATGAACTCTGCTTAT Rev-ATACATTTGGCATTGGAGACAT	60

Per l'amplificazione del gene costitutivo actina, usato come gene di riferimento, sono stati utilizzati i “primer” “ActinFor” e “ActinRev”, disegnati sul TC45156 di vite:

ActinFor: 5'-TCCTTGCCTTGCGTCATCTAT-3'

ActinRev: 5'-CACCAATCACTCTCCTGCTACAA-3'

Per ogni reazione di “Real-time RT-PCR” è stata preparata una miscela di reazione in un volume di 12,5 µl con i seguenti reagenti:

- 1 µl cDNA (diluizione 1:20)
- 0,25 µl “Primer” forward (10 µM)
- 0,25 µl “Primer” reverse (10 µM)
- 6,25 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG
- 0,25 µl ROX Reference Dye
- 4,5 µl H₂O MilliQ

La concentrazione finale di ciascun primer è pari a 200 nM e quella di MgCl₂ è pari a 3 mM. Ogni reazione è stata condotta in triplicato, utilizzando il 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*).

Ciclo termico

- 50°C 2 min
- 95°C 2 min
- 40 cicli 95°C 15 sec
- Ta °C 30 sec

in cui Ta corrisponde alla temperatura di “annealing” di ciascuna coppia di “primer”. Per ogni reazione è stato anche eseguito il protocollo di dissociazione al termine dei 40 cicli di amplificazione.

3.8.5 ANALISI DEI DATI DI “REAL-TIME RT-PCR”

Il valore di efficienza di amplificazione per ciascuna reazione è stato calcolato utilizzando il programma LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003), che si basa sulla linearizzazione della formula basilare per un’amplificazione di PCR esponenziale, ottenendo la seguente equazione:

$$\text{Log}(R_0) = \text{Log}(N_0) + \text{Log}(Eff) \times C$$

dove R_0 e C sono rispettivamente i dati delle misure di fluorescenza ed il numero dei cicli.

La parte lineare della curva del logaritmo in base 10 della fluorescenza in funzione del numero dei cicli è stata determinata scegliendo un limite inferiore ed un limite superiore di una finestra di linearità. Il $\text{Log}(N_0)$ ed il $\text{Log}(Eff)$ sono stati calcolati con un’analisi di regressione lineare: la concentrazione iniziale di templato in un campione è stata determinata in base al valore

dell'intercetta della linea di regressione lineare ($No = 10^{\text{intercetta}}$) ed è espressa in termini di fluorescenza di SYBR[®] Green I, invece l'efficienza della reazione di amplificazione in base alla pendenza della linea di regressione lineare ($Eff = 10^{\text{slope}}$).

Per evitare un'ambigua selezione dei dati puntuali all'interno della finestra di linearità, nel programma LinRegPCR è stato implementato un algoritmo iterativo per cercare linee costituite da 4 o al massimo 6 dati puntuali con i più alti valori di R^2 ed i valori di pendenza più vicini al valore massimo di pendenza.

Attraverso il programma ABI Prism 7000 SDS Software (*Applied Biosystems*) per ogni singola reazione è stato poi determinato anche il valore di C_t (*cycle threshold*), definito come il punto in cui la fluorescenza cresce in maniera apprezzabile al di sopra del rumore di fluorescenza.

La quantificazione relativa di un gene di interesse è stata quindi calcolata attraverso l'equazione di Pfaffl (Pfaffl, 2001), utilizzando il gene dell'actina come controllo interno e il campione trattato con acqua come calibratore, che rappresenta il livello di espressione 1X del gene di interesse:

$$\text{espressione relativa} = \frac{(Eff_{\text{gene}})^{\Delta Ct_{\text{gene}}(\text{calibratore-trattato})}}{(Eff_{\text{rif}})^{\Delta Ct_{\text{rif}}(\text{calibratore-trattato})}}$$

Eff_{gene} : l'efficienza della reazione di "Real-time RT-PCR" del gene di cui si vuole studiare l'espressione;

Eff_{rif} : l'efficienza della reazione di "Real-time RT-PCR" del gene riferimento (in questo caso l'actina);

ΔCt_{gene} : differenza tra il valore di Ct del campione calibratore e quello del campione trattato per il gene di interesse;

ΔCt_{rif} : differenza tra il valore di Ct del campione calibratore e di quello del campione trattato per il gene di riferimento (actina).

L'equazione di Pfaffl combina la quantificazione e la normalizzazione in un unico calcolo. I valori di Eff_{gene} e Eff_{rif} sono la media di 3 valori, dal momento che ciascuna reazione è stata realizzata in triplicato. Per lo stesso motivo ΔCt_{gene} e ΔCt_{rif} sono stati calcolati utilizzando i valori medi di Ct_{gene} del campione controllo e del campione trattato e di Ct_{rif} del campione controllo e del campione trattato.

Il calcolo dell'errore standard dei valori di espressione relativa si è basato sulla serie di Taylor sviluppata per il software REST[®] (Pfaffl *et al.*, 2002).

3.9 ANALISI MICROARRAY (CustomArray™ 4X2K - Combimatrix)

L'analisi "microarray" è stata condotta tramite 3 vetrini CustomArray™ 4x2K sintetizzati dalla ditta Combimatrix (CMBX) (www.combimatrix.com), mentre gli esperimenti di marcatura, ibridazione ed analisi dei dati sono stati condotti in casa.

Ogni vetrino, costituito da 4 "array" indipendenti, consta di 2240 posizioni ciascuna.

3.9.1 CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE VEGETALE

Sei repliche biologiche dell'individuo F₁ 21/66, del parentale 'Teroldego' e dell'individuo F₁ 22/73 sono state infettate artificialmente con *P. viticola* in cella climatica. Inoltre 3 repliche biologiche per individuo sono state spruzzate con acqua bidistillata sulla pagina fogliare inferiore.

Di ogni replica biologica infettata sono state campionate insieme la seconda e la terza foglia dall'apice, rispettivamente a 12 hdi (3 repliche) e 96 hdi (3 repliche) (trattati). Inoltre di ogni replica biologica spruzzata con acqua sono state prelevate la seconda e la terza foglia a 0 h (controllo).

Le foglie di ciascun campione sono state poste immediatamente in azoto liquido e conservate a -80°C prima di procedere all'estrazione dell'RNA totale secondo il protocollo descritto al paragrafo relativo.

3.9.2 DISEGNO DEI "PROBE" E DEL VETRINO

Prima di procedere all'ordine per la sintesi del vetrino CustomArray™4x2K® alla ditta Combimatrix, è stato necessario preparare un "file di input" .csv contenente tutte le informazioni necessarie per il disegno dei "probe" (nome della sequenza con le annotazioni ad essa associata, il numero di "probe" per sequenza ed il numero di repliche tecniche di ciascun "probe").

Nel caso di sequenze non orientate, sono state fornite sia le sequenze del filamento senso che antisenso, distinte assegnando un suffisso RC ("Reverse Complement") alla sequenza del filamento antisenso.

Inoltre durante la sottomissione del file .csv al "software CustomArray Content" (CMBX), è stato necessario indicare :

- il senso, se noto, delle sequenze di “input” su cui disegnare i “probe” (filamento “senso”), che verranno ibridati con il “target” (nel caso specifico con aRNA, la cui sequenza è identica al filamento “antisenso”);
- l'organismo di riferimento rispetto a cui confrontarsi per ottenere la massima specificità (*Vitis* spp.);
- la lunghezza dei “probe” (da 35 a 40 pb)

Il “software CMBX” esegue una serie di iterazioni in modo da disegnare “probe” gene specifici, partendo dal 3' di ogni sequenza e testando eventuali fenomeni di cross-ibridazione e formazione di strutture secondarie tra i “probe”.

In uscita dal programma è stato fornito un file **.csv** con tutte le informazioni relative ai “probe” disegnati. Dopo aver controllato la corrispondenza tra i “probe” e le sequenze fornite e i parametri ad essi associati, è stato effettuato l'ordine del vetrino CustomArray™4x2K attraverso la suite “CustomArray Content” (CMBX).

Terminata la sintesi del vetrino è stato scaricato un file **.xlm** con le informazioni riguardo al disegno del vetrino, necessarie per le successive analisi in Microarray Imager™ (CMBX).

3.9.3 MARCATURA INDIRETTA DELL'RNA “TARGET”

La marcatura dell'RNA totale è stata effettuata utilizzando il kit “Amino Alkyl MessageAmp™II aRNA Amplification” (*Ambion*), che prevede, dopo la sintesi di un doppio filamento di cDNA, l'incorporazione di nucleotidi modificati con un gruppo amminico (ammino alkyl UTP), a cui viene successivamente legato il fluoroforo (Cy5) con una reazione di accoppiamento chimico.

SINTESI DEL PRIMO FILAMENTO DI CDNA

Per ogni campione è stata assemblata una miscela di reazione in 12 µl con i seguenti reagenti:

- 1 µg di RNA totale (volume max 8 µl)
- 1 µl oligo(dT) “primer” T7
- 1 µl di ogni “RNA spikes” (3,5 pg/µl)*
- H₂O DEPC a 12 µl

e si è incubato a 70°C per 10 min.

Ogni campione è stato poi posto in ghiaccio per almeno 1 minuto.

*sono stati aggiunti 3 diversi “RNA spikes”, preparati secondo il kit “Array control” (*Ambion*).

In ogni tubo sono stati poi dispensati 8 μ l di una miscela dei seguenti reagenti:

- 2 μ l First-Strand Buffer 10X
- 4 μ l dNTP mix
- 1 μ l RNAsi Inhibitor
- 1 μ l ArrayScript

e si è incubato in un fornello di ibridazione 2 h a 42°C, ponendo i tubi in ghiaccio dopo la reazione.

SINTESI DEL SECONDO FILAMENTO DI cDNA

In ogni tubo, contenente la miscela di sintesi del primo filamento di cDNA, si sono dispensati 80 μ l di una miscela dei seguenti reagenti:

- 63 μ l H₂O DEPC
- 10 μ l Second-strand buffer 10X
- 4 μ l dNTP mix
- 2 μ l DNA Polimerasi
- 1 μ l Rnasi H

e si è incubato 2 h a 16°C in un termociclatore pre-raffreddato a 16°C, senza coperchio riscaldato.

PURIFICAZIONE DEL cDNA

Prima di procedere con la purificazione del cDNA a doppio filamento è stato necessario pre-riscaldare l' H₂O DEPC a 55°C per almeno 10 min.

La purificazione del cDNA è stata quindi eseguita secondo i seguenti passaggi:

- a ciascun tubo sono stati aggiunti 250 μ l di “cDNA Binding Buffer” pipettando 2-3 volte;
- la miscela cDNA/Buffer è stata caricata in una colonna “cDNA Filter Cartridge”, posizionata sopra ogni tubo, e si è centrifugato a 10.000 g per 1 min a temperatura ambiente;
- dopo aver scartato il sopranatante, la colonna è stata lavata con 500 μ l di “Wash buffer” e si è centrifugato a 10000 x g per 1 min a temperatura ambiente;
- dopo aver scartato il sopranatante, si è centrifugato a 10000 g per 1 min a temperatura ambiente per eliminare i residui di “Wash buffer”;
- dopo aver trasferito la colonna in un nuovo tubo, sono stati aggiunti 9 μ l di H₂O DEPC pre-riscaldata a 55°C, lasciando incubare a temperatura ambiente per 2 min;

- si è centrifugato a 10.000 g per 2 min a temperatura ambiente e si è eluito con altri 9 μ l di H₂O DEPC pre-riscaldata a 55°C.

TRASCRIZIONE *IN VITRO* PER SINTETIZZARE AARNA

Ad ogni tubo contenente il cDNA purificato sono stati aggiunti 26 μ l di una miscela di reazione con i seguenti reagenti:

- 3 μ l aaUTP (50 mM)
- 12 μ l ATP, CTP, GTP Mix (25 mM)
- 3 μ l UTP Solution (50 mM)
- 4 μ l T7 Reaction Buffer 10X
- 4 μ l T7 Enzyme mix

e si è incubato a 37°C per 14 h. La reazione è stata stoppata aggiungendo in ciascun tubo 60 μ l di H₂O DEPC.

È stato scelto di usare un equo rapporto tra molecole di UTP e di aaUTP. Cambiando questo rapporto, si può modificare il grado di incorporazione di aaUTP e quindi di molecole di fluoroforo che possono essere incorporate nell'aRNA.

PURIFICAZIONE DELL'AARNA

Prima di procedere con la purificazione dell'aRNA è stato necessario pre-riscaldare l' H₂O DEPC a 55°C per almeno 10 min.

Sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- a ciascun tubo sono stati aggiunti 350 μ l di "aRNA Binding Buffer" e subito dopo 250 μ l di etanolo 100%, pipettando 3 volte;
- la miscela è stata caricata immediatamente in una colonna "aRNA Filter Cartridge", posizionata sopra ogni tubo, e si è centrifugato a 10.000 g per 1 min a temperatura ambiente;
- dopo aver scartato il sopranatante, la colonna è stata lavata con 650 μ l di "Wash buffer" e si è centrifugato a 10.000 g per 1 min a temperatura ambiente;
- dopo aver scartato il sopranatante, si è centrifugato a 10.000 g per 1 min a temperatura ambiente per eliminare i residui di "Wash buffer";
- dopo aver trasferito la colonna in un nuovo tubo, sono stati aggiunti 100 μ l di H₂O DEPC pre-riscaldata a 55°C, lasciando incubare a temperatura ambiente per 2 min;
- si è centrifugato a 10.000 g per 2 min a temperatura ambiente.

QUANTIFICAZIONE DELL'aaRNA E ACCOPPIAMENTO DEL FLUOROFORO

Prima di procedere all'accoppiamento del fluoroforo, è stata fatta una lettura a spettrofotometro a 260 nm di una diluzione 1:100 della reazione di trascrizione *in vitro* in TE (Tabella 7) per calcolare la concentrazione di aaRNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

L'aaRNA viene marcato attraverso accoppiamento del fluoroforo (estere Cy5 N-hydroxysuccinimide) con i nucleotidi amminomodificati, incorporati nell'aaRNA nella reazione di trascrizione *in vitro*.

Per eseguire la purificazione dell'aaRNA sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- 20 μg di aaRNA per ogni campione sono stati posti in un tubo e sono stati seccati a vuoto, controllando il processo ogni 5 minuti in modo da evitare un'eccessiva disidratazione;
- al tubo contenente il fluoroforo (Cy5) sono stati aggiunti 11 μl di DMSO, risospendendo con "vortex"; il fluoroforo è stato mantenuto in risospensione al buio per al massimo 1 h;
- nel tubo contenente l'aaRNA disidratato sono stati aggiunti 9 μl di "Coupling buffer" risospendendo con "vortex";
- gli 11 μl di Cy5 risospeso sono stati aggiunti ai 9 μl della miscela aaRNA/"Coupling buffer", miscelando con "vortex";
- si è incubato 30 min al buio per consentire l'accoppiamento chimico dei fluorofori; per bloccare la reazione sono stati poi aggiunti 4,5 μl di Hydroxylamine 4M;
- si è incubato 15 min al buio e sono stati aggiunti 4,5 μl di H₂O DEPC per raggiungere un volume di 30 μl .

PURIFICAZIONE DELL'aaRNA MARCATO E CALCOLO DELL'EFFICIENZA DI INCORPORAZIONE DEL FLUOROFORO

Eseguito l'accoppiamento del fluoroforo, l'aaRNA marcato è stato purificato eseguendo i seguenti passaggi:

- a ciascun tubo sono stati aggiunti 105 μl di "aRNA Binding Buffer" e subito dopo 75 μl di etanolo 100%, pipettando 3 volte;
- la miscela è stata caricata immediatamente in una colonna "Labeled aRNA Filter Cartridge", posizionata sopra ogni tubo, e si è centrifugato a 10.000 g per 1 min a temperatura ambiente;

- dopo aver scartato il sopranatante, la colonna è stata lavata con 500 µl di “Wash buffer” e si è centrifugato a 10.000 g per 1 min a temperatura ambiente;
- dopo aver scartato il sopranatante, si è centrifugato a 10.000 g per 1 min a temperatura ambiente per eliminare i residui di “Wash buffer”;
- dopo aver trasferito la colonna in un nuovo tubo, l’aaRNA marcato è stato eluito con 10 µl di H₂O DEPC pre-riscaldato a 55°C, lasciando incubare a temperatura ambiente per 2 min, e si è centrifugato a 10.000 g per 2 min a temperatura ambiente; il passaggio è stato ripetuto due volte.

Per calcolare l’efficienza di incorporazione del fluoroforo (Cy5) sono state eseguite due misure spettrofotometriche a 260 nm e a 650 nm (A max di Cy5) di una diluizione 1:70 in TE dell’aaRNA marcato.

Il numero di molecole di aRNA marcato per 1000 pb è stato calcolato con la seguente formula:

$$\frac{\# \text{ molecole aaRNA marcato}}{1000 \text{ pb}} = \frac{A_{650} \times 9010 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} \times 1000}{A_{260} \quad \epsilon \text{ Cy5}}$$

in cui $\epsilon \text{ Cy5 (650nm)} = 250.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

Il numero di molecole di aRNA marcato atteso è compreso tra 30 e 60 molecole di aRNA marcato per 1000 pb.

3.9.4 IBRIDAZIONE DEL VETRINO

L’ibridazione del vetrino CustomArrayTM4x2K è stata eseguita secondo il protocollo “Hybridization and Imaging Protocol” (CMBX).

Prima di procedere con l’ibridazione, sono state inoltre preparate le soluzioni, la cui composizione è descritta nelle seguenti tabelle.

Tabella 14 Composizione 20X SSPE Buffer

Componente	Concentrazione
NaCl	3M
Na ₂ PO ₄	173mM
EDTA	25mM

Tabella 15 Composizione 2X Hyb Solution

Componente	Concentrazione
20X SSPE Buffer (Tabella 14)	12X
10% Tween-20	0,1%
0,5M EDTA	40mM
H ₂ O DEPC	A volume

Tabella 16 Composizione Soluzione di frammentazione 5X

Componente	Concentrazione
1M Tris Acetato pH 8,1	200 mM
KOAc	500 mM
MgOAc	150 mM
H ₂ O DEPC	A volume

Tabella 17 Composizione delle soluzioni di lavaggio

Soluzione	Componenti
6X SSPET	6X SSPE Buffer 0,05%Tween-20
3X SSPET	3X SSPE Buffer 0,05%Tween-20
0.5X SSPET	0.5X SSPE Buffer 0,05%Tween-20
PBST	PBS 2X (<i>Ambion</i>) 0,1%Tween-20
PBS	PBS 2X (<i>Ambion</i>)

Considerato che il vetrino CustomArray™4x2K è costituito da 4 “array” indipendenti, per ciascuna ibridazione si è proceduto secondo il seguente schema sperimentale:

- primo e secondo “array” sono state ibridati con 1 µg aaRNA marcato di due repliche biologiche del campione controllo;
- terzo e quarto “array” sono stati ibridati con 1 µg di aaRNA marcato di due repliche biologiche del campione trattato.

Ogni esperimento di ibridazione è stata poi eseguito in triplicato.

In ogni esperimento di ibridazione sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- assemblaggio del vetrino, tramite un “clamp” fornita nel kit, con una camera di ibridazione divisa in 4 settori, facendo attenzione ad esporre la superficie semiconduttrice verso l’alto;
- reidratazione del vetrino ponendo in ogni settore 30 µl di acqua, coprendo la camera di ibridazione con dello “scotch” ed incubando a 65°C per 10 min, in un fornetto di ibridazione;

- sostituzione in ogni settore dei 30 µl di acqua con 30 µl di soluzione di pre-ibridazione, pipettando 3 volte. Dopo aver posto dello “scotch” sopra la camera di ibridazione, il vetrino è stato incubato a 45°C per 3 min.

Considerando i 4 settori, è stata preparata al momento una soluzione di pre-ibridazione da 150 µl costituita dai seguenti reagenti:

75 µl Hyb Solution 2X (Tabella 15)

51 µl H₂O DEPC

15 µl Soluzione Denhardt 50X (*Ambion*)

1,5 µl di DNA di salmone (10 mg/ml)*

7,5 µl SDS 1 %

* il DNA di salmone è stato denaturato a 95°C per 7 min e subito posto in ghiaccio.

- frammentazione dei campioni di aaRNA marcato da ibridare (“target”), dopo aver assemblato la miscela di reazione con i seguenti reagenti:

2 µg aaRNA marcato

1,2 µl Soluzione di frammentazione 5X (Tabella 16)

H₂O DEPC a 6 µl

Si è poi incubato a 95°C per 20 min. Dopo la frammentazione i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio fino alla preparazione della soluzione di ibridazione;

- sostituzione in ogni settore dei 30 µl di soluzione di pre-ibridazione con 30 µl di soluzione di ibridazione, pipettando 3 volte. Dopo aver posto dello “scotch” e dell’alluminio sopra la camera di ibridazione, il vetrino è stato incubato in un fornello di ibridazione a 45°C in rotazione per tutta la notte.

Per ogni campione da ibridare la soluzione di ibridazione di 30 µl era costituita dai seguenti reagenti:

15 µl Hyb Solution 2X (Tabella 15)

7,5 µl Formamide deionizzata

0,3 µl DNA di salmone (10 mg/ml) denaturato

1,2 µl SDS 1%

6 µl RNA frammentato

3.9.5 LAVAGGI DEL VETRINO

Prima di procedere ai lavaggi del vetrino la soluzione SSPET 6X è stata pre-riscaldata a 50°C per 10 min.

I lavaggi sono quindi stati eseguiti secondo i seguenti passaggi:

- rimozione del vetrino dal fornello di ibridazione e sostituzione dei 30 µl della soluzione di ibridazione con 30 µl di soluzione SSPET 6X pre-riscaldata in ogni settore di ibridazione;
- incubazione del vetrino nel fornello di ibridazione a 45°C in rotazione per 5 min, dopo aver posto dello “scotch” sopra la camera di ibridazione;
- esecuzione di 4 lavaggi in successione in ogni settore di ibridazione, utilizzando in successione 30 µl delle soluzioni SSPET3X, SSPET 0,5X, PBST (Tabella 17), pipettando 3 volte e aspettando 1 min tra un lavaggio e l'altro;
- esecuzione di 2 lavaggi con 30 µl della soluzione PBS (Tabella 17), intervallati da 1 min di incubazione.

Ultimati i lavaggi, la camera di ibridazione è stata rimossa dal vetrino, che è stato poi a sua volta estratto dalla “clamp”. Prima di procedere all'acquisizione del segnale, sulla superficie semiconduttrice del vetrino sono state poste alcune gocce di Imaging solution™ ed è stata posizionata accuratamente una LifterSlip™, entrambe fornite con il vetrino, prestando attenzione di porre i lati ruvidi della LifterSlip™ verso la superficie semiconduttrice e di non fare bolle. Prima di procedere alla scansione è stato inoltre rimosso l'eccesso di Imaging solution.™

3.9.6 LETTURA DEL VETRINO E QUANTIFICAZIONE DEL SEGNALE

Per la scansione del vetrino è stato utilizzato l'apparato di scansione per vetrini microarray ScanArray4000XL (*Perkin Elmer*). Tale strumento è costituito da un laser in grado di eccitare il fluoroforo utilizzato per la marcatura dei campioni e da un sistema di scansione basato su un microscopio confocale per raccogliere la fluorescenza emessa in corrispondenza degli “spot”. L'intensità della fluorescenza viene quindi misurata attraverso dei fotomoltiplicatori e i dati relativi vengono raccolti da un apposito “software”.

Lo strumento è stato pilotato via software con il programma ScanArray Express.

Sono stati impostati i seguenti parametri:

- Scan resolution: 5 µm
- Scan Speed: Half

- Fluorophores: Cys5

I parametri PMT gain e Laser Power sono stati regolati in modo da avere un segnale attorno al 75%. Le potenze sono state abbassate in caso di un segnale saturo da parte di alcuni “spot”.

Al termine della scansione, le immagini acquisite sono state salvate ed esportate in formato **.tif** ed il vetrino è stato posto in PBS1X per mantenerlo idratato.

La quantificazione del segnale è stata eseguita tramite MicroArray Imager™ (CMBX).

Dopo aver caricato il file **.xlm**, che contiene le informazioni relative al disegno dei “probe” su vetrino e il file immagine **.tif**, acquisito durante la scansione, la fase successiva è consistita nell’acquisire i dati posizionando una griglia sull’immagine scansionata del vetrino, in coincidenza della griglia presente sulla superficie semiconduttrice. Il programma ha poi eseguito la quantificazione dell’intensità di fluorescenza di ogni “spot” facendo la media del segnale dei pixel inclusi nei circoletti che delimitano ogni “spot”.

L’acquisizione finale dei dati di espressione è avvenuta tramite l’esportazione di un file **.txt**.

3.9.7 “STRIPPING DEL VETRINO”

Lo “stripping” del vetrino è stato eseguito con il kit “CustomArray™Stripping Kit for 4x2K” (CMBX).

Dopo esser stato rimosso dal tampone PBS1X, il vetrino è stato asciugato sul retro e nell’area attorno alla superficie semiconduttrice e assemblato con la “stripping clamp”, mantenendo la superficie semiconduttrice verso l’alto.

In seguito è stato eseguito un primo lavaggio con 500 µl di Stripping Solution™ contenente etanolamina, altamente corrosiva. I 500 µl di soluzione sono stati poi sostituiti con altri 500 µl di Stripping Solution™ e la camera di “stripping” è stata incubata 1 h a 65°C.

In seguito la camera è stata rimossa dal fornello di incubazione e sono stati eseguiti 2 lavaggi con 500 µl di etanolo 95%, intervallati da 1 lavaggio con acqua.

In seguito il vetrino è stato rimosso dalla camera di “stripping” ed è stato posto in PBS 1X ed incubato a 65°C per 20 min.

Terminata l’incubazione, il vetrino è stato asciugato e, dopo aver posto un po’ di Imaging solution™, è stata eseguita una scansione per verificare che il vetrino fosse pulito.

3.9.8 ANALISI DEI DATI MICROARRAY

Prima di effettuare l'analisi statistica dei dati di espressione, i valori della mediana di intensità di fluorescenza contenuti nel file **.txt** in uscita da MicroArray ImagerTM sono stati processati tramite normalizzazione.

Essa è stata eseguita in due fasi:

1) *Fase di normalizzazione tra "array" di un vetrino e tra vetrini*: è stata eseguita con i seguenti passaggi:

- dopo aver eliminato il 15% dei valori più alti e più bassi di intensità di fluorescenza per ciascun "array", è stata eseguita la sommatoria del rimanente 70% dei valori di ogni "array", ottenendo un valor medio definito *intensità di fluorescenza di ciascun "array"*.
- è stata poi calcolato il *valor medio di intensità di fluorescenza di ciascun campione*, controllo e trattato, facendo la media dell'intensità di fluorescenza di ogni "array" sul medesimo vetrino (repliche biologiche) e su vetrini diversi (repliche tecniche).
- infine il valore di intensità di ogni "spot" di ogni campione è stato moltiplicato per un fattore di correzione ottenuto dividendo il valor medio d'intensità del campione per l'intensità di fluorescenza dell'"array" di appartenenza dello "spot" (*intensità di fluorescenza normalizzata secondo la fase 1*).

Questa fase consente di escludere quei valori per cui il rapporto tra il livello di espressione del campione trattato e controllo non è lineare, altrimenti si rischia di falsare la centratura dell'"array". Inoltre consente di poter confrontare i valori ottenuti dalle ibridazioni condotte su vetrini diversi, nel caso delle repliche tecniche di ibridazione di ciascun campione.

2) *Fase di normalizzazione rispetto ai geni costitutivi*: è stata eseguita con i seguenti passaggi:

- per ciascuno "spot" corrispondente ad alcuni geni ritenuti potenzialmente costitutivi è stato calcolato il rapporto tra l'intensità di fluorescenza normalizzata secondo la fase 1 del campione trattato e controllo ("fold-change").
- è stata poi eseguita la media tra i "fold-change" degli "spot" dei geni costitutivi, ottenendo un ulteriore *fattore di normalizzazione* rispetto a cui l'intensità di fluorescenza di ciascuno "spot", in ciascun campione, è stata corretta.

Questa fase consente di correggere eventuali errori sistematici dovuti a differenze nell'incorporazione del fluoroforo tra i campioni a confronto, alla sensibilità dei fluorofori alla luce e al calore, ed ai diversi parametri di "setting" nell'acquisizione del segnale durante la scansione del vetrino.

Terminata la fase di normalizzazione, per ogni “spot”, in ciascun campione (controllo e trattati) è stato ottenuto un valore unico di espressione, eseguendo la media dei valori di intensità normalizzati di ogni replica, biologica e tecnica.

L'efficacia della procedura di normalizzazione è stata verificata con un grafico di tipo “scatterplot”, che permette di confrontare il logaritmo dei valori di espressione del campione controllo rispetto a quello del campione trattato.

È stata inoltre valutata la variabilità tra repliche biologiche e tecniche di ogni campione tramite un test di correlazione di Pearson a partire dai valori di intensità di fluorescenza normalizzati di ciascuna replica, trasformati in logaritmo in base 2. Per il test statistico è stato utilizzato BRB Array Tools, un pacchetto integrato per la visualizzazione e l'analisi statistica dei dati “microarray” sviluppato da Dr. Richard Simon e Amy Peng Lam (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>).

L'analisi statistica dei valori di espressione normalizzati è stata eseguita con il pacchetto integrato di analisi di dati “microarray” TM4 (<http://www.tm4.org>), sviluppato dal TIGR (The Institute for Genomic Research).

Per identificare i geni significativamente differenzialmente espressi tra le due condizioni analizzate è stata eseguita un'analisi statistica SAM (Significance Analysis of Microarrays, Tusher *et al.*, 2001) di tipo “multiclass” a 100 permutazioni, dopo aver creato 3 gruppi all'interno di ciascun individuo (controllo, trattato a 12hdi e trattato a 96 hdi). La lista dei geni espressi significativamente è stata determinata scegliendo un valore soglia delta (Δ), a cui corrisponde un “False Discovery Rate” (FDR). All'interno di questo gruppo sono stati poi selezionati i geni con $FC \geq 1,5$ e $\leq 0,66$.

4 RISULTATI

In questa sezione vengono riportati i risultati relativi alla caratterizzazione fenotipica, metabolica e trascrizionale dopo infezione con *Plasmopara viticola* degli individui di una popolazione F₁ derivante dall'incrocio tra Freiburg 993-60, ibrido complesso di *V. vinifera*, *V. rupestris* e *V. lincedumii* e la cultivar di *V. vinifera* 'Teroldego'.

4.1 ANALISI FENOTIPICA DELLA POPOLAZIONE D'INCROCIO Freiburg x 'Teroldego'

Dieci giorni dopo l'infezione, per ogni genotipo considerato nelle rispettive annate (105 nel 2005 e 89 nel 2006 più i parentali) è stata stimata la percentuale di area fogliare infetta, valutando la percentuale di superficie sporulante sulla pagina fogliare inferiore (% Sp) e la presenza di necrosi e clorosi sulla pagina fogliare superiore (criteri OEPP/EPPO, 1997). Complessivamente sono state individuate 4 classi fenotipiche, definendo 4 intervalli di superficie fogliare a sporulazione crescente (% Sp), ed ogni individuo è stato associato ad una classe. Inoltre per ogni classe è stata ottenuta la descrizione dei sintomi sulla pagina superiore fogliare, riassunti in Tabella 18.

Classe	Intervallo di sporulazione	Descrizione macroscopica dei sintomi
1	0	Piccole aree necrotiche dovute a risposta ipersensibile. Assenza di sporulazione.
2	0 < % Sp < 5	Sviluppo concentrico di lesioni necrotiche con risposta ipersensibile. Sporulazione ridotta.
3	5 < % Sp < 20	Presenza di clorosi e aree necrotiche e sporulazione in corrispondenza della clorosi.
4	20 < % Sp < V	Clorosi diffusa: presenza della caratteristica macchia d'olio giallastra. Alta sporulazione.

Tabella 18 Classi fenotipiche identificate dopo infezione con *P. viticola* nella popolazione d'incrocio in base ai criteri OEPP/EPPO (1997). V= valore massimo di sporulazione rilevato

In Figura 6 sono riportate delle fotografie riguardo alla sintomatologia sulla pagina fogliare superiore (sinistra) ed inferiore (destra), ottenute per individui appartenenti alla classe fenotipica di totale resistenza (classe 1), e di totale suscettibilità (classe 4).

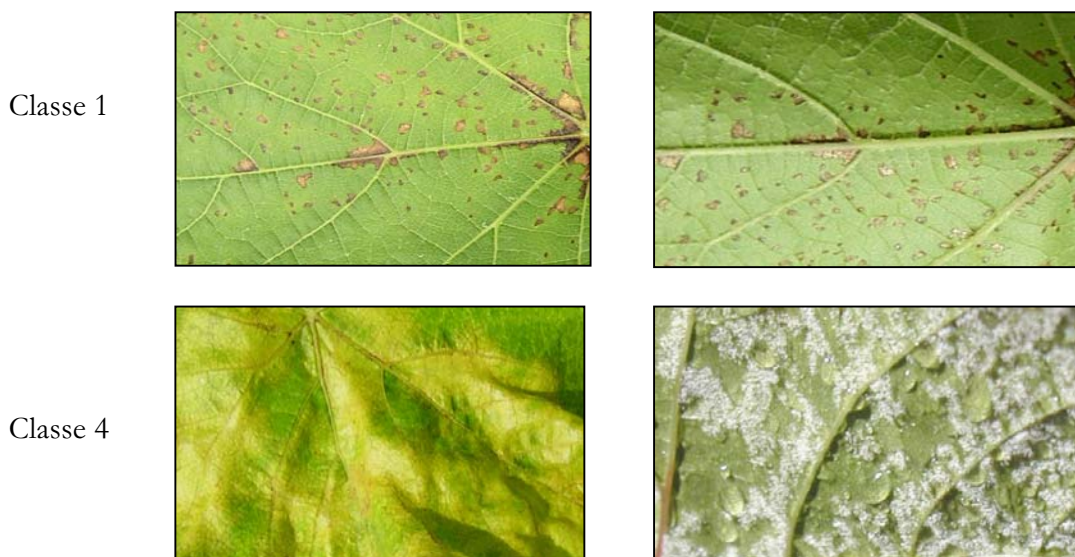


Figura 6 Sintomatologia a 10 giorni dall'infezione con *P. viticola* sulla pagina fogliare superiore (sx) e inferiore (dx) dei genotipi appartenenti alla classe 1 (totale resistenza) e alla classe 4 (totale suscettibilità).

Calcolando la percentuale di individui per classe fenotipica nelle due annate, sono state ottenute le seguenti distribuzioni:

- nel 2005 il 4% dei genotipi è risultato totalmente resistente (classe 1), il 23% parzialmente resistente (classe 2), il 36% parzialmente suscettibile (classe 3), tra cui il parentale Freiburg 993-60, e il rimanente 27% totalmente suscettibile, tra cui il parentale 'Teroldego' (classe4);
- nel 2006 il 5% è risultato completamente resistente (classe 1), il 32% parzialmente resistente tra cui il parentale Freiburg 993-60 (classe 2), il 58% parzialmente suscettibile (classe 3) e il 5% totalmente suscettibile, tra cui il parentale 'Teroldego', (classe4).

Nel valutare le percentuali ottenute bisogna tener presente che gli individui considerati nelle due annate sono stati 105 nel 2005 e 89 nel 2006.

Sulla base di questa considerazione è interessante far notare come complessivamente gli individui appartengano alla medesima classe in entrambe le annate, fatta eccezione per alcuni e per il parentale Freiburg. In particolare nel 2006 le classi fenotipiche intermedie sono risultate più popolate, poiché si sono ottenuti livelli di sporulazione più bassi, risultato imputabile in parte alla minore virulenza o ad una minore densità dell'inoculo fungino.

Infine per verificare se il controllo genetico della resistenza a *P. viticola* fosse monogenico o poligenico, si è eseguita un'analisi statistica dei dati relativi alla percentuale di superficie

sporulante sulla pagina fogliare inferiore (% Sp), sia allo stato grezzo che trasformati in funzione della radice quadrata. I dati grezzi hanno mostrato una distribuzione di tipo “skewed”, mentre quelli trasformati di tipo “bimodale”, entrambe tipiche nel caso di caratteri quantitativi controllati da pochi geni, come la resistenza a *P. viticola* (Figura 7).

Inoltre la normalità dei dati grezzi e trasformati, secondo il test di Kolmogorov-Smirnov, è risultata significativa ($\alpha = 5\%$) in entrambi i casi.

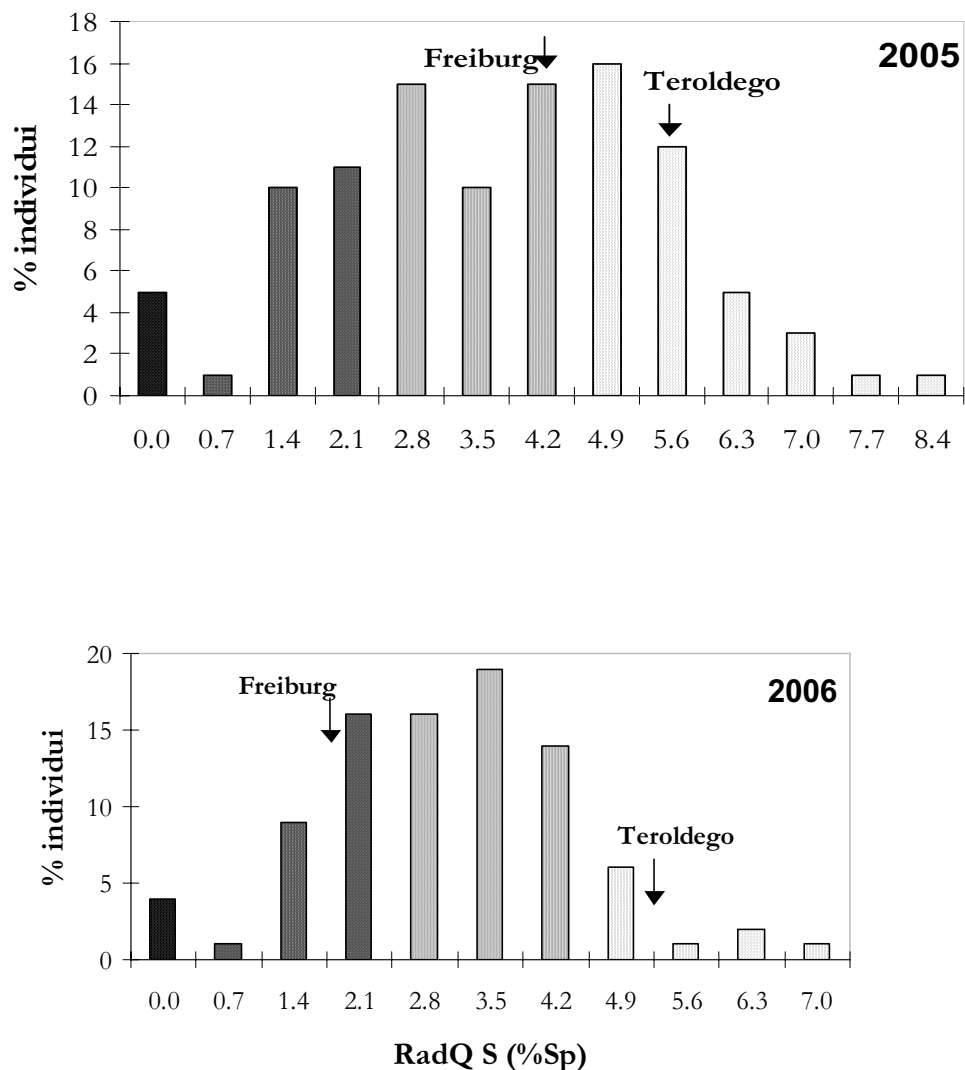


Figura 7 Distribuzione dei valori di superficie sporulante, trasformati in funzione della radice quadrata (RadQ % Sp), tra gli individui della popolazione d'incrocio, nelle annate 2005 e 2006. La scala di grigio delle barre indica la progressione in base alla % Sp da totale resistenza (scuro) a suscettibilità (chiaro) secondo le quattro classi fenotipiche individuate.

4.2 ANALISI DEGLI STILBENI NELLA POPOLAZIONE D'INCROCIO Freiburg x 'Teroldego'

4.2.1 MESSA A PUNTO DELLA CARATTERIZZAZIONE DEGLI STILBENI

Prima di eseguire la caratterizzazione degli stilbeni negli individui della progenie e nei parentali dopo infezione con *P. viticola*, l'analisi è stata messa a punto su 5 individui risultati totalmente resistenti e sul parentale Freiburg.

L'analisi è stata compiuta con HPLC-DAD-MS, che permette di identificare gli eventuali stilbeni presenti sulla base del tempo di ritenzione in colonna, dello spettro UV-VIS e dello spettro di massa.

Sulla base di dati di letteratura per cui la sintesi di stilbeni in foglia dipende anche dall'età fogliare, mostrando una cinetica di accumulo con un massimo a tempi successivi a 48 ore, si è deciso di valutare quali fossero le foglie a partire dall'apice in cui si verificasse la maggior sintesi di stilbeni. A 6 giorni dall'infezione fungina per ogni individuo sono state campionate 7 foglie a partire dall'apice, numerate in maniera crescente. Dall'analisi HPLC è emerso come la terza foglia è quella che sintetizza più stilbeni in tutti gli individui considerati (Tabella 19).

Inoltre per seguire la cinetica di sintesi dopo infezione, di ogni individuo è stata quindi campionata la terza foglia a 0h, dopo trattamento con acqua, e a 48 h e 6 giorni dall'inoculo con *P. viticola*.

Dai dati presentati in tabella 19 risulta evidente come nella maggior parte degli individui gli stilbeni si formino solo in seguito ad infezione.

L'accumulo inizia in modo individuo-dipendente e stilbene-dipendente a partire dalle 48 h e prosegue fino a 6 giorni dall'infezione, confermando i dati in letteratura (Pezet *et al.*, 2004a).

Dopo 6 giorni infatti il "pattern" fogliare di stilbeni risulta più complesso in tutti gli individui ed è caratterizzato da moderate concentrazioni di *trans*-resveratrolo (valore max= 14,3 µg/g fw) e da concentrazioni variabili di viniferine fino ad un massimo di 61,2 µg/g f nel caso di *trans*-ε-viniferina e 36,4 µg/g fw nel caso di *trans+cis* δ-viniferina (individuo F₁ 21/103).

Inoltre è interessante notare come gli individui della progenie presentino livelli di stilbeni più alti del parentale Freiburg, soprattutto per quanto riguarda le viniferine.

Tabella 19 Contenuto in *trans*- resveratrolo, *trans*-piceide, *trans*- ϵ -viniferina e *trans*+*cis*- δ -viniferina ($\mu\text{g/g}$ fw) nelle foglie dei 5 individui totalmente resistenti e del parentale Freiburg campionate a 0h, 48h e 6gg dall'infezione con *P. viticola*.

<i>trans</i> - resveratrolo					<i>trans</i> - piceide				ϵ -viniferina				<i>cis</i> - + <i>trans</i> - δ -viniferina			
individuo	6gg	0h*	48h*	6gg*	6gg	0h*	48h*	6gg*	6gg	0h*	48h*	6gg*	6gg	0h*	48h*	6gg*
Freiburg	f1 2,2 $\pm$ 0,7	nq	nq	5,7 $\pm$ 0,4	f1 0,0 $\pm$ 0,0	nq	nq	2,7 $\pm$ 0,2	f1 5,8 $\pm$ 0,3	nq	nq	8,8 $\pm$ 0,4	f1 2,3 $\pm$ 0,1	nq	nq	4,0 $\pm$ 0,3
	f2 3,6 $\pm$ 0,3				f2 0,0 $\pm$ 0,0				f2 7,5 $\pm$ 0,5				f2 3,5 $\pm$ 0,3			
	f3 5,7 $\pm$ 0,4				f3 2,7 $\pm$				f3 8,6 $\pm$ 0,7				f3 4,9 $\pm$ 0,4			
	f4 -				f4 -				f4 -				f4 -			
	f5 2,9 $\pm$ 0,3				f5 0,0 $\pm$ 0,0				f5 2,9 $\pm$ 0,1				f5 2,3 $\pm$ 0,2			
	f6 3,6 $\pm$ 0,2				f6 0,0 $\pm$ 0,0				f6 6,5 $\pm$ 0,4				f6 3,2 $\pm$ 0,1			
	f7 3,0 $\pm$ 0,4				f7 0,0 $\pm$ 0,0				f7 9,1 $\pm$ 0,8				f7 3,8 $\pm$ 0,2			
21/122	f1 2,6 $\pm$ 0,3	0,19 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,5	f1 5,7 $\pm$ 0,3	nq	nq	5,3 $\pm$ 0,4	f1 4,4 $\pm$ 0,3	nq	nq	20,7 $\pm$ 3,2	f1 3,7 $\pm$ 0,3	nq	nq	16,7 $\pm$ 0,6
	f2 4,4 $\pm$ 0,7				f2 4,4 $\pm$ 0,2				f2 15,3 $\pm$ 2,2				f2 13,5 $\pm$ 0,6			
	f3 8,1 $\pm$ 1,1				f3 5,3 $\pm$ 0,2				f3 20,7 $\pm$ 3,6				f3 16,7 $\pm$ 2,9			
	f4 6,0 $\pm$ 0,5				f4 2,9 $\pm$ 0,1				f4 11,8 $\pm$ 1,2				f4 8,6 $\pm$ 0,4			
	f5 7,2 $\pm$ 0,7				f5 5,3 $\pm$ 0,1				f5 15,3 $\pm$ 1,7				f5 10,7 $\pm$ 1,2			
	f6 11,2 $\pm$ 0,5				f6 7,0 $\pm$ 0,4				f6 22,8 $\pm$ 3,8				f6 18,0 $\pm$ 1,4			
	f7 4,7 $\pm$ 0,2				f7 4,1 $\pm$ 0,2				f7 10,0 $\pm$ 0,9				f7 7,0 $\pm$ 0,5			
21/16	f1 2,6 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	f1 0,0 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,1	nq	3,3 $\pm$ 0,1	f1 2,9 $\pm$ 0,1	nq	1,7 $\pm$ 0,0	15,2 $\pm$ 2,2	f1 2,0 $\pm$ 0,0	nq	nq	9,0 $\pm$ 0,8
	f2 2,4 $\pm$ 0,2				f2 0,0 $\pm$ 0,0				f2 8,1 $\pm$ 0,6				f2 5,4 $\pm$ 0,4			
	f3 4,8 $\pm$ 0,3				f3 2,7 $\pm$ 0,1				f3 15,4 $\pm$ 1,4				f3 9,4 $\pm$ 0,3			
	f4 -				f4 0,0 $\pm$ 0,0				f4 -				f4 -			
	f5 3,0 $\pm$ 0,2				f5 0,0 $\pm$ 0,0				f5 8,2 $\pm$ 0,5				f5 5,2 $\pm$ 0,2			
	f6 4,8 $\pm$ 0,2				f6 0,0 $\pm$ 0,0				f6 8,2 $\pm$ 0,4				f6 4,8 $\pm$ 0,3			
	f7 -				f7 0,0 $\pm$ 0,0				f7 -				f7 -			
21/26	f1 2,6 $\pm$ 0,1	nq	3,1 $\pm$ 0,3	11,9 $\pm$ 0,7	f1 11,4 $\pm$ 0,5	nq	nq	1,8 $\pm$ 0,1	f1 10,3 $\pm$ 1,1	nq	6,1 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,8	f1 10,9 $\pm$ 0,8	nq	6,9 $\pm$	9,0 $\pm$ 0,7
	f2 3,9 $\pm$ 0,2				f2 0,5 $\pm$ 0,0				f2 20,0 $\pm$ 3,8				f2 11,0 $\pm$ 1,2			
	f3 2,4 $\pm$ 0,1				f3 1,8 $\pm$ 0,0				f3 8,8 $\pm$ 0,5				f3 9,0 $\pm$ 0,9			
	f4 3,3 $\pm$ 0,3				f4 1,5 $\pm$ 0,0				f4 8,2 $\pm$ 0,4				f4 7,2 $\pm$ 0,6			
	f5 4,1 $\pm$ 0,2				f5 3,3 $\pm$ 0,1				f5 14,7 $\pm$ 1,6				f5 12,2 $\pm$ 1,3			
	f6 2,7 $\pm$ 0,1				f6 2,2 $\pm$ 0,2				f6 7,7 $\pm$ 0,5				f6 15,5 $\pm$ 1,6			
	f7 1,3 $\pm$ 0,1				f7 4,5 $\pm$ 0,2				f7 9,5 $\pm$ 0,9				f7 18,4 $\pm$ 2,4			
21/103	f1 1,7 $\pm$ 0,1	nq	nq	14,3 $\pm$ 0,6	f1 0,0 $\pm$ 0,0	nq	nq	8,8 $\pm$ 0,4	f1 2,4 $\pm$ 0,0	nq	nq	61,2 $\pm$ 8,6	f1 2,1 $\pm$ 0,1	nq	nq	36,4 $\pm$ 5,1
	f2 5,6 $\pm$ 0,4				f2 0,0 $\pm$ 0,0				f2 13,1 $\pm$ 1,4				f2 8,4 $\pm$ 0,6			
	f3 21,1 $\pm$ 3,0				f3 8,8 $\pm$ 0,5				f3 61,2 $\pm$ 10,0				f3 36,4 $\pm$ 5,2			
	f4 4,4 $\pm$ 0,2				f4 0,2 $\pm$ 0,0				f4 21,2 $\pm$ 3,8				f4 16,3 $\pm$ 2,1			
	f5 5,6 $\pm$ 0,3				f5 0,9 $\pm$ 0,0				f5 31,5 $\pm$ 4,1				f5 24,0 $\pm$ 3,3			
	f6 5,3 $\pm$ 0,3				f6 0,4 $\pm$ 0,0				f6 34,7 $\pm$ 4,5				f6 25,4 $\pm$ 4,2			
	f7 6,0 $\pm$ 0,4				f7 0,6 $\pm$ 0,0				f7 32,7 $\pm$ 3,9				f7 21,9 $\pm$ 3,6			

Ogni valore ($\mu\text{g/g}$ fw) è il risultato della media di 3 repliche biologiche dello stesso genotipo $\pm$ l'errore standard. * Valori ottenuti analizzando la terza foglia.

Gli stilbeni sono stati identificati innanzi tutto in base al tempo di ritenzione in colonna, informazione desumibile dal cromatogramma UV-VIS, come mostrato in (Figura 8). Sono stati ritrovati i principali stilbeni finora caratterizzati in *Vitis* spp.: il *trans*-resveratrolo viene eluito dopo 14,92 min, il *trans*-piceide dopo 12,01 min, la *trans*- ϵ -viniferina dopo 17,72 min e la *trans*+*cis*- δ -viniferina dopo 17,94 min.

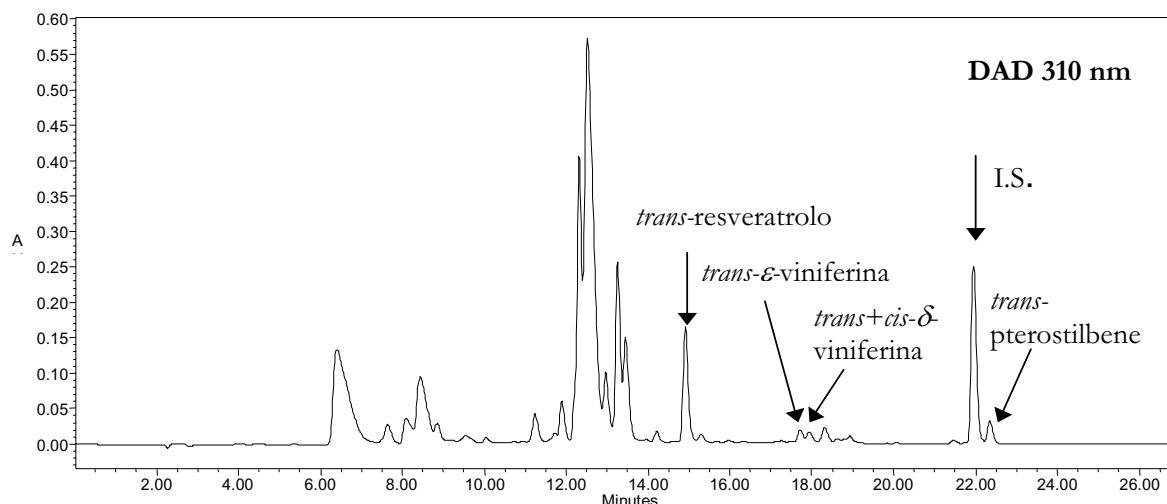


Figura 8 Cromatogramma UV-VIS (A_{310}) dell'individuo F₁ 21/103. I.S.= standard interno

I composti sono stati identificati anche tramite il segnale dello spettrometro di massa in modalità SIM. Confrontando il cromatogramma UV-VIS con quello di massa in modalità SIM a m/z 229 con CV 25 V, voltaggio al quale vengono rilevati i due isomeri del resveratrolo, si vede come il segnale dello spettrometro di massa è molto più pulito rispetto al segnale UV-VIS (Figura 9).

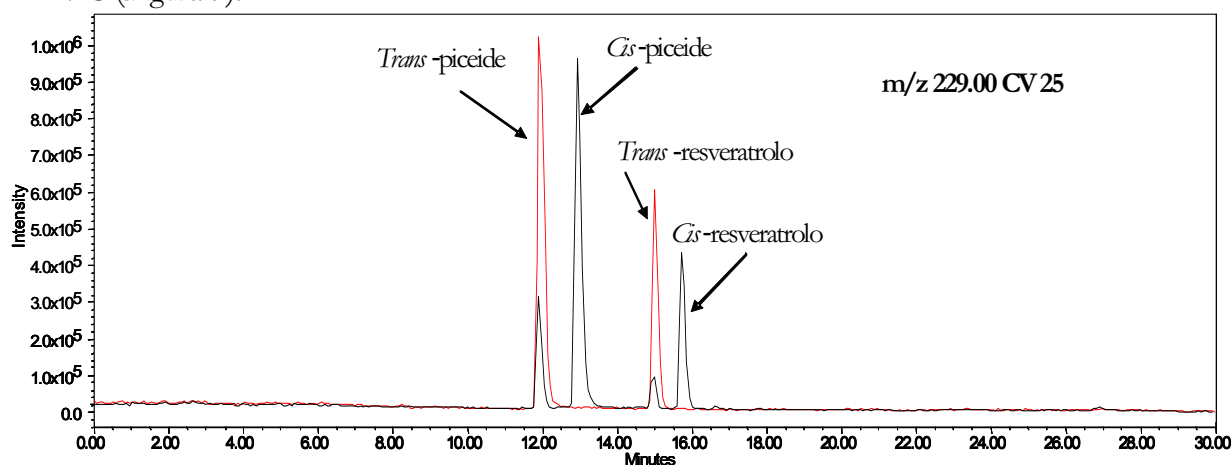


Figura 9 Cromatogramma in modalità SIM a m/z 229 con CV 25 V di *trans* e *cis* piceide e *trans* e *cis* resveratrolo (standard 10 mg/l).

Una volta identificati, i composti sono stati meglio caratterizzati in base allo spettro UV-VIS ed allo spettro di massa. La *trans*- δ -viniferina e la *cis*- δ -viniferina in HPLC vengono co-eluite,

per cui non è stato possibile registrare separatamente gli spettri dei due isomeri e proseguire alla caratterizzazione separata dei due composti.

La quantificazione è stata limitata a *trans*-piceide, *trans*-resveratrolo, *trans*- ϵ -viniferina, *trans*+*cis* δ -viniferina, perché nel caso degli isomeri *cis*- non è stato ottenuto un segnale di adeguata purezza. Essa è stata eseguita in base al segnale UV-VIS nel caso di *trans*- ϵ -viniferina, *trans*+*cis* δ -viniferina e *trans*-pterostilbene, mentre in base al segnale dello spettrometro di massa nel caso di *trans*-piceide e *trans*-resveratrolo.

Sulla base dei risultati ottenuti nella fase di messa a punto, si è proceduto con l'analisi del contenuto in stilbeni nella popolazione d'incrocio a partire dalla terza foglia, campionata a 6 giorni dall'infezione con *P. viticola*.

4.2.2 CARATTERIZZAZIONE DEGLI STILBENI NELLA POPOLAZIONE DI INCROCIO

Una volta identificati e quantificati gli stilbeni che vengono accumulati nelle foglie infettate con *P. viticola*, si è passati ad un'analisi estesa a tutti i 105 individui della progenie e ai parentali dell'incrocio.

Le analisi chimiche eseguite sulla terza foglia dopo 6 giorni di infezione hanno portato ai seguenti risultati (Figura 10 e Tabella 19):

- nel caso di *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide la maggior parte degli individui presentava valori sopra il limite di quantificazione (LQ). In base al contenuto fogliare in resveratrolo sono state individuate tre classi di produzione : il 27% degli individui è risultato appartenere alla classe degli “alto produttori” (*trans*-resveratrolo > 3 $\mu\text{g/g fw}$), il 45% alla classe dei “basso produttori” ($0,025 \mu\text{g/g fw} < \textit{trans-resveratrolo} < 3 \mu\text{g/g fw}$) e il 28% alla classe dei “non produttori” (*trans*-resveratrolo < 0,025 $\mu\text{g/g fw}$ (LQ).
- Nel caso di *trans*-pterostilbene, *trans*- ϵ -viniferina e *trans*+*cis*- δ -viniferina, pochi individui presentavano valori superiori al limite di quantificazione (LQ= $1,37 \times 10^{-3} \mu\text{g/g fw}$). In particolare in 17 dei 105 individui della progenie è stato identificato e quantificato uno dei tre composti in quantità rilevabili e in 6 di essi tutti gli stilbeni superavano il limite di quantificazione. È interessante notare che questi individui sono quasi sempre “alto produttori” di *trans*-resveratrolo e mostrano un fenotipo di totale o quasi totale resistenza a *P. viticola* (Figura 10 e Tabella 19).

Per quanto riguarda i parentali, nessuno degli stilbeni analizzati era presente al di sopra del limite di quantificazione.

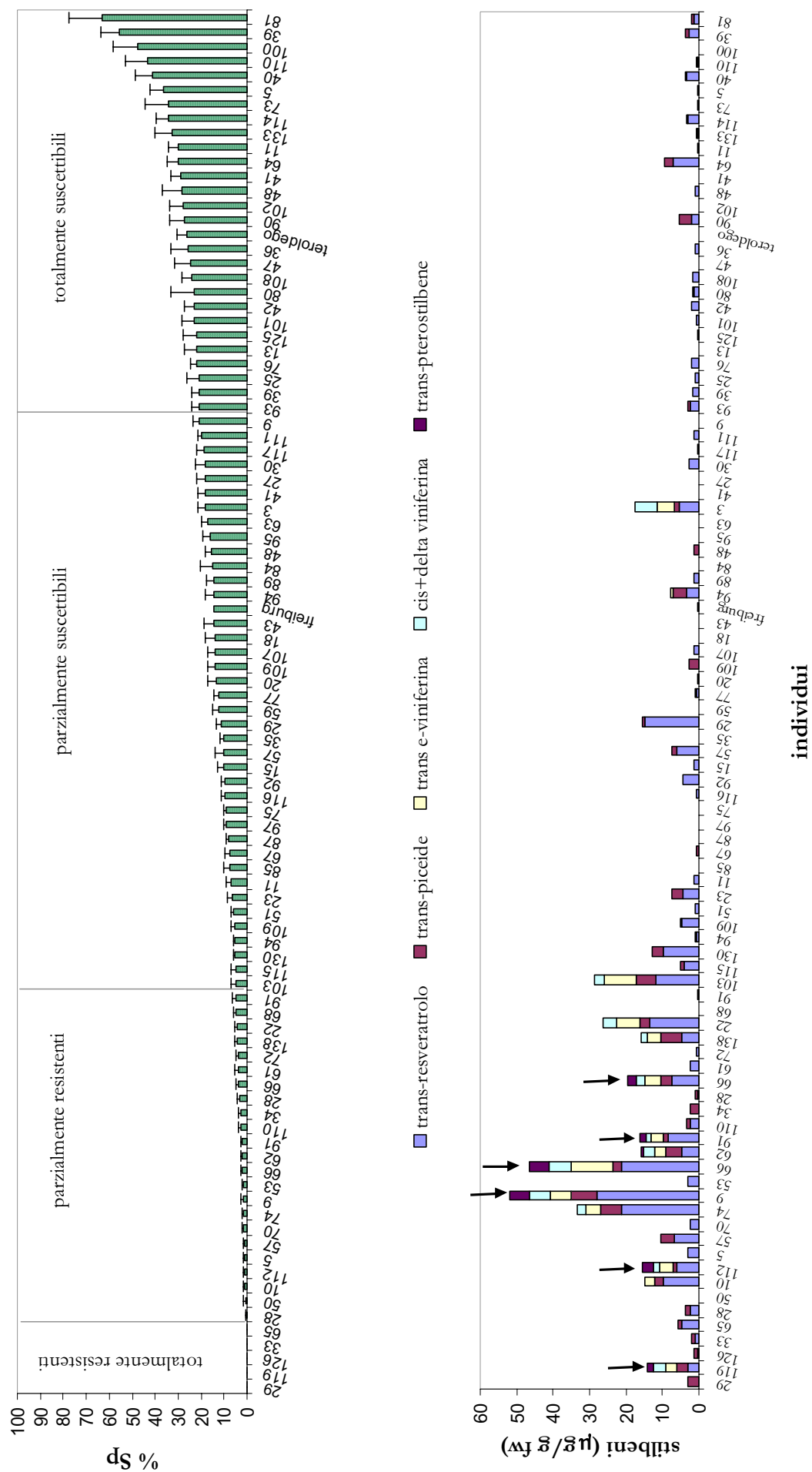


Figura 10 Profilo fenotipico (sopra) e metabolico (sotto) di 95 tra i 105 individui della progenie più i due parentali (Freiburg 993-60 e 'Teroldego'). Con le frecce vengono indicati gli individui che presentano tutti e 5 gli stilbeni.

Tabella 19 Contenuto in stilbeni nella terza foglia dei 17 individui “alto produttori” e dei genitori Freiburg 993-60 e ‘Teroldego’ a 6gg dall’infezione con *P. viticola*.

Filare/genotipo	<i>trans</i> -piceide	<i>trans</i> -resveratrolo	<i>trans</i> - <i>c</i> -viniferina	<i>trans</i> + <i>cis</i> - <i>d</i> -viniferina	<i>trans</i> -pterostilbene
21/138	5,8 ± 0,4	nq	3,6 ± 0,2	1,7 ± 0,0	0,1 ± 0,0
22/66	2,9 ± 0,1	7,5 ± 0,5	4,4 ± 0,3	2,5 ± 0,2	2,2 ± 0,1
21/103	5,6 ± 0,3	11,7 ± 1,1	8,6 ± 0,7	2,9 ± 0,1	nq
21/66	2,4 ± 0,2	21,1 ± 2,3	11,6 ± 1,2	6,2 ± 0,4	5,3 ± 0,6
21/119	2,9 ± 0,1	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1
21/22	3,0 ± 0,2	13,3 ± 2,5	6,4 ± 0,5	3,5 ± 0,3	n.q
22/91	1,3 ± 0,0	8,4 ± 0,4	3,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,0
22/10	2,2 ± 0,1	9,8 ± 0,8	2,8 ± 0,0	nq	nq
22/62	4,4 ± 0,3	4,7 ± 0,3	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,2	0,7 ± 0,0
22/9	7,0 ± 0,5	27,9 ± 4,3	6,0 ± 0,3	5,6 ± 0,4	5,2 ± 0,5
21/74	5,8 ± 0,4	21,2 ± 3,6	4,1 ± 0,1	2,2 ± 0,0	nq
21/3	1,3 ± 0,0	5,4 ± 0,5	4,9 ± 0,4	6,1 ± 0,4	nq
21/23	3,0 ± 0,2	4,4 ± 0,3	10,3 ± 1,0	nq	nq
21/130	3,2 ± 0,1	9,8 ± 0,9	4,5 ± 0,4	nq	nq
21/43	nq	nq	2,7 ± 0,2	nq	nq
21/94	3,8 ± 0,3	3,2 ± 0,2	0,9 ± 0,0	nq	nq
Teroldego	nq	nq	nq	nq	nq
Freiburg 993-60	nq	1,3 ± 0,0	nq	nq	nq

Ogni valore ($\mu\text{g/g fw}$) è il risultato della media di 3 repliche biologiche dello stesso genotipo $\pm$ l'errore standard. In grassetto sono evidenziati gli individui in cui sono stati rilevati tutti gli stilbeni; nq=non quantificabile.

Nei 17 individui “alto produttori di resveratrolo” è stato possibile identificare anche degli oligostilbeni e stilbenoidi probabilmente non ancora caratterizzati in vite. È stato quindi messo a punto un metodo per isolare questi composti partendo da un estratto fogliare grezzo.

4.2.3 MESSA A PUNTO DI UN METODO DI ISOLAMENTO DI VINIFERINE NON CARATTERIZZATE IN VITE

Per cercare di isolare i composti stilbenici non ancora caratterizzati è stato necessario ottenere la maggior quantità possibile di materiale fogliare inoculato con il patogeno fungino, data la bassa concentrazione dei composti stilbenici in foglia. È stato quindi eseguito un “pooling” di foglie infettate dei 17 individui della progenie, risultati “alto produttori” di *trans*-resveratrolo, ed è stato ottenuto un estratto grezzo fogliare da cui partire per l'isolamento degli stilbeni.

Mediante HPLC-DAD, a partire dell'estratto grezzo fogliare, è stato ottenuto il cromatogramma UV-VIS a 280 nm di Figura 11. È stata così confermata la presenza di composti stilbenici non ancora caratterizzati (picchi 1, 2, 3).

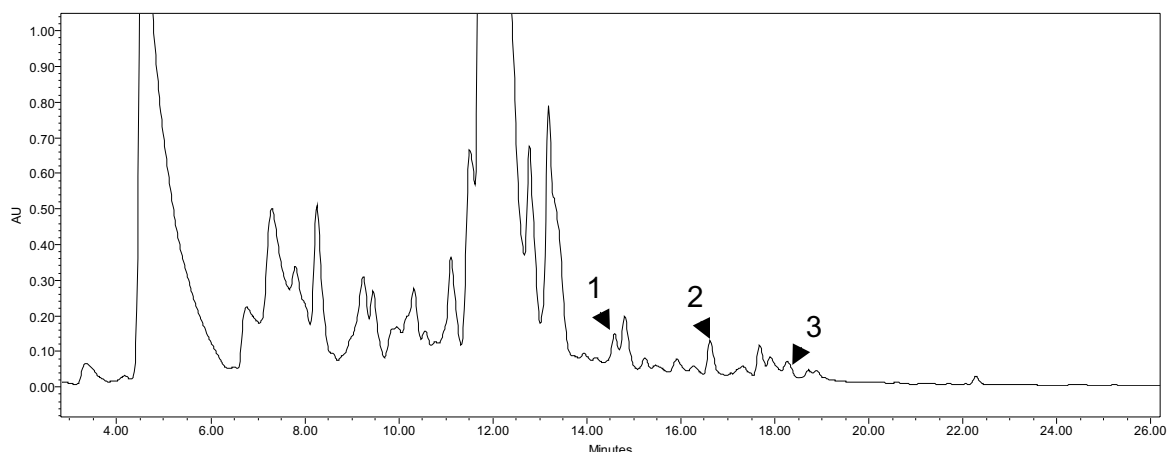


Figura 11 Cromatogramma (A_{280}) del primo estratto fogliare ottenuto dai 17 individui “alto produttori”. I picchi contrassegnati dai numeri 1-2-3- sono composti stilbenici non ancora identificati.

Allo scopo di ottenere un estratto arricchito nei composti dei picchi 1, 2, 3, sono stati eseguiti due passaggi di purificazione dell'estratto grezzo con cromatografia *flash* su resina Isolute ENV+ e su resina Toyopearl in HPLC preparativo. È stato così possibile eliminare le frazioni contenenti i composti non stilbenici più polari (carboidrati e clorofilla), aumentare il segnale dei composti 1,2,3 e rilevare altri due picchi (N_1 e N_2), prima non visibili in quanto co-eluiti assieme ad altri composti (Figura 12).

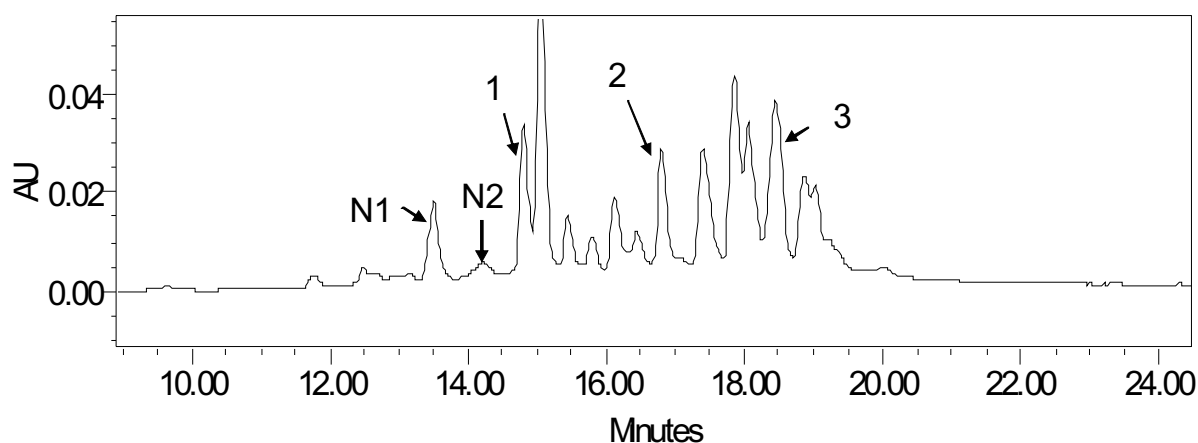


Figura 12 Cromatogramma (A_{280}) delle frazioni contenenti stilbeni ottenute dopo cromatografia *flash* su resina Isolute ENV+ e su resina Toyopearl in HPLC preparativo.

Allo scopo infine di isolare una quantità sufficiente di ciascun picco, da sottoporre poi ad analisi HPLC-DAD-MS, il “pool” di frazioni arricchite in stilbeni è stato purificato tramite la

colonna Discovery HS C18 in HPLC preparativo. Data la minor risoluzione della colonna preparativa rispetto a quella analitica alcuni picchi sono risultati non puri (Figura 13).

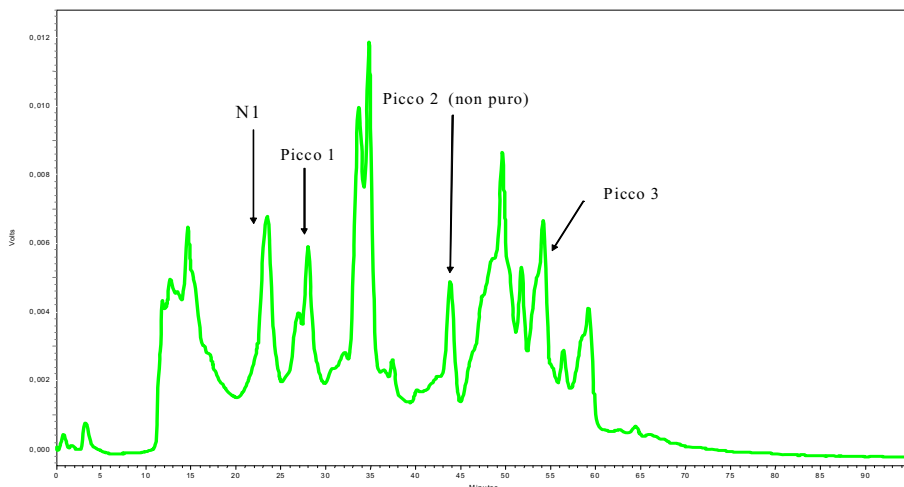


Figura 13 Cromatogramma della separazione finale su colonna Discovery HS C18 in HPLC preparativo.

L'identificazione dei singoli composti è stata fatta iniettando in HPLC-DAD-MS ogni singola frazione eluita in corrispondenza dei picchi e registrando per ognuno gli spettri UV-VIS e di massa.

L'analisi degli spettri ottenuti ha evidenziato che:

- il picco 1 corrisponde ad un deidrodimero del resveratrolo in configurazione *cis*;
- il picco 2 corrisponde ad un tetramero del resveratrolo in configurazione *cis*;
- il picco 3 corrisponde ad un deidrodimero del resveratrolo in configurazione *trans*;
- N₁ e N₂ corrispondono a due dimeri (m/z 453), con due protoni in meno rispetto a ϵ - e δ -viniferine (m/z 455), entrambi in configurazione *cis*.

Per un'identificazione univoca i composti isolati dovranno essere caratterizzati tramite spettroscopia NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

4.3 RELAZIONE TRA LA RESISTENZA ALLA MALATTIA ED IL CONTENUTO IN STILBENI

Con lo scopo di valutare la relazione tra la percentuale di area fogliare infetta e il contenuto in stilbeni, è stata compiuta un'analisi statistica di correlazione.

Dato il numero elevato di individui con un livello di *trans*- ϵ -viniferina, *trans*+*cis*- δ -viniferina e *trans*-pterostilbene sotto il limite di quantificazione, l'analisi di correlazione è stata possibile solo a partire dai dati del contenuto in *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide.

L'analisi è stata eseguita sia considerando solo gli individui con un contenuto in *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide sopra al limite di quantificazione, sia considerando tutti gli individui (sotto il limite di quantificazione è stato attribuito un valore pari a 0).

In entrambi i casi è stata ottenuta una correlazione negativa significativa tra percentuale di superficie sporulante (%Sp) e il contenuto ($\mu\text{g/g fw}$) in *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide. In particolare i risultati a maggiore significatività sono stati ottenuti con un modello di regressione non lineare, cubico ed esponenziale, come mostrato in Figura 14 e Figura 15.

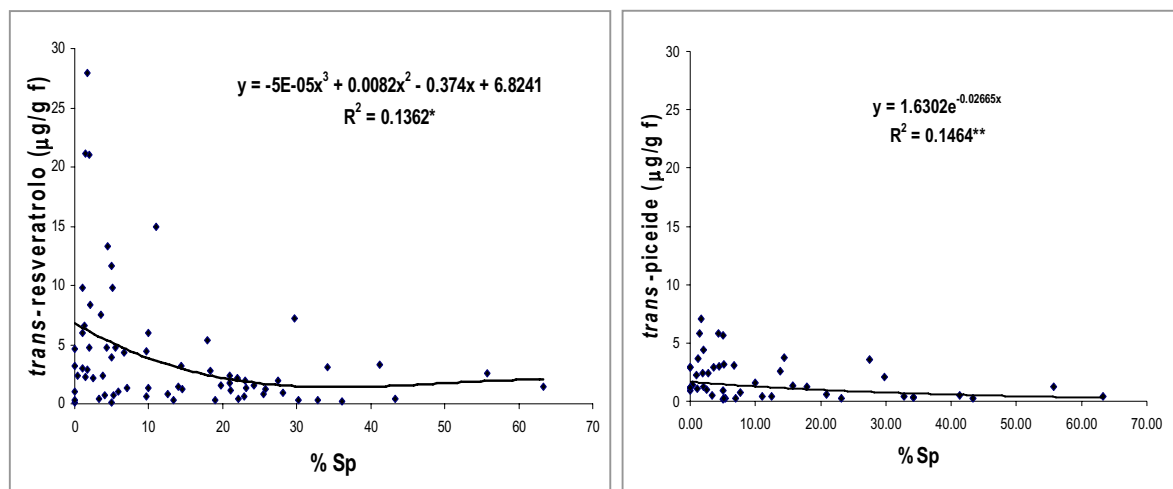


Figura 14 Relazione tra la percentuale di area infetta (%Sp) e il contenuto di *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide ($\mu\text{g/g fw}$) considerando solo gli individui con un contenuto >LQ. Le curve sono descritte dalle funzioni riportate nel grafico. Legenda: ** significatività a $p < 0,01$; *significatività a $p < 0,5$.

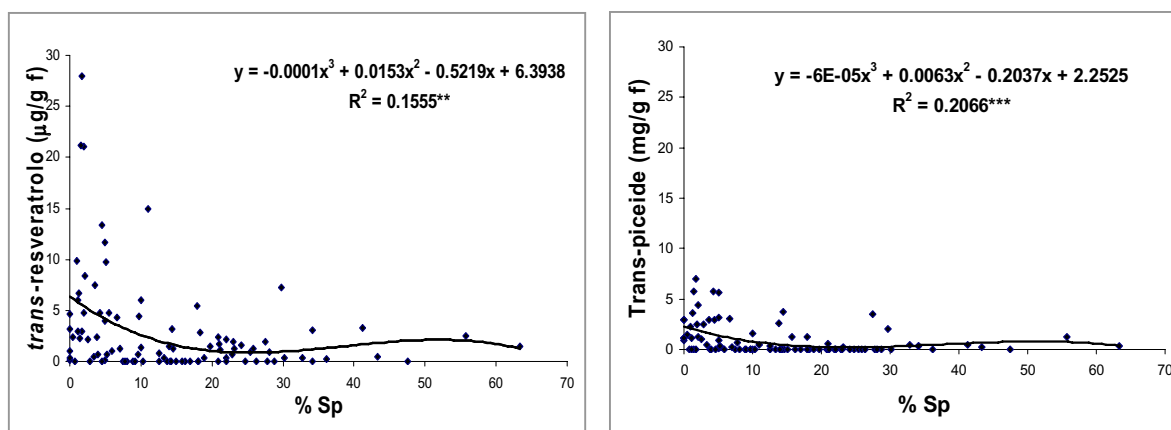


Figura 15 Relazione tra la percentuale di area infetta (%Sp) e il contenuto di *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide ($\mu\text{g/g fw}$) considerando tutti gli individui. Le curve sono descritte dalle funzioni riportate nel grafico. Legenda: *** significatività a $p < 0,001$; **significatività a $p < 0,01$.

4.4 ANALISI DEI PROFILI TRASCRIZIONALI NELL'INTERAZIONE VITE-*P. VITICOLA*

4.3.1 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DA TESSUTO FOGLIARE DI VITE

Per le analisi di espressione genica l'RNA totale è stato estratto con il metodo del borato caldo a partire dalla seconda e terza foglia degli individui oggetto di studio. La scelta della seconda e terza foglia è stata fatta sulla base di risultati biochimici, in cui si è evidenziato come tali foglie accumulassero più stilbeni delle altre. Le rese sono state tra 50 e 240 µg/g di tessuto di partenza e le quantità totali da un minimo di 20 ad un massimo di 80 µg. L'integrità dell'RNA totale è stata valutata mediante separazione elettroforetica in gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro. Come mostrato in Figura 16 tutti gli RNA isolati presentano due bande nette corrispondenti all'RNA ribosomale, indicando un prodotto di estrazione integro ed esente da contaminazioni da parte di polisaccaridi.

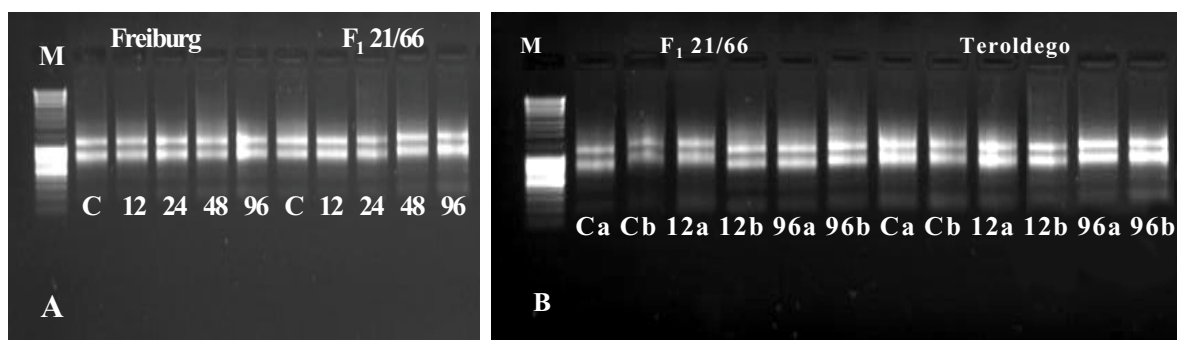


Figura 16 Separazione elettroforetica in gel di agarosio di RNA totale estratto da campioni fogliari. A) campioni controllo (C) e trattati (12, 24, 48, 96 hdi con *P. viticola*) di Freiburg 993-60 e F₁ 21/66 usati nell'analisi AFLP-TP; B) 2 repliche biologiche dei campioni controllo (Ca e Cb) e dei campioni trattati (12 e 96 hdi con *P. viticola*) di F₁ 21/66 e Teroldego usati nell'analisi "microarray". M= marcatore di peso molecolare

La qualità e la resa del processo di estrazione sono state anche valutate tramite misure spettrofotometriche, ottenendo dei rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} maggiori di 2 (in Tris-HCl EDTA pH 8,0); questi valori indicano una trascurabile contaminazione dell'RNA da parte di proteine, polisaccaridi e polifenoli.

4.3.2 ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI UN SET DI BANDE DIFFERENZIALMENTE ESPRESSE TRAMITE ANALISI AFLP-TP

Tramite la tecnica AFLP-TP è stato determinato il profilo di espressione genica della seconda e terza foglia di Freiburg 993-60 e dell'individuo F₁ 21/66, campionate a 12, 24, 48, 96 h dall'infezione con *P. viticola* (trattati) e di foglie degli stessi individui spruzzate con acqua (controlli).

Dal punto di vista fenotipico le foglie di Freiburg 993-60 dopo infezione hanno manifestato una risposta intermedia di resistenza, con clorosi alternata a necrosi, ed una certa variabilità tra le repliche in esame, mentre l'individuo F₁ 21/66 è risultato totalmente resistente, con aree necrotiche associate ad HR su tutte le repliche inoculate.

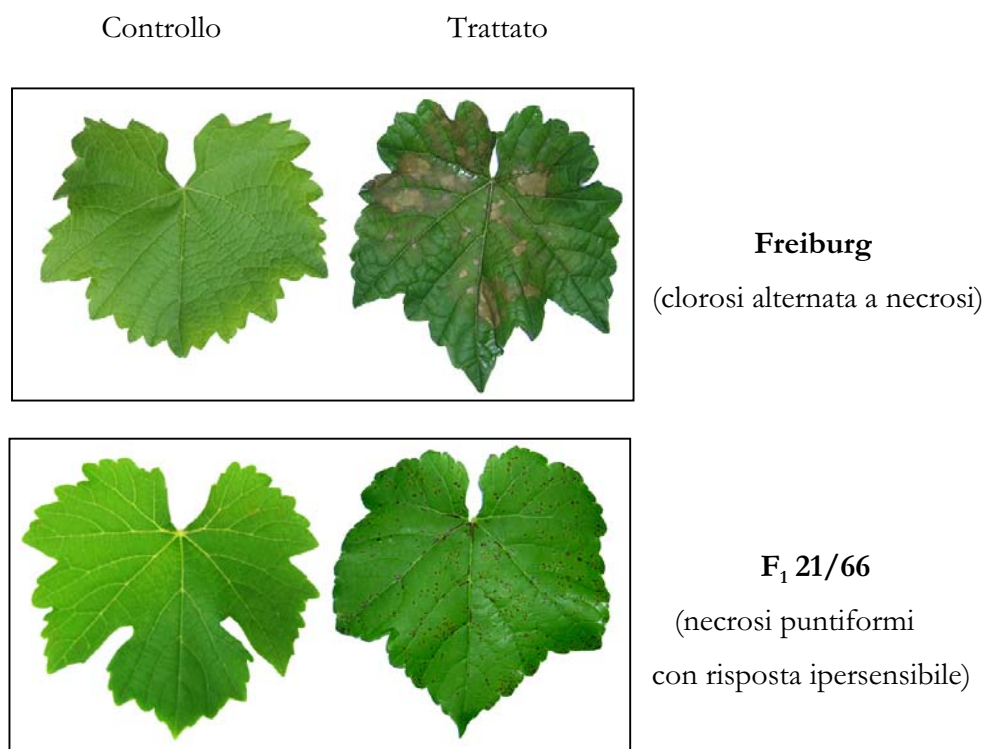


Figura 17 Campioni utilizzati nell'analisi AFLP-TP. Sintomatologia sulla pagina fogliare superiore nel controllo (dopo spruzzo con acqua) e nel trattato (10gg dopo infezione con *P. viticola*).

L'RNA totale (10 µg) di ciascun campione è stato retro-trascritto per la produzione di cDNA biotinilato, che è stato quindi sottoposto a due digestioni successive con gli enzimi di restrizione BstYI e MseI.

I frammenti generati sono stati ligati a degli adattatori di sequenza nota, complementari alle estremità coesive dei frammenti lasciate dalle reazioni di taglio, e quindi pre-amplificati, tramite PCR, utilizzando combinazioni di “primer” non selettivi. Questa fase consente di compiere una prima selezione dei frammenti presenti nella miscela e di aumentare la concentrazione di quelli selezionati.

I prodotti della reazione di pre-amplificazione sono stati utilizzati come template per reazioni di amplificazione, tramite PCR, con combinazioni di “primer” selettivi per ridurre il numero di frammenti da separare poi su gel di poliacrilammide.

In totale sono state testate 128 combinazioni di “primer” selettivi ed i prodotti di ogni amplificazione selettiva sono stati infine separati su gel di poliacrilammide al 6% e visualizzati per autoradiografia.

Prima di estendere l’analisi a tutte le 128 combinazioni di “primer”, la riproducibilità dei dati di AFLP-TP è stata validata mediante amplificazione con 6 combinazioni selettive a partire dal prodotto di pre-amplificazione ottenuto in due reazioni indipendenti. Come si può vedere dall’autoradiografia di Figura 18 la riproducibilità delle bande nelle due prove è molto elevata (>98%).

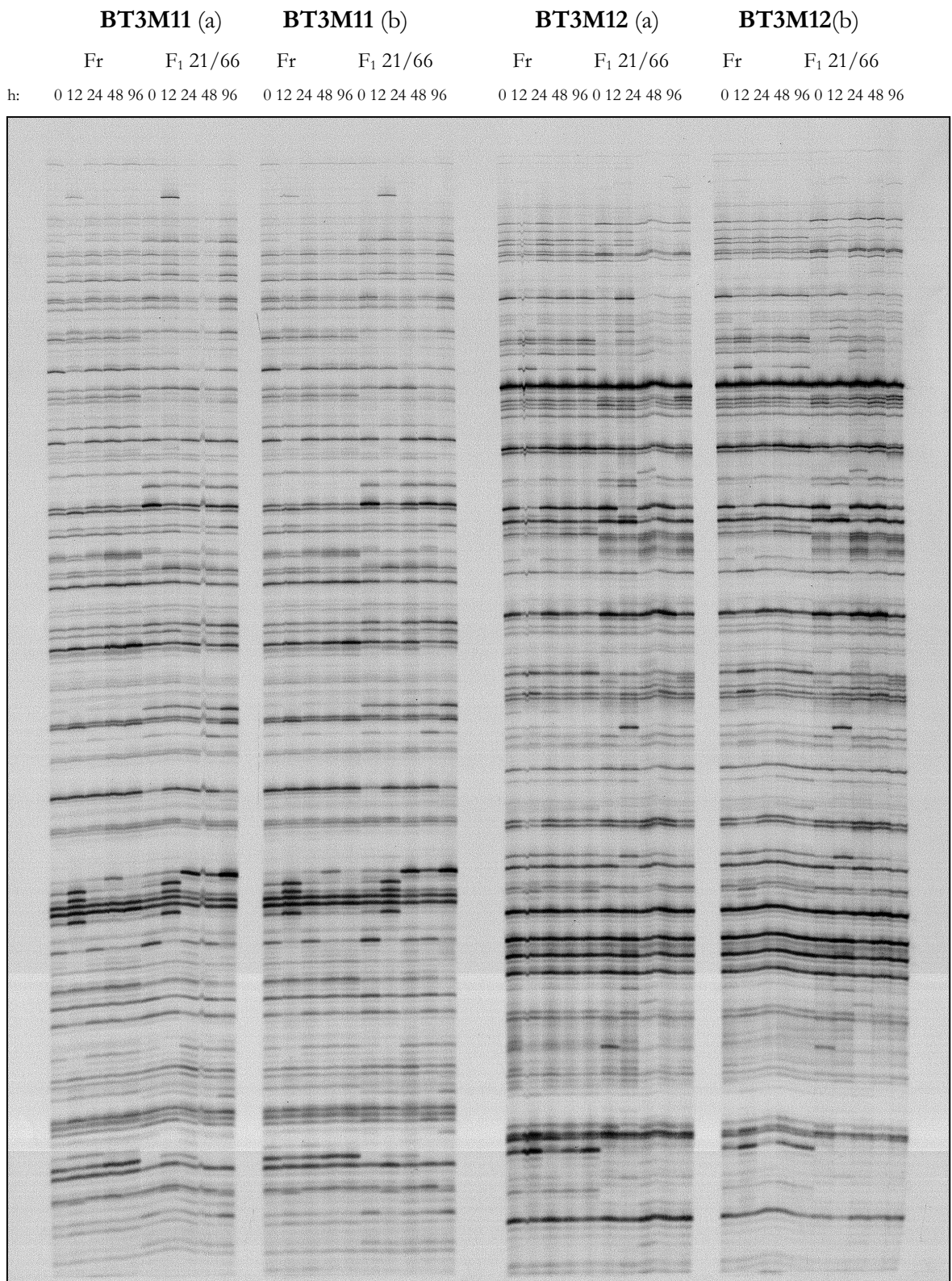


Figura 18 Prova di riproducibilità degli esperimenti di AFLP-TP: separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide al 6% dei prodotti di amplificazione ottenuti con due combinazioni di “primer” selettivi (BT3M11 e BT3M12) a partire dal prodotto di pre-amplificazione ottenuto in due reazioni indipendenti (a) e (b). Fr=Freiburg

La lettura dei risultati di AFLP-TP è stata fatta mediante osservazione delle autoradiografie, annotando con valori numerici di -1 o +1 le bande la cui intensità risultasse inferiore o superiore rispettivamente a quella del controllo corrispondente (valore=0). I confronti sono stati fatti tra tempi diversi dall'infezione, all'interno dello stesso individuo e tra i due individui. Dall'analisi condotta con 128 combinazioni di "primer" selettivi è stato possibile seguire il profilo di espressione di circa 8.000 trascritti, con una media di 60 frammenti per combinazione, variabili nella taglia, da 50 pb a 600 pb. Complessivamente sono stati individuati quattro tipi di profilo di espressione, considerando trascritti positivamente o negativamente modulati nei due genotipi o in un solo genotipo (Figura 19).

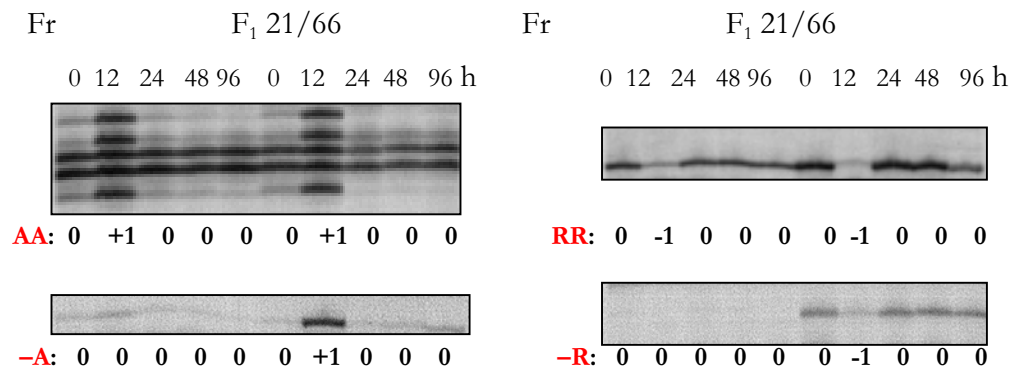


Figura 19 Esempi di alcuni profili di espressione osservati nei due individui (Fr e F₁ 21/66) ai diversi tempi dopo infezione con *P. viticola*. I numeri in grassetto corrispondono alla codifica del livello di espressione relativa di ciascuna banda. Sopra: profili di trascritti attivati e repressi in entrambi gli individui (AA e RR). Sotto: profili di trascritti attivati e repressi in uno solo dei due individui (-A e -R).

L'analisi dei profili ha quindi permesso di identificare 458 frammenti, derivanti da trascritti, con un profilo di espressione differenziale nel singolo individuo e/o nei due individui. Complessivamente i trascritti indotti (68%) sono risultati più numerosi di quelli repressi (32%).

I profili dei trascritti identificati come differenzialmente espressi sono stati poi raggruppati in "cluster" di co-espressione, in base alla cinetica di modulazione dopo l'infezione con il fungo, mediante un "clustering" gerarchico (Eisen *et al.*, 1998) (Figura 20).

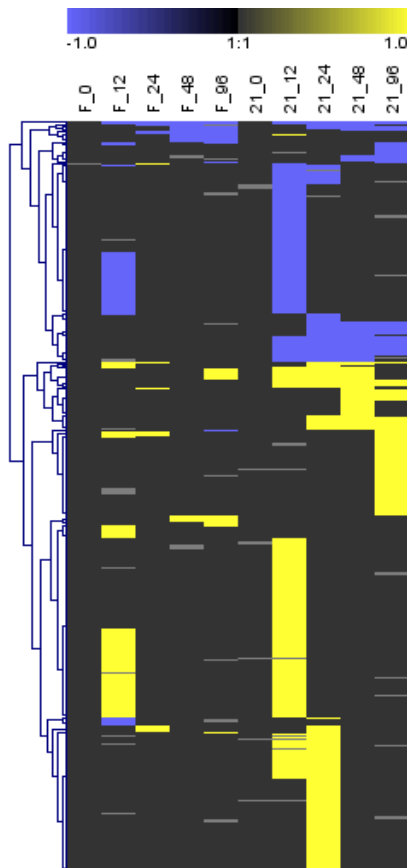


Figura 20 Grafico dei profili di espressione osservati nell'analisi AFLP-TP. I colori giallo e blu indicano rispettivamente i geni indotti e repressi nei diversi tempi successivi all'infezione con *P. viticola* nei due genotipi o in uno solo dei due .

Dopo aver riunito i trascritti regolati positivamente o negativamente ad un tempo dall'infezione con *P. viticola*, è stato quindi possibile individuare 10 gruppi principali di co-modulazione. I risultati della distribuzione dei 458 trascritti con profilo differenziale nei 10 gruppi sono stati riassunti in Tabella 20.

Gruppo di co-modulazione	Ore dall'infezione	% trascritti
I	12	43
II	24	14
III	48	2
IV	96	14
V	12-24	9
VI	24-48	1
VII	12-24-48	2
VIII	48-96	4
IX	24-48-96	5
X	12-24-48-96	4

Tabella 20 Rappresentazione schematica della distribuzione dei 458 trascritti con profilo differenziale in 10 gruppi di co-modulazione.

Dopo aver valutato le percentuali di distribuzione dei trascritti, è emerso che la maggior parte dei trascritti (68%) ha una modulazione precoce (entro le 12h), il 63% dei quali si spegne entro le 24 h. Inoltre il 29% dei trascritti presenta una modulazione più tardiva (a partire dalle 48 h), il 48% dei quali è esclusivamente regolato a 96 h dall'infezione fungina.

Inoltre distinguendo all'interno dei 10 gruppi di comodulazione tra trascritti differenzialmente espressi in entrambi gli individui o in uno solo dei due, è emerso che il 72 % risulta modulato solo nell'individuo F₁ 21/66 e il 20% in entrambi (Figura 22).

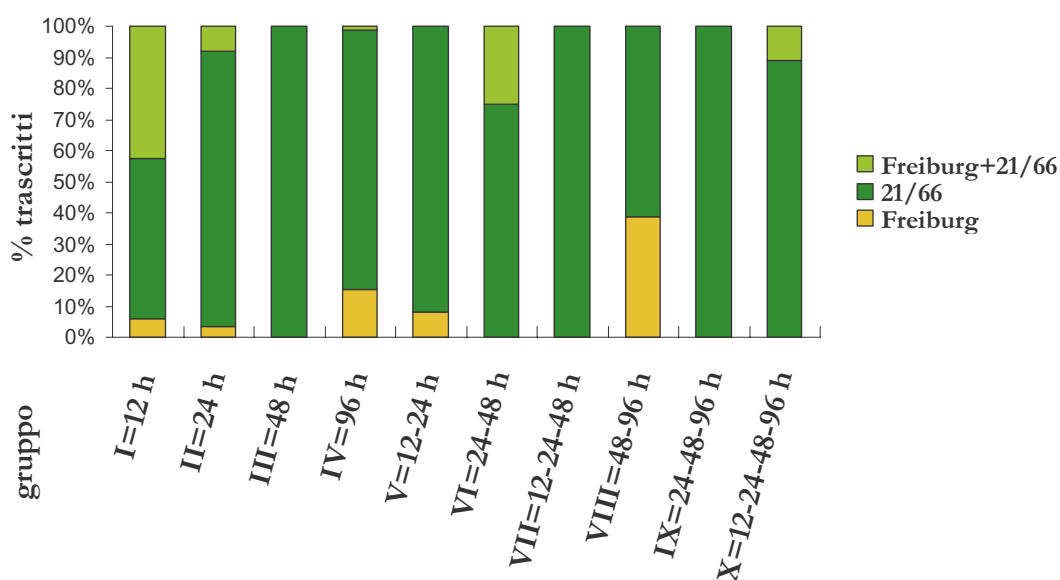


Figura 21 Grafico della distribuzione dei trascritti, modulati in entrambi gli individui (Freiburg e F₁ 21/66) o in uno solo, tra i dieci gruppi di co-modulazione.

RIAMPLIFICAZIONE DELLE BANDE ISOLATE DA GEL E LORO CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Le 458 bande differenziali identificate dall'analisi dei profili ottenuti con la tecnica AFLP-TP sono state isolate da gel ed eluite in TE.

Il DNA eluito è stato quindi utilizzato come template per la riamplicazione delle bande tramite reazione PCR, utilizzando gli stessi “primer” con basi selettive precedentemente utilizzati nell'analisi AFLP-TP.

I prodotti della reazione di PCR sono stati separati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% per verificare la presenza di un prodotto delle dimensioni corrette. Questi prodotti sono

stati poi utilizzati nella reazione di sequenziamento, dopo quantificazione e purificazione enzimatica (ExoSAP-IT).

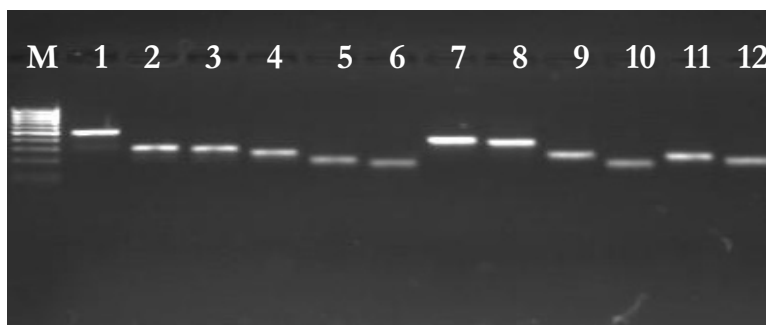


Figura 22 Separazione elettroforetica su gel di agarosio all'1% dei prodotti della riamplicazione delle bande eluite da gel. M= marcatore di peso molecolare.

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEI TRASCRITTI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI MEDIANTE ANALISI BIOINFORMATICA

Il sequenziamento diretto dei prodotti PCR purificati corrispondenti ai 458 trascritti differenzialmente espressi, ha fornito sequenze di buona qualità nel 70% dei casi (318). Per il rimanente 30% non è stato possibile ottenere sequenze uniche, probabilmente a causa di due o più frammenti co-migranti su gel di poliacrilammide.

Dall'allineamento delle 318 sequenze con quelle presenti in banche dati nucleotidiche (IASMA, <http://genomics.research.iasma.it> e GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) e proteiche (UniProt, www.ebi.uniprot.org) è emerso che il 23% di esse (73) non ha trovato una sequenza omologa in base alla soglia di similarità definita nell'analisi ($E < 10^{-10}$ e identità $> 90\%$; $E < 10^{-6}$ e identità $> 40\%$) ed è stato catalogato come “no hit found”.

Le 245 sequenze rimanenti (77%) sono state annotate funzionalmente tramite i termini definiti nel vocabolario di Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org>) allo scopo di individuare quali processi biologici fossero maggiormente coinvolti nella risposta al fungo.

I risultati della procedura di annotazione funzionale ottenuti in automatico sono stati successivamente analizzati manualmente utilizzando la conoscenza presente in letteratura. Complessivamente alle 245 sequenze sono state assegnati 297 termini GO dell'ontologia *biological_process*, compresi i termini *biological process unknown*, di cui 205 a sequenze indotte e 92 a sequenze represses.

Tutte le sequenze così annotate sono state raggruppate poi in 9 categorie funzionali corrispondenti a termini GO dell'ontologia *biological_process* più generici rispetto a quelli utilizzati per descrivere le singole sequenze (Figura 23).

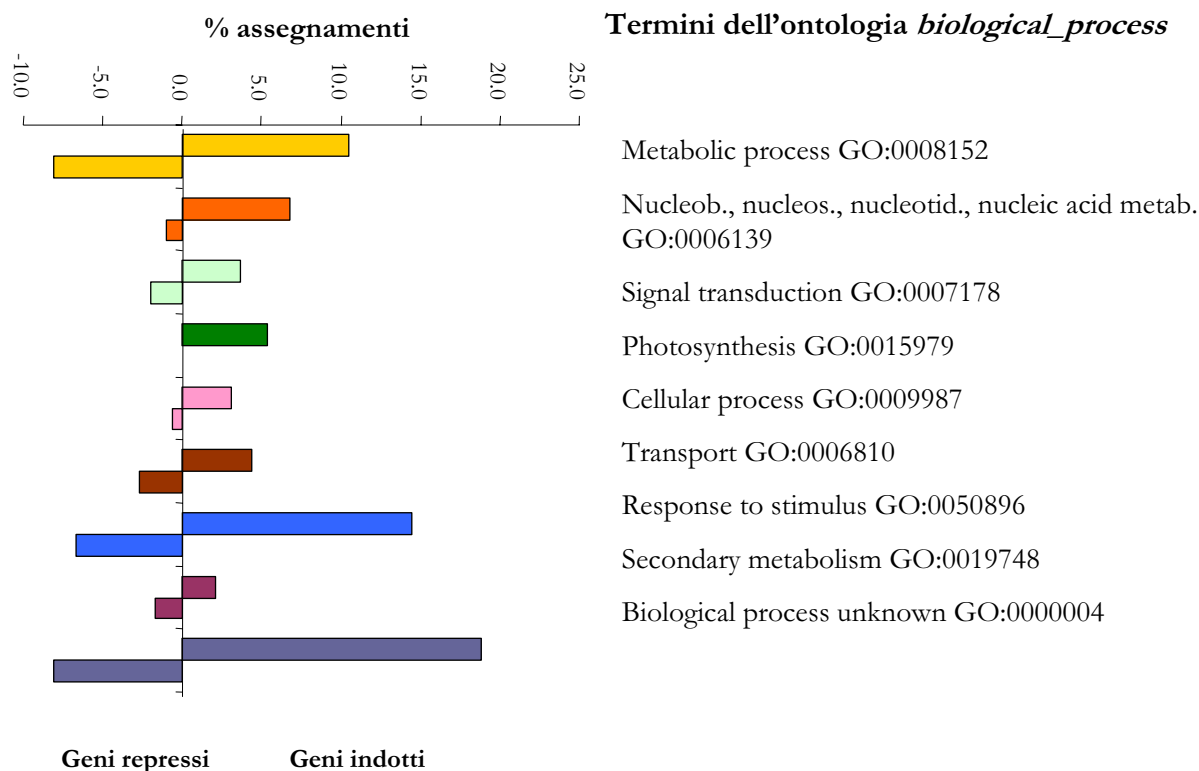


Figura 23 Annotazione in categorie funzionali (GO) dei trascritti indotti e repressi identificati mediante AFLP-TP.

Dall'analisi del grafico di distribuzione delle categorie funzionali emergono i seguenti risultati:

- la categoria funzionale “*response to stimulus*”, comprendente geni codificanti proteine di risposta a stimoli biotici, abiotici ed endogeni, è la più rappresentata (21,2%): il 14,5 % sono sequenze indotte e il 6,7% sono sequenze represses;
- la seconda categoria più numerosa è quella definita “*metabolic process*” (18,5%): essa include geni codificanti proteine coinvolte nel metabolismo dei carboidrati, proteico ed aminoacidico e lipidico. Circa metà di queste sequenze (10,4%) risultano indotte, le rimanenti (8,1%) sono invece represses ;
- la classe “*photosynthesis*” (5,4%), rappresentata esclusivamente da sequenze indotte, comprende geni codificanti proteine costituenti i fotosistemi primario e secondario e proteine leganti clorofilla a/b;
- la classe “*signal transduction*” (5,7%), che include geni codificanti proteine, come le chinasi in serina e treonina, coinvolte nella modificazione per fosforilazione di

- proteine a valle, è rappresentata rispettivamente da 3,7% di sequenze indotte e da 2% di sequenze repressi;
- le altre classi corrispondono alla classe “*nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism*” (7,7%), comprendente geni codificanti per fattori di trascrizione o proteine coinvolte nel metabolismo degli acidi nucleici (6,7% indotti e 1% repressi), la classe “*cellular process*” (3,7%) con geni codificanti proteine coinvolte nella biogenesi ed organizzazione cellulare (3% indotti e 0,7% repressi), infine le classi “*transport*” (7,1%) e “*secondary metabolism*” (3,7%) a cui sono stati ascritti rispettivamente geni codificanti per proteine coinvolte nei meccanismi di trasporto (di cui 4,4% indotti e 2,7% repressi) e nel metabolismo secondario, principalmente fenilpropanoidico (di cui 2% indotti e 1,7% repressi);
 - il 27% delle sequenze infine appartiene alla categoria “*biological process unknown*”, di cui il 18,9% indotte e l’8,1% repressi.

L’analisi di distribuzione in categorie funzionali è stata compiuta anche considerando separatamente le fasi temporali precoce e tardiva (12 hdi e 96 hdi), avvalendosi della suddivisione in gruppi di co-modulazione dei trascritti differenzialmente espressi. I due tempi scelti sono risultati infatti quelli più significativi per numero di trascritti modulati (Figura 24).

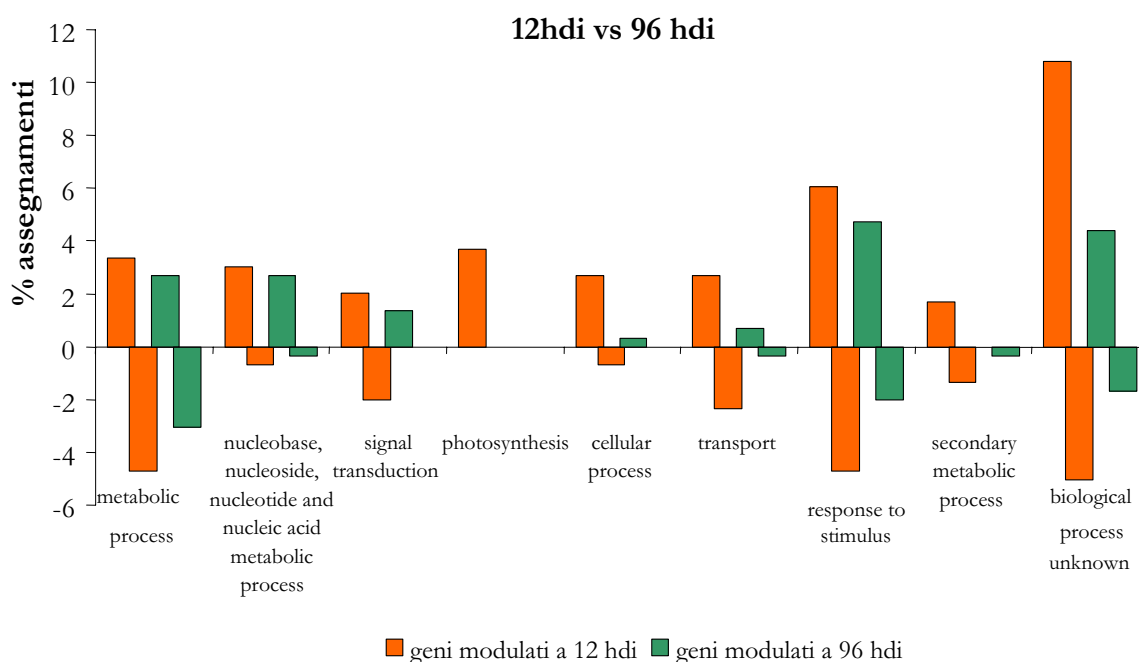


Figura 24 Distribuzione nelle 9 categorie funzionali dei trascritti indotti e repressi a 12h (gruppi I, V, VII, X) e 96h (gruppi IV, VIII, IX, X) dall'infezione con *P. viticola*.

Come si evince dal grafico in Figura 24 le categorie “*metabolic process*”, “*nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism*” e “*response to stimulus*” sono le più rappresentate, sia da geni indotti che repressi in entrambi le fasi, precoce e tardiva, mentre la categoria “*photosynthesis*” è rappresentata solo da geni indotti in fase precoce.

Complessivamente i risultati relativi all'identificazione e caratterizzazione funzionale dei frammenti differenzialmente espressi, isolati nell'analisi AFLP-TP, sono riassunti nelle tabelle A e B in appendice.

VALIDAZIONE DEI PROFILI DI ESPRESSIONE TRAMITE “REAL-TIME RT-PCR”

Con lo scopo di validare i risultati ottenuti con la tecnica AFLP-TP, il profilo di espressione di 15 geni che sono risultati modulati in questa analisi ed appartenenti alle classi “*response to stimulus*” e “*secondary metabolism*”, è stato determinato tramite “Real-time RT-PCR”. A partire dai campioni di RNA utilizzati nell'analisi AFLP-TP è stato sintetizzato il cDNA che è stato usato come template in ciascuna reazione di “Real-time RT-PCR” in presenza di “primer” specifici disegnati sulle sequenze ottenute dall'analisi delle bande AFLP-TP.

La Tabella 21 riporta per ogni gene il rapporto tra il livello di espressione nei campioni trattati e quello nel campione controllo (“fold-change”) per entrambi gli individui. Ogni valore è stato calcolato con la formula di Pfaffl (Pfaffl, 2001), prendendo come campione calibratore il campione controllo e come gene di riferimento l'actina di vite.

In tabella vengono anche descritti in modo schematico i profili di espressione ottenuti in AFLP-TP.

Come si può notare, nella maggior parte dei casi i profili di espressione ottenuti con “Real-time RT-PCR” rispecchiano quelli ottenuti con AFLP-TP.

Tabella 21 Confronto tra il profilo AFLP-TP e quello di “Real-time RT-PCR” nei campioni fogliari trattati con *P. viticola* (12-24-48-96 hdi) e nel controllo in entrambi gli individui.

Frammento cDNA-AFLP	Descrizione ¹	F					F1 66				
		C*	12 hdi	24 hdi	48 hdi	96 hdi	C*	12 hdi	24 hdi	48 hdi	96 hdi
BC2M11-309	Putative relA/spoT homologous protein RSH2										
		1.0	1.2	1.3	0.7	0.5	1.0	1.4	0.6	1.0	0.6
BT3M33-232	Putative GDLS-motif lipase/acylhydrolase										
		1.0	0.7	1.3	1.0	0.6	1.0	2.4	3.6	0.4	0.4
BC1M31-391	PVR3-like protein (Fragment)										
		1.0	2.4	2.3	0.5	0.5	1.0	2.4	0.4	2.5	4.3
BT4M12-88	P-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase isoform 1										
		1.0	2.4	1.3	0.9	0.8	1.0	2.4	0.2	0.2	0.0
BT3M11-6/8	Hypothetical protein F3C22_140										
		1.0	2.4	0.7	0.3	0.1	1.0	2.4	0.1	0.1	0.1
BC2M34-412	Putative ethylene response factor 5										
		1.0	1.1	2.2	0.8	0.8	1.0	0.5	0.7	1.0	10.8
BC3M43-454	Flavonoid 3', 5'-hydroxylase-like protein										
		1.0	0.7	1.6	0.9	0.6	1.0	0.1	0.4	1.3	0.2
BT2M14-75	Putative bHLH transcription factor										
		1.0	1.6	1.6	1.4	1.6	1.0	2.0	2.2	10.2	2.7
BT3M12-10	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K										
		1.0	1.4	1.3	0.9	0.5	1.0	0.6	0.9	1.3	4.1
BT1M13-32	NAC domain protein NAC1										
		1.0	9.8	11.2	1.6	2.6	1.0	0.2	0.4	1.1	6.4
BT2M13-72	Putative nitrilase-associated protein										
		1.0	1.8	1.6	0.8	0.9	1.0	3.0	1.1	2.6	0.4
BT3M34-239	Beta-1,3 glucanase										
		1.0	0.7	1.3	0.8	0.5	1.0	0.7	2.5	2.9	8.1
BC3M11-328	Putative WRKY4 transcription factor										
		1.0	1.3	5.4	1.8	1.2	1.0	0.9	2.7	3.3	4.4
BT2M14-76	Flavonol synthase (Fragment)										
		1.00	1.31	1.63	1.06	0.92	1.00	0.22	0.03	0.01	0.00

1 Definizione assegnata a ciascun frammento dopo analisi *blastx* (E-value<10⁻⁶, Id>40%) contro il database UniProt * C=campione controllo usato come calibratore. Sopra: profilo AFLP-TP (□ = non modulato, ■ = induzione; ■ = repressione) , sotto: "fold-change" ottenuti con “Real-time RT-PCR”

4.3.3 IDENTIFICAZIONE DI UN SET DI GENI CON VARIAZIONE DI ESPRESSIONE SIGNIFICATIVA TRAMITE ANALISI “MICROARRAY”

L'analisi di espressione genica di foglie infettate con *P. viticola* è stata ulteriormente approfondita nel corso di questo lavoro mediante l'utilizzo della tecnica “microarray”. Questa tecnica permette la quantificazione relativa e contemporanea di un elevato numero di trascritti e quindi risulta maggiormente informativa rispetto alla tecnica AFLP-TP.

Oggetto di questa indagine è stato il confronto tra l'individuo F₁ 21/66, resistente a *P. viticola*, e due individui suscettibili, in particolare il parentale ‘Teroldego’ e l'individuo della progenie F₁ 22/73 (Figura 25).

L'individuo F₁ 21/66 è stato scelto come rappresentativo della risposta di resistenza a *P. viticola* per il suo fenotipo di totale resistenza, per l'accumulo di fitoalessine e per l'ampia modulazione a livello trascrizionale riscontrata nell'analisi AFLP-TP.

Lo studio è stato quindi condotto ibridando dei “microarray” di tipo Combimatrix 4x2K[®] con RNA isolato da foglie di questi individui, prelevate rispettivamente 12 e 96 ore dopo infezione fungina. Questi tempi, come già evidenziato in AFLP-TP, sono quelli corrispondenti alla fase precoce e tardiva di modulazione genica.

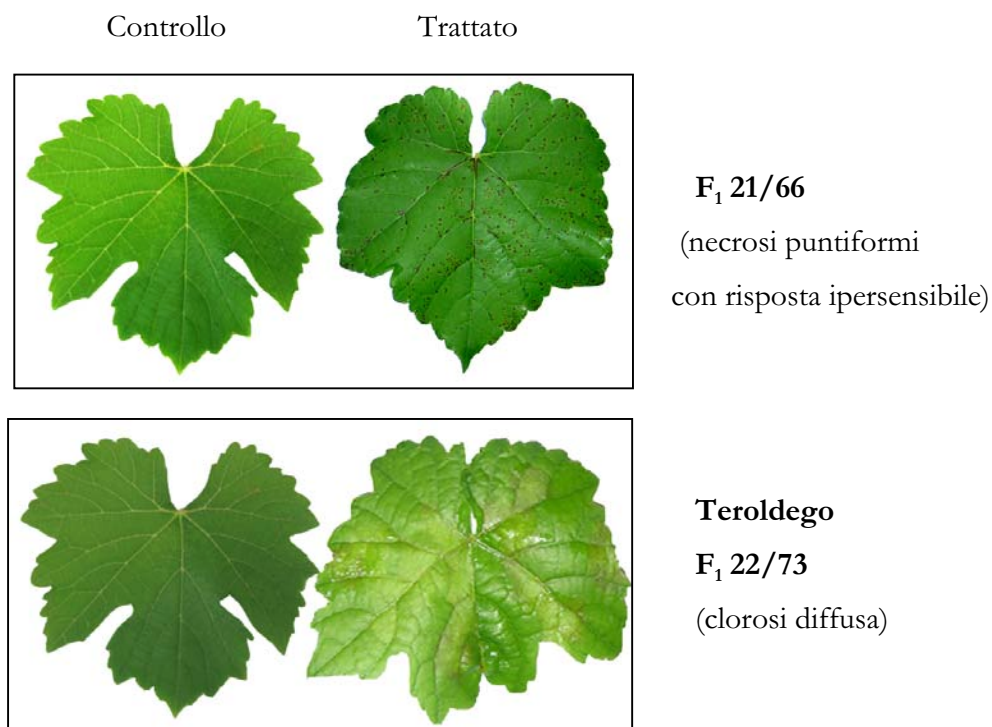


Figura 25 Campioni utilizzati nell'analisi “microarray”. Sintomatologia sulla pagina fogliare superiore nel controllo (dopo spruzzo con acqua) e nel trattato (10 gg dopo infezione con *P. viticola*).

Le 416 sequenze uniche fornite alla ditta Combimatrix (www.combimatrix.com) per la sintesi di 3 vetrini CustomArray™ 4x2K® erano così composte: 318 sequenze ricavate dalle bande differenziali di AFLP-TP, 86 corrispondenti a geni del metabolismo dei fenilpropanoidi e a geni relativi alla sintesi e risposta ad etilene, 4 corrispondenti a geni putativamente costitutivi ed 8 a sequenze di controllo (“spikes”). L’86% (356) di queste sequenze è risultato avere caratteristiche idonee al disegno dei “probe” specifici da 35-40 pb.

Inoltre non per tutte le sequenze è stato possibile disegnare 2 “probe” e per alcune sequenze i “probe” sono stati disegnati su entrambi i filamenti. Considerato che ogni “probe” è stato sintetizzato in duplicato, ognuno dei 4 “array” presenti sul vetrino 4x2K® conteneva un totale di 1629 “probe”, corrispondenti alle 356 sequenze.

Il disegno sperimentale delle ibridazioni prevedeva di analizzare due repliche biologiche (RB) per ogni campione (C) (controllo e trattati a 12e 96 hdi) e di eseguire ogni ibridazione in triplicato (T), per ogni individuo in studio (I). Questo ha comportato la sintesi di 18 sonde marcate e l’esecuzione di soli 15 esperimenti di ibridazione, invece di 54 (2 RB x 3 C x 3 T x 3 I), grazie alla presenza dei 4 “array” su ciascun vetrino.

Avendo a disposizione solo 3 vetrini, il numero totale di ibridazioni è stato ottenuto staccando la sonda marcata ad elevata temperatura (procedura di “stripping”) e riutilizzando fino a 10 volte lo stesso vetrino, tenendone uno di riserva.

Le immagini, acquisite per lettura del segnale di fluorescenza tramite l’apparato di scansione per “microarray” ScanArray4000XL sono risultate di ottima qualità ed hanno dimostrato l’efficacia dello “stripping”.

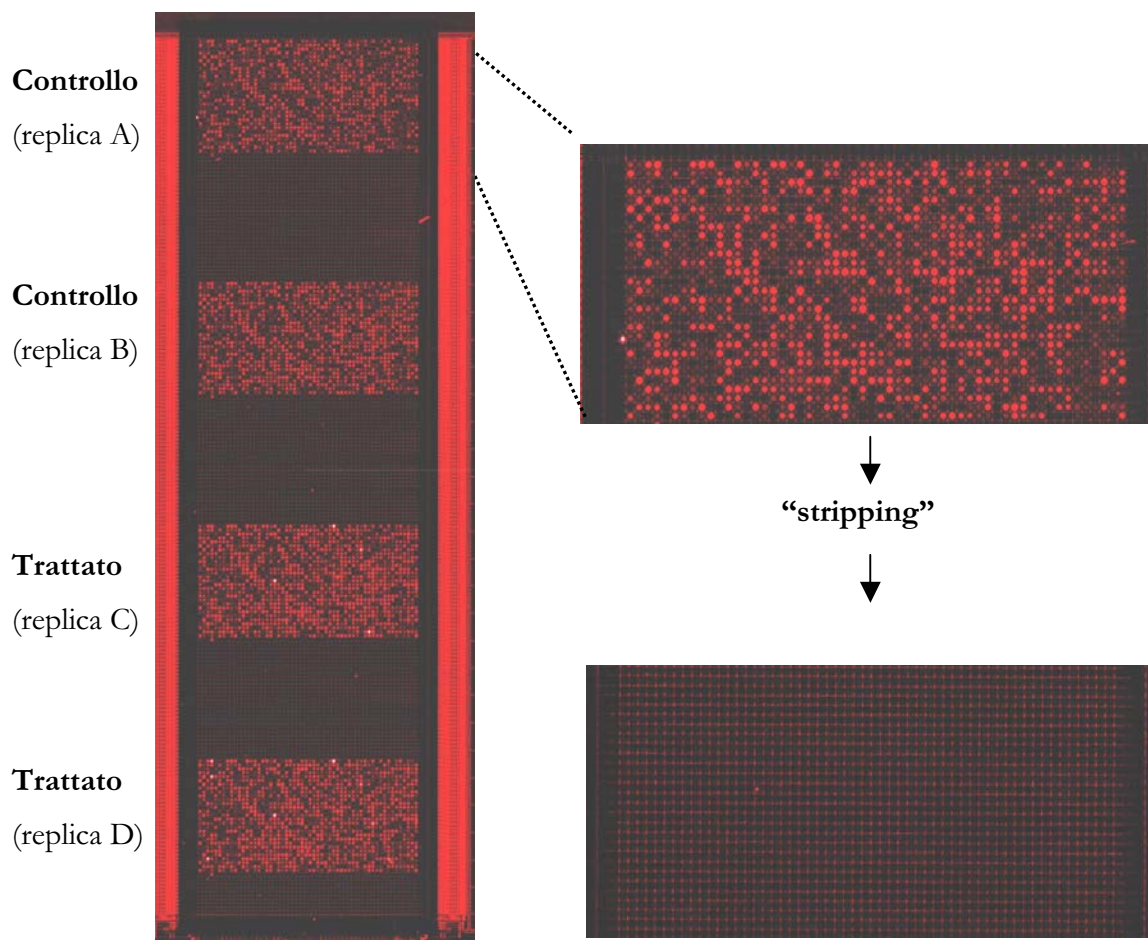


Figura 26 Sx: Esempio di immagine acquisita di un vetrino 4x2K® dopo ibridazione con due repliche biologiche del controllo (replica A e B) e del trattato a 12 h dall'infezione con *P. viticola* (replica C e D). **Dx:** particolare di uno dei 4 “array” dopo ibridazione e dopo “stripping”.

Dopo aver eseguito la quantificazione del segnale di fluorescenza di ciascuno “spot” con il programma MicroArray Imager™ (Combimatrix), eliminando gli “spot” di scarsa qualità, le intensità di fluorescenza sono state corrette in due fasi successive.

Nella prima fase è stata eseguita una normalizzazione globale tra “array” dello stesso vetrino e di vetrini diversi, considerando il valor medio di intensità di fluorescenza di ciascun “array”.

In una seconda fase i valori di intensità dei singoli “spot” così corretti, sono stati ulteriormente normalizzati utilizzando dei geni costitutivi presenti su vetrino ed alcuni controlli commerciali eterologhi. Sono stati così ottenuti i valori normalizzati di espressione per ciascun “probe” nel campione controllo e nei trattati.

Per verificare l'efficacia della procedura di normalizzazione e per valutare la quantità di “spot” modulati in seguito al trattamento, il logaritmo dei valori di espressione (ExpV) del campione controllo è stato confrontato con quello del relativo campione trattato in un grafico di tipo “scatterplot”. In particolare in rosso sono stati evidenziati gli “spot” con variazione di

espressione tra trattato e controllo (“fold-change”) maggiore di 1,5, in verde gli “spot” con “fold-change” minore di 0,66 ed in giallo gli “spot” con “fold-change” compreso tra i due valori (Figura 27).

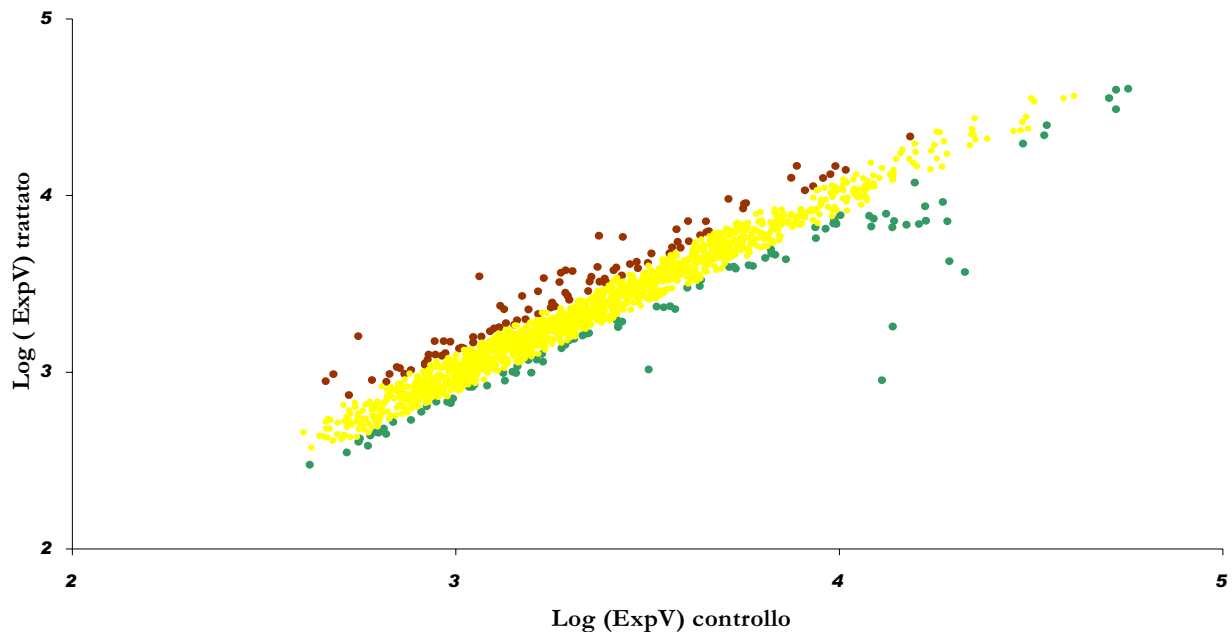


Figura 27 Distribuzione del logaritmo dei valori di espressione normalizzati del trattato rispetto al controllo. Rosso= geni con “fold-change” (FC)>1,5; verde=geni con FC<0,66; giallo= geni con $0,66 < FC < 1,5$

La variabilità tra repliche tecniche e tra repliche biologiche è stata poi valutata mediante il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson (r) sui valori di intensità normalizzati e trasformati in logaritmo in base 2. Dall’analisi statistica è emersa una buona correlazione ($0,93 < r < 0,99$) tra repliche biologiche dello stesso campione e un’ottima riproducibilità tra repliche tecniche di ibridazione ($0,98 < r < 1$) (Figura 28).

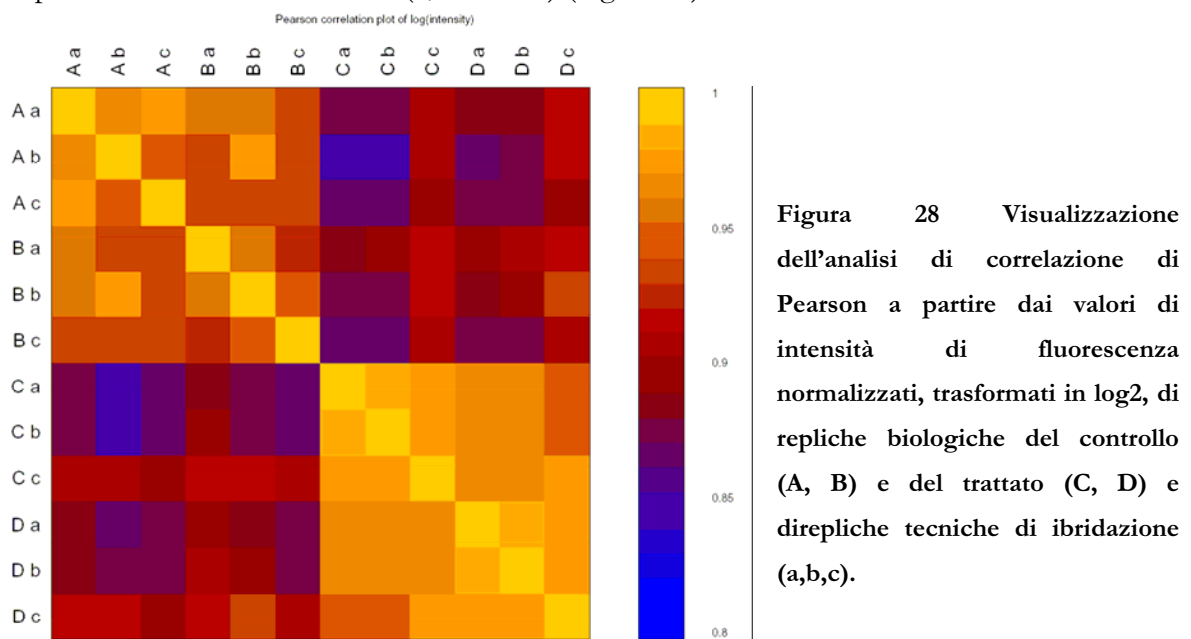


Figura 28 Visualizzazione dell’analisi di correlazione di Pearson a partire dai valori di intensità di fluorescenza normalizzati, trasformati in $\log_2$, di repliche biologiche del controllo (A, B) e del trattato (C, D) e direpliche tecniche di ibridazione (a,b,c).

L'ultima parte dell'analisi dei dati è consistita nell'individuazione dei geni la cui espressione variasse in maniera significativa tra il campione controllo ed i campioni trattati con *P. viticola*.

Questo è realizzabile utilizzando degli approcci statistici adattati appositamente agli esperimenti di “microarray”, la cui caratteristica è quella di avere poche ripetizioni ed un numero elevato di parametri.

L'analisi SAM (“Significance Analysis of Microarray”, Tusher *et al.*, 2001) permette di identificare i geni con variazioni di espressione statisticamente significative, attraverso una serie di *t*-test modificati. In base alla deviazione standard calcolata sulle misure ripetute per ciascun gene, viene creata una lista in cui i geni hanno associata una probabilità di modulazione in seguito al trattamento. I geni con probabilità superiore ad un valore soglia Δ vengono considerati potenzialmente significativi. Ad ogni valore Δ corrisponde un valore di FDR (“False Discovery Rate”), che corrisponde alla percentuale di geni la cui modulazione significativa è in realtà casuale.

Aumentando il valore Δ diminuisce il numero di geni con modulazione significativa, ma diminuisce contemporaneamente il valore di FDR. La scelta del valore Δ è arbitraria, ma risulterà un compromesso tra un valore accettabile di FDR e un numero desiderabile di geni significativi.

In questa analisi i geni differenzialmente espressi tra campione controllo e campioni trattati di ciascun individuo sono stati identificati attraverso analisi SAM di tipo “multiclass”.

L'analisi “multiclass” è stata eseguita su ciascun individuo suddividendo i dati in 3 gruppi, controllo e due trattati (12 e 96 hdi), ciascuno contenente le rispettive repliche tecniche e biologiche.

È stato fissato un valore di Δ che risultasse in una percentuale di falsi positivi (% FDR) non superiore al 13% e conseguentemente sono stati individuati i “probe” considerati significativi. Nella lista dei “probe” significativi sono stati selezionati quelli che presentavano un “fold-change” maggiore di 1,5 e minore di 0,66 nel confronto trattato verso controllo. Poiché generalmente ad un gene corrispondevano più “probe” presenti sul vetrino e significativamente modulati, il valore dei singoli “fold-change” è stato mediato ed associato a ciascun gene in modo da stimare il numero di geni modulati in maniera significativa per ogni individuo (Tabella 22).

Tabella 22 Risultati della rielaborazione dei dati ottenuti nelle analisi SAM “multiclass” eseguite per i 3 individui in esame.

Variabili	F ₁ 21/66	Teroldego	F ₁ 22/73
Delta (FDR <13%)	0,27	0,24	0,29
“probe” significativi	1436	693	1182
Geni modulati significativamente (FC ≥ 1,5; ≤ 0,66)	159	108	114

Complessivamente per quanto riguarda l'individuo resistente F₁ 21/66 sono stati così identificati 159 geni con variazione di espressione significativa tra trattato e controllo, di cui 137 indotti e 22 repressi. La maggior parte di essi (87%) è risultato modulato a 96 hdi, mentre il rimanente 13% a 12h dopo infezione con *P. viticola*.

Nel parentale suscettibile ‘Teroldego’ sono stati identificati 108 geni significativamente modulati tra trattato e controllo, di cui 90 indotti e 18 repressi. Anche in questo caso la maggior parte di essi (64%) è risultato modulato a 96 hdi, mentre il rimanente 36% a 12h dopo infezione con *P. viticola*.

Nell'individuo suscettibile F₁ 22/73 invece sono stati infatti identificati 114 geni con variazione di espressione significativa, di cui 56 indotti e 58 repressi. Di questi il 54% è risultato modulato a 12 hdi e il 46% a 96 h dopo infezione con il fungo.

Ciascun gene, risultato significativamente modulato in uno dei 3 individui, è stato poi classificato dal punto di vista funzionale, sulla base del vocabolario strutturato del Gene Ontology. Per le sequenze comuni all'analisi AFLP-TP e “microarray” sono state mantenute le annotazioni ottenute in precedenza, mentre per le altre è stata eseguita una nuova analisi di annotazione funzionale. I risultati del raggruppamento in 9 categorie funzionali dell'ontologia *biological_process* è rappresentato in Figura 29.

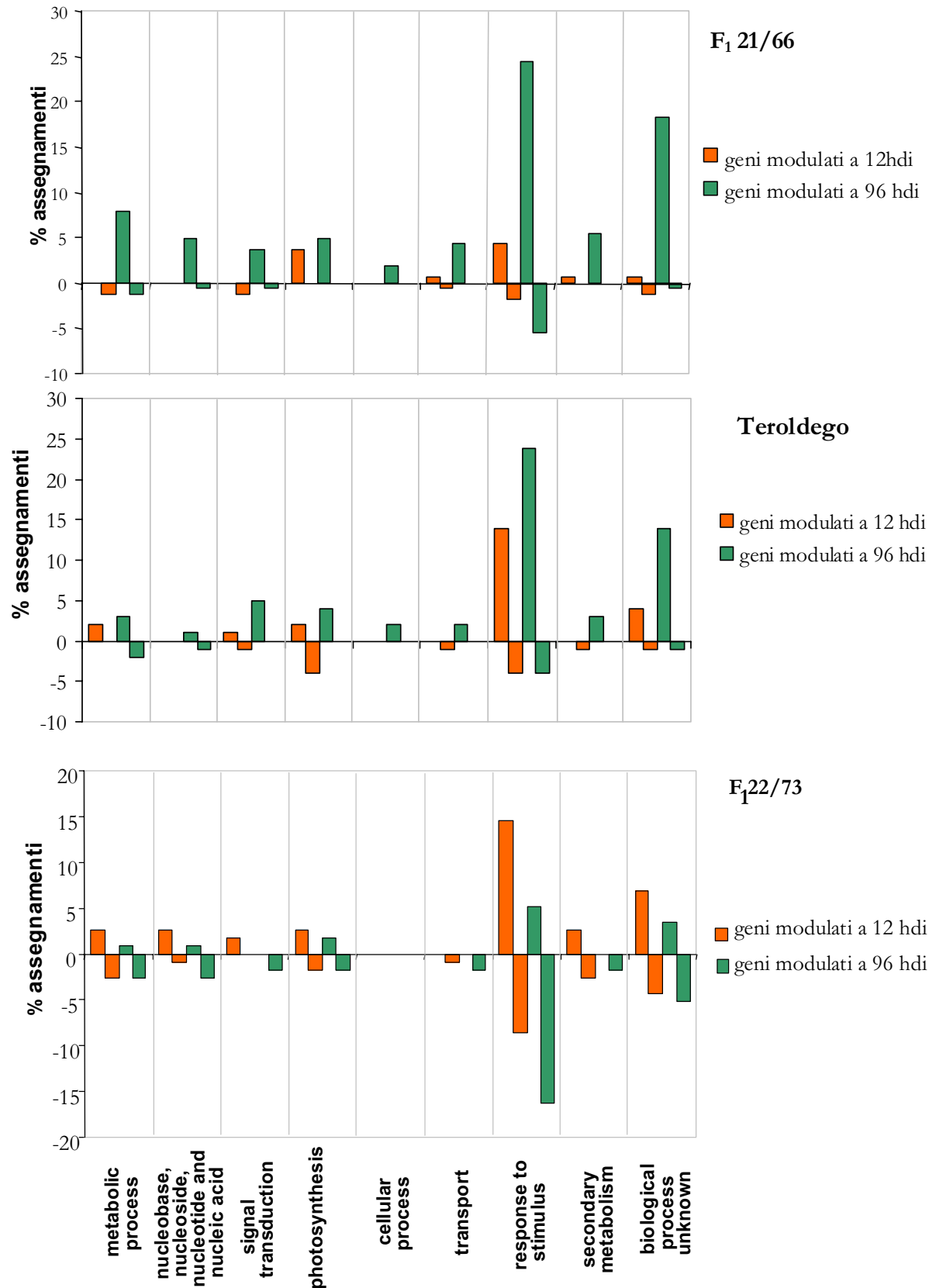


Figura 29 Annotazione in categorie funzionali dell'ontologia *biological process* (GO) dei geni indotti e repressi nei 3 individui (F₁ 21/66, resistente, Terolego e F₁ 22/73, suscettibili), a 12 e 96 ore dall'infezione con *P. viticola*.

Dal confronto tra i grafici è emerso un gradiente nella cinetica di modulazione nei 3 individui, come già evidenziato dalle percentuali dei geni significativamente modulati nelle due fasi temporali (12 e 96 hdi) negli individui stessi. Se in F₁ 21/66 le categorie funzionali sono distribuite quasi esclusivamente tra i geni modulati a 96hdi, in ‘Teroldego’ si distribuiscono tra i geni modulati in entrambe le fasi temporali, ma maggiormente a 96 hdi e in F₁ 22/73 vi è una distribuzione omogenea tra geni modulati a 12 e 96 hdi.

Ponendo inoltre l’attenzione sul tipo di modulazione nei 3 individui, se in F₁ 21/66 le 9 categorie funzionali sono quasi esclusivamente distribuite tra geni indotti, in ‘Teroldego’ sono distribuite anche tra geni repressi e in F₁ 22/73 sono distribuite in maniera bilanciata tra geni indotti e repressi.

Dal punto di vista biologico, la maggior parte dei geni ricade nella categoria “*response to stimulus*” sia nell’individuo resistente che in quelli suscettibili (36,4% in F₁ 21/66, 45,5 % in Teroldego e 45% in F₁ 22/73), nei primi due casi essi sono principalmente indotti, mentre nel terzo sono distribuiti in maniera simile tra indotti e repressi.

Inoltre le classi “*metabolic process*”, “*nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism*”, “*transport*” e “*signal transduction*” sono rappresentate per lo più fra i geni indotti in F₁ 21/66 e in Teroldego, mentre tra geni indotti e repressi nell’individuo F₁ 22/73.

Alle categorie “*photosynthesis*” e “*secondary metabolism*” sono stati assegnati geni esclusivamente indotti in F₁ 21/66, mentre geni sia indotti che repressi in ‘Teroldego e in F₁ 22/73

Una rilevante porzione di geni appartiene infine alla categoria “*biological process unknown*”, rispettivamente il 21% nell’individuo resistente e il 19,8 % nei 2 individui suscettibili.

Complessivamente i risultati ottenuti nell’analisi di espressione genica condotta con “oligo-microarray” sono stati riassunti in Tabella 23 per avere una visione completa dei cambiamenti trascrizionali dopo il trattamento fungino nei 3 individui in studio. I geni, identificati dal codice corrispondente alle bande isolate in AFLP-TP o dall’acronimo del gene presente in banca dati, sono stati assegnati ad una o più categorie funzionali (GO) ed ordinati a seconda che fossero modulati in uno o più individui.

La descrizione dei singoli geni, appartenenti alle diverse categorie funzionali, per cui è nota una relazione con il meccanismo di risposta a patogeno, è stata eseguita in discussione. In coda alla tabella sono stati inoltre inseriti 22 geni con variazione di espressione significativa, le cui sequenze non hanno avuto nessuna omologia in banca dati e sono state annotate come “no hit found”.

Tabella 23 Geni significativamente indotti (giallo chiaro) o repressi (blu chiaro) in uno o più individui a 12 e 96 hdi con *P. viticola*.

Gene	TC IASMA o TC VvGI_TIGR ^{1/} Entry name ^{2/} GenBank Acc ³	Descrizione	F ₁ 21/66		Teroldego		F ₁ 22/73	
			FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)
metabolic process GO:0008152								
BC1M32-394	Q5BLY1_ACTCH	Plastid alpha-amylase	0.86	1.63	1.09	1.16	0.93	1.02
BC3M11-327	O49855_SOYBN	Acid phosphatase	1.08	1.80	0.89	1.25	0.94	0.86
BC3M23-374	Q6Z702_ORYSA	Putative 3-isopropylmalate dehydratase large subunit	1.38	1.75	1.17	1.24	1.02	0.93
BT1M22-104	Q9MA64_ARATH	F22F74 protein	0.96	1.62	0.86	1.11	0.97	0.94
BT2M13-70	Q9FZL4_SOYBN	MGDG synthase type A	1.05	1.79	1.06	1.29	1.36	0.88
BT2M13-72	Q9LE54_ARATH	Putative nitrilase-associated protein	1.35	1.57	1.43	1.47	0.84	0.90
BT3M11-1	Q7XU78_ORYSA	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	1.24	1.61	0.86	1.38	1.13	1.02
BT3M31-216	COQ4_ARATH	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog	0.81	1.69	1.24	1.17	0.92	0.93
BT2M22-128	Q94EU9_SOLTU	Beta-amylase enzyme	0.22	0.25	0.97	0.94	0.85	0.81
BC2M11-310	Q8H222_9ROSI	Putative RING protein	0.95	0.95	0.88	0.86	0.30	0.26
BT2M24-143_RC	Q84KA9_CUCME	RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein	1.02	1.70	0.96	1.06	2.20	0.96
BT1M13-37	Q84UT6_GENTR	Perchloric acid soluble translation inhibitor protein homolog	0.88	1.08	1.03	1.51	1.09	0.75
BT3M12-12**	Q6UA14_GOSBA	Fiber protein Fb25	1.02	0.95	0.93	0.98	1.52	1.41
BC2M23-364	Q852R1_LOTJA	Serine palmitoyltransferase	1.03	0.76	0.95	0.89	1.38	1.50
BT3M12-12*	Q8LAC1_ARATH	Putative iojap protein	1.02	0.95	0.93	0.98	0.63	0.73
BT3M31-219	Q3LUM5_GOSHI	Elongation factor 1-alpha 1	1.18	1.15	0.85	0.85	0.94	0.64
BC2M24-369	Q3HVK6_SOLTU	Drm3-like protein	1.21	1.64	2.17	1.48	1.69	0.95
BT4M21-154*	Q8VWQ0_GOSHI	Putative serine carboxypeptidase	1.06	1.82	1.87	1.00	0.90	0.98
BC1M23-345	SUI11_ARATH	Protein translation factor SUI1 homolog 1	1.00	2.23	1.17	1.92	0.98	0.97
BT3M32-228	Q9AV87_ORYSA	60S ribosomal protein L21	1.23	1.50	1.04	1.70	0.62	0.67
BC4M31-424	Q8LL68_HEVBR	Latex plastidic aldolase-like protein	1.37	2.35	0.95	0.60	1.07	0.89
BT3M43-282	Q7XCS3_ORYSA	Gamma-lyase, putative	0.56	0.64	1.12	0.63	1.91	0.61
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism GO:0006139								
BC1M23-343*	Q9ZNX9_ARATH	Sigma-like factor precursor	1.05	1.76	0.83	1.11	0.89	1.05
BC3M23-371	Q9M6E1_TOBAC	DNA-binding protein3 [Fragment]	1.04	1.62	1.00	1.01	1.07	0.88
BT2M24-152	PCNA_TOBAC	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin)	0.86	1.71	0.91	1.20	1.15	0.81
BT2M44-262	Q8LI69_ORYSA	Putative DNA-directed RNA polymerase lia	1.30	1.65	0.82	1.05	1.16	0.82
BT3M21-157	Q9FGC2_ARATH	DNA helicase-like	1.37	1.54	0.98	1.06	1.21	0.85
BT2M13-72	Q9LE54_ARATH	Putative nitrilase-associated protein	1.35	1.57	1.43	1.47	0.84	0.90
BC3M11-328	Q6RZW9_VITAE	Putative WRKY4 regulation of transcription factor	0.94	1.55	0.80	1.56	1.06	1.00
BC3M43-456	Q9M6E0_TOBAC	DNA-binding protein4	0.77	1.10	0.96	2.85	1.00	0.96
BC1M13-301	Q8S3D7_ARATH	Putative bHLH transcription factor	0.93	0.88	1.22	1.01	1.57	0.94
BT3M34-240	Q9LKG4_ATRHO	Putative DNA binding protein	0.99	0.95	0.91	1.06	1.19	1.53
BC2M11-310	Q8H222_9ROSI	Putative RING protein	0.95	0.95	0.88	0.86	0.30	0.26
BT2M24-143_RC	Q84KA9_CUCME	RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein	1.02	1.70	0.96	1.06	2.20	0.96
EIN1	TC45185(VvGI)	similar to (Q7Y1W2) C-repeat/DRE-binding factor	1.20	0.85	1.00	1.04	0.83	0.48
ERF4a	TC45181(VvGI)	Similar to (Q70AB2) Ethylene transcription factor	1.08	0.78	1.12	0.82	0.84	0.54
BC2M31-401	Q08707_PETCR	BPF-1 protein	1.21	1.26	1.27	1.65	1.69	1.03
BT3M21-155	Q8W592_ARATH	putative ribonucleoprotein	0.77	1.58	1.02	1.12	1.23	0.49
ERF3b	TC54435 (VvGI)	similar to (Q6RZW8) Putative ethylene response factor 4	0.91	1.77	1.56	0.98	0.98	0.49
ERF3a	TC45253 (VvGI)	homologue to (Q6RZW8) Putative ethylene response factor 4	1.20	0.79	2.28	0.82	1.15	0.49
BT3M41-271	ERF3_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor 3	1.12	1.03	1.74	3.57	0.89	0.61
BC4M21-380	Q6RH27_LYCES	NAC domain protein	0.70	0.49	0.97	0.58	1.01	0.62
ERF3c	TC39576 (VvGI)	similar to (Q40478) Ethylene-responsive element binding protein	1.31	0.46	2.65	0.57	0.87	0.43

1 EST/TC assegnati alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastn* contro database IASMA (es. LEAF0014445/ TCVV021561) 2 Entry name assegnato alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastx* contro database UniProt (es. Q5BLY1_ACTCH) 4 GenBank Accession o TC VvGI vs. 4.0 delle sequenze non derivate da AFLP-TP (es. X76892/ TC38204). *I valori in grassetto sono stati ottenuti facendo la media di più valori significativi (FC ≥ 1,5 o FC ≤ 0,66).

Gene	TC IASMA o TC VvGI_TIGR ^{1/} Entry name ^{2/} GenBank Acc ³	Descrizione	F ₁ 21/66		Teroldego		F ₁ 22/73	
			FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)
signal transduction GO:0007165								
BT1M24-118	Q8GZ99_ARATH	Putative receptor protein kinase-like	0.90	1.64	0.98	1.11	1.21	0.75
BT2M14-78	Q8VWW7_SOYBN	Putative receptor-like protein kinase RLPK1 [Fragment]	1.03	1.60	1.03	1.06	0.94	0.89
BT1M21-101	Q9FTF3_ORYSA	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	0.99	1.32	1.45	1.51	0.89	0.75
BT2M33-203	Q8GUC2_LYCES	Putative phosphatase	0.93	0.97	1.18	1.17	1.71	0.62
BT4M21-161*	Q9M3V1_FAGSY	Protein phosphatase 2C (PP2C) (EC 31316)	0.57	0.69	1.05	1.22	0.93	0.83
BT3M32-222	Q6LCY3_PEA	Calmodulin	0.49	0.59	0.83	1.24	0.72	0.86
BT2M31-192	Q5Z9P3_ORYSA	Receptor-like protein kinase-like	0.74	0.93	0.64	0.96	1.06	0.81
BT2M32-198	ARF_ORYSA	ADP ribosylation factor 002	1.32	2.47	1.92	2.77	0.88	0.97
BC3M13-331	Q93V91_LYCES	Verticillium wilt disease resistance protein Ve2	1.35	1.72	1.03	1.54	1.53	0.98
BT2M24-145	Q9FUU9_PHAVU	Leaf senescence-associated receptor-like protein kinase	1.00	1.91	1.07	1.76	0.97	0.75
BC1M31-390	GLR37_ARATH	Glutamate receptor 37 precursor	0.87	1.69	1.12	1.56	0.89	0.60
photosynthesis GO:0015979								
BC1M33-400	Q9LRC4_9ROSI	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor	0.86	1.55	0.99	1.10	1.25	0.93
BT4M12-86	EID1_ARATH	Phytochrome A-associated F-box protein	1.07	1.23	1.68	1.18	0.97	0.95
BC1M12-296	Q6LDZ6_SOYBN	Photosystem II thylakoid membrane protein	1.25	0.69	1.16	1.01	1.02	0.55
BT4M21-162*	PST2_GOSHI	Photosystem II 5 kDa protein, chloroplast precursor	1.19	2.91	0.76	2.78	1.14	0.99
BC3M24-377	Q19RP2_9MAGN	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor	1.78	1.74	1.61	2.13	3.33	1.73
BT2M31-193a	Q1A179_9MAGN	Chloroplast chlorophyll a/b binding protein	3.02	3.07	0.83	2.33	1.56	1.38
BC3M23-372	QOZJ16_VITV	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K	1.54	1.53	1.49	2.26	1.01	0.84
BT2M43-256	Q32291_GOSHI	Chlorophyll A/B binding protein precursor	1.59	7.56	0.29	1.06	0.88	1.90
BC1M24-351*	Q9XQB1_PHAU	LHCI type III chlorophyll a/b binding protein	1.30	2.45	0.47	1.18	1.03	0.82
BC3M43-453	Q41424_SOLTU	Chlorophyll a/b binding protein	1.05	7.97	0.43	1.10	0.65	0.90
BC3M44-457	Q56XS7_ARATH	Fe(II) transport protein 3, chloroplast precursor (Iron-regulated transporter 3)	1.21	1.57	0.98	1.19	1.03	0.56
BC1M23-348	RCA1_LARTR	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor	0.96	0.89	0.60	0.82	3.13	0.58
cellular process GO:0009987								
BC2M43-465	Q5F306_LYCES	Copper-containing amine oxidase [Fragment]	0.92	1.90	0.79	1.06	0.68	0.91
BC4M22-382	Q9SD06_ARATH	Mucin-like protein	1.12	1.78	0.95	1.13	1.17	1.02
BT2M33-204	Q5ME66_PSEMZ	Alpha tubulin 1	1.13	1.01	1.02	2.52	0.95	0.82
PR5	Y10992	V.vinifera mRNA for osmotin-like protein	1.03	4.45	1.00	1.06	0.58	1.45
TC38581	TC38581 (VvGI)	Thaumatococin	0.78	0.60	0.88	0.80	0.79	0.65
transport GO:0006810								
BC3M24-375	Q9M4G8_VITV	Putative ripening-related P-450 enzyme	1.16	1.72	0.94	1.10	0.97	0.87
BT1M12-25	ATPX_SPIOL	ATP synthase B' chain, chloroplast precursor	0.74	1.55	0.69	1.23	0.75	0.75
BT2M24-147	Q84QH3_9ROSA	Putative sorbitol transporter	1.25	1.74	1.04	1.14	1.07	0.85
BT2M42-252	ATPA_TOBAC	ATPase alpha subunit	1.28	2.11	0.82	1.08	0.99	0.84
BC2M14-325	VATL1_ARATH	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit 1/3/5	0.91	1.12	0.64	0.90	0.84	0.69
BC2M13-317	Q9MB47_CITUN	Vacuolar H ⁺ -ATPase A subunit (Fragment)	1.54	1.38	0.88	1.53	0.80	0.94
BT4M22-171	Q9FV14_LOTJA	Putative ammonium transporter AMT1	0.95	1.52	0.86	1.93	1.14	0.79
BC3M32-418	Q9FS92_SAMSA	Shaker-like potassium channel	1.03	1.55	0.89	1.03	0.74	0.51
BC3M44-457	Q56XS7_ARATH	Fe(II) transport protein 3, chloroplast precursor (Iron-regulated transporter 3)	1.21	1.57	0.98	1.19	1.03	0.56
BT2M24-151	Q9FZ96_ARATH	Purine permease	0.65	0.89	0.97	1.37	0.58	0.83

1 EST/TC assegnati alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastn* contro database IASMA (es. LEAF0014445/ TCVV021561) 2 Entry name assegnato alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastx* contro database UniProt (es. Q5BLY1_ACTCH) 4 GenBank Accession o TC VvGI vs. 4.0 delle sequenze non derivate da AFLP-TP (es. X76892/ TC38204). *I valori in grassetto sono stati ottenuti facendo la media di più valori significativi (FC ≥ 1,5 o FC ≤ 0,66).

Gene	TC IASMA o TC VvGI_TIGR ^{1/} Entry name ^{2/} GenBank Acc ³	Descrizione	F ₁ 21/66		Teroldego		F ₁ 22/73	
			FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)
response to stimulus GO:0050896								
BC1M23-347	O04002_SOLTU	CDSP32 protein	1.21	1.68	0.83	1.18	0.86	0.88
BC1M24-350	O49675_ARATH	Neoxanthin cleavage enzyme-like protein	0.75	2.27	1.23	1.19	1.10	1.12
BT1M24-118	Q8GZ99_ARATH	Putatice receptor protein kinase-like	0.90	1.64	0.98	1.11	1.21	0.75
BT2M13-72	Q9LE54_ARATH	Putative nitrilase-associated protein	1.35	1.57	1.43	1.47	0.84	0.90
BT2M14-78	Q8VWW7_SOYBN	Putative receptor-like protein kinase RLPK1 [Fragment]	1.03	1.60	1.03	1.06	0.94	0.89
BT2M24-147	Q84QH3_9ROSA	Putative sorbitol transporter	1.25	1.74	1.04	1.14	1.07	0.85
BT2M42-252	ATPA_TOBAC	ATPase alpha subunit	1.28	2.11	0.82	1.08	0.99	0.84
BT2M43-258	Q60D20_SOLDE	Putative TPR domain containing protein	1.02	1.54	0.89	1.10	1.06	0.84
BC3M23-371	Q9M6E1_TOBAC	DNA-binding protein3 [Fragment]	1.04	1.62	1.00	1.01	1.07	0.88
BC2M43-465	Q5F306_LYCES	Copper-containing amine oxidase [Fragment]	0.92	1.90	0.79	1.06	0.68	0.91
COMT	Z54233	V.vinifera mRNA for caffeoyl-CoA O-methyltransferase	0.86	1.66	0.87	0.96	1.11	0.91
PR2	AJ277900	V. vinifera mRNA for beta 1-3 glucanase (g1 gene)	1.06	1.97	1.16	1.05	0.94	0.80
PR1	AJ536326	V. vinifera mRNA for putative PR protein 1 precursor	1.02	1.81	1.12	1.04	1.47	0.90
AdenMetSyn1	TC38333 (VvGI)	homologue to (Q96551) S-adenosylmethionine synthetase 1	1.39	1.64	0.97	1.13	0.87	0.85
StSy1	S63225	stilbene synthase [V.=grapes, cv Optima, mRNA, 1300 nt]	0.96	1.60	0.88	1.10	1.05	0.96
BT2M24-147	Q84QH3_9ROSA	Putative sorbitol transporter	1.25	1.74	1.04	1.14	1.07	0.85
BT2M33-206	O04892_TOBAC	Cytochrome P450 like_TBP	0.81	0.57	1.29	1.41	1.07	0.91
BT3M32-222	Q6LCY3_PEA	Calmodulin	0.49	0.59	0.83	1.24	0.72	0.86
BC1M31-392	Q9M8Y5_ARATH	Putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase	0.82	1.23	0.70	1.52	0.83	0.92
BC3M43-456	Q9M6E0_TOBAC	DNA-binding protein4	0.77	1.10	0.96	2.85	1.00	0.96
BT1M21-101	Q9FTF3_ORYSA	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	0.99	1.32	1.45	1.51	0.89	0.75
BT3M12-11	Q3ZDK3_PICAB	Early-responsive to dehydration stress protein [Fragment]	0.71	1.25	0.78	1.57	1.09	0.95
CTR1	TC39559 (VvGI)	Similar to (Q23719) MAP3K delta-1 protein kinase	0.99	1.09	1.35	1.60	0.99	1.08
glutathione transferase	AF501625	V. vinifera glutathione-S-transferase mRNA	1.19	0.74	1.98	0.95	1.13	0.72
PGIP	AF305093	V. vinifera polygalacturonase inhibiting protein mRNA	0.97	0.73	1.47	1.68	1.13	0.80
BT2M31-192	Q5Z9P3_ORYSA	Receptor-like protein kinase-like	0.74	0.93	0.64	0.96	1.06	0.81
CH3	AB105374	V. vinifera gene for chitinase III, complete cds	0.91	1.10	0.88	1.18	0.70	1.73
BT4M21-157*	Q42810_SOYBN	GmCK2p	1.46	1.30	1.33	1.10	1.30	1.62
BT2M12-57	Q6B4R7_ARATH	GIGANTEA	0.77	1.31	0.81	0.98	1.44	1.55
BT4M23-173	Q4F886_ORYSA	DT-related protein	1.01	1.14	1.15	0.94	1.53	1.05
BC4M11-339	P93499_PHAVU	DnaJ-like protein	0.90	1.31	1.01	0.86	1.85	0.95
ETR3	TC49529(VvGI)	similar to (Q9ZWL5) Ethylene response sensor	0.86	0.72	1.18	0.98	1.74	1.02
C4H	TC38780(VvGI)	similar to (Q9FUU5) Cinnamate-4-hydroxylase, complete	0.95	0.84	1.02	1.08	1.51	1.05
BC1M42-441	HSP12_MEDSA	182 kDa class I heat shock protein	0.97	0.83	1.07	1.31	0.29	0.33
BC2M11-310	Q8H222_9ROSI	Putative RING protein	0.95	0.95	0.88	0.86	0.30	0.26
BT2M11-48	Q6V8R2_MALDO	Putative DnaJ protein (Fragment)	0.86	0.68	1.18	1.00	1.43	0.64
CHI1	X75963	V vinifera CHI mRNA for calchone isomerase	0.97	1.14	0.99	0.99	0.65	0.73
EIN1	TC45185(VvGI)	similar to (Q7Y1W2) C-repeat/DRE-binding factor	1.20	0.85	1.00	1.04	0.83	0.48
ERF4a	TC45181(VvGI)	Similar to (Q70AB2) Ethylene transcription factor	1.08	0.78	1.12	0.82	0.84	0.54
LAR1	AJ865335	V. vinifera mRNA for leucoanthocyanidin reductase 1	0.94	1.10	1.11	1.46	3.70	0.64
BT3M32-226a	ML423_ARATH	MLP-like protein 423	1.01	1.57	1.55	1.90	1.52	1.52
BC3M13-331	Q93V91_LYCES	Verticillium wilt disease resistance protein Ve2	1.35	1.72	1.03	1.54	1.53	0.98
BC1M31-391	Q8H286_ANACO	PVR3-like protein (Fragment)	1.73	1.79	2.15	0.98	3.86	0.97
BC1M41-433	Q1S3D5_METR	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor	1.78	1.65	2.87	0.88	4.14	0.69

1 EST/TC assegnati alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastn* contro database IASMA (es. LEAF0014445/ TCVV021561) 2 Entry name assegnato alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastx* contro database UniProt (es. Q5BLY1_ACTCH) 4 GenBank Accession o TC VvGI vs. 4.0 delle sequenze non derivate da AFLP-TP (es.X76892/ TC38204). *I valori in grassetto sono stati ottenuti facendo la media di più valori significativi (FC $\geq$ 1,5 o FC $\leq$ 0,66).

Gene	TC IASMA o TC VvGI_TIGR ^{1/} Entry name ^{2/} GenBank Acc ³	Descrizione	F ₁ 21/66		Teroldego		F ₁ 22/73	
			FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)
response to stimulus GO:0050896								
TC38635	TC38635 (VvGI)	Leucine zipper-containing	1.91	3.21	1.32	3.87	2.05	1.09
BC2M43-467	Q5D875_MEDTR	Calcium-dependent protein kinase CDPK1444	1.41	1.82	1.52	1.38	1.08	0.93
BT1M14-41	Q9M435_QUERO	phase-change related protein	1.50	1.12	2.95	0.89	0.91	0.92
BC3M11-328	Q6RZW9_VITAE	Putative WRKY4 regulation of transcription factor	0.94	1.55	0.80	1.56	1.06	1.00
BC2M13-317	Q9MB47_CITUN	Vacuolar H ⁺ -ATPase A subunit (Fragment	1.54	1.38	0.88	1.53	0.80	0.94
BT2M24-145	Q9FUU9_PHAVU	Leaf senescence-associated receptor-like protein kinase	1.00	1.91	1.07	1.76	0.97	0.75
PR5K	TC47857(VvGI)	weakly similar to (Q9FTF3) Putative receptor kinase	1.47	1.82	1.33	1.54	1.03	0.82
ANR	DQ129684	V.vinifera cultivar Spatburgunder anthocyanidin reductase mRNA	1.04	1.54	1.00	1.51	1.14	0.76
BC2M32-405	Q9M7N8_ARATH	prolin-reach protein 4	1.30	2.24	1.03	2.06	0.91	0.93
BT4M21-155	Q9FN03_ARATH	UVB-resistance protein UVR8	1.02	1.62	0.91	1.17	0.97	1.88
BT2M24-143_RC	Q84KA9_CUCME	RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein	1.02	1.70	0.96	1.06	2.20	0.96
RPP4	TC50436 (VvGI)	similar to (Q6UQ08) Putative TIR-NBS type R protein 11	0.88	1.58	0.81	1.14	0.87	1.59
BC2M31-401	Q08707_PETCR	BPF-1 protein	1.21	1.26	1.27	1.65	1.69	1.03
BT2M22-131	Q39636_CUCSA	CR9 protein	0.91	2.93	0.71	0.53	0.97	0.69
DFR	X75964	Vvinifera DFR mRNA for dihydroflavonol reductase	0.73	1.72	0.83	1.03	0.65	1.05
TC38204	TC38204 (VvGI)	phase-change related protein	0.91	0.35	2.59	0.83	1.51	0.95
STSY	X76892	V.vinifera StSy mRNA for stilbene synthase	0.91	1.62	0.99	1.52	0.66	0.82
AdenMetSyn2	TC38332(VvGI)	homologue to (Q96552) S-adenosylmethionine synthetase 2	1.05	1.93	0.47	1.64	0.67	0.75
BT3M43-285	O04002_SOLTU	CDSP32 protein	1.20	2.98	1.11	2.97	0.48	1.28
PR5	Y10992	Vvinifera mRNA for osmotin-like protein	1.03	4.45	1.00	1.06	0.58	1.45
PR10	AJ291705	V. vinifera PR10.1 gene for class 10 pathogenesis-related protein	1.00	1.87	1.67	0.99	1.23	0.66
BC3M32-418	Q9FS92_SAMSA	Shaker-like potassium channel	1.03	1.55	0.89	1.03	0.74	0.51
ACO	TC38453(VvGI)	homologue to (Q84X67) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase 1	1.78	0.99	1.59	0.87	1.57	0.57
ERF3b	TC54435 (VvGI)	similar to (Q6RZW8) Putative ethylene response factor 4	0.91	1.77	1.56	0.98	0.98	0.49
ERF3a	TC45253 (VvGI)	homologue to (Q6RZW8) Putative ethylene response factor 4	1.20	0.79	2.28	0.82	1.15	0.49
BT3M41-271	ERF3_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor 3	1.12	1.03	1.74	3.57	0.89	0.61
BT1M11-23	Q52QX4_MANES	Auxin-repressed protein-like protein ARP1	1.03	0.90	2.02	0.84	1.52	0.59
BC2M44-449	Q9ZS21_SOYBN	Glyoxalase I (EC 4415)	0.83	0.98	0.93	1.56	0.62	1.00
BT3M41-270	CATA1_GOSHI	Catalase isozyme 1 (EC 11116)	0.79	0.65	0.87	0.94	1.56	0.68
ERF3c	TC39576 (VvGI)	similar to (Q40478) Ethylene-responsive element binding protein	1.31	0.46	2.65	0.57	0.87	0.43
LTP4	AF467946	V.vinifera lipid transfer protein isoform 4 mRNA	0.58	0.62	1.07	5.56	1.11	1.13
TC38581	TC38581 (VvGI)	Thaumatococin	0.78	0.60	0.88	0.80	0.79	0.65
BC4M41-462	Q9LTT7_ARATH	DnaJ protein, putative (At3g13310)	0.77	0.62	0.76	0.75	1.17	0.46
CHITb	DQ267094	V. vinifera chitinase class I mRNA	0.78	0.67	0.63	0.76	0.61	0.53
BC4M21-380	Q6RH27_LYCES	NAC domain protein	0.70	0.49	0.97	0.58	1.01	0.62
BC2M13-315	Q8S568_VITVI	Catalase	0.64	0.81	0.85	0.37	0.66	0.58
secondary metabolism GO:0019748								
BC1M24-350	O49675_ARATH	Neoxanthin cleavage enzyme-like protein	0.75	2.27	1.23	1.19	1.10	1.12
BC1M13-301	Q8S3D7_ARATH	Putative bHLH transcription factor	0.93	0.88	1.22	1.01	1.57	0.94
BC3M43-454	Q9STI0_ARATH	Flavonoid 3', 5'-hydroxylase-like protein	1.04	1.93	0.89	1.89	2.10	0.94
BT4M22-168*	FL3H_VITVI	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase (Flavonone-3-hydroxylase)	1.14	1.86	0.69	1.85	0.75	0.94
COMT	Z54233	Vvinifera mRNA for caffeoyl-CoA O-methyltransferase	0.86	1.66	0.87	0.96	1.11	0.91
FLS	AY257979.1	V. vinifera cultivar Shiraz flavonol synthase mRNA, partial cds	2.51	2.50	0.92	1.03	1.14	1.15

1 EST/TC assegnati alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastn* contro database IASMA (es. LEAF0014445/ TCvV021561) 2 Entry name assegnato alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastx* contro database UniProt (es. Q5BLY1_ACTCH) 4 GenBank Accession o TC VvGI vs. 4.0 delle sequenze non derivate da AFLP-TP (es. X76892/ TC38204). *I valori in grassetto sono stati ottenuti facendo la media di più valori significativi (FC ≥ 1,5 o FC ≤ 0,66).

Gene	TC IASMA o TC VvGI_TIGR ^{1/} Entry name ^{2/} GenBank Acc ³	Descrizione	F ₁ 21/66		Teroldego		F ₁ 22/73	
			FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)
secondary metabolism GO:0019748								
STSY1	S63225	stilbene synthase [V.=grapes, cv Optima, mRNA, 1300 nt]	0.96	1.60	0.88	1.10	1.05	0.96
STSY	X76892	V.vinifera StSy mRNA for stilbene synthase	0.91	1.62	0.99	1.52	0.66	0.82
C4H	TC38780(VvGI)	similar to (Q9FUU5) Cinnamate-4-hydroxylase, complete	0.95	0.84	1.02	1.08	1.51	1.05
CHI1	X75963	V. vinifera CHI mRNA for calchone isomerase	0.97	1.14	0.99	0.99	0.65	0.73
F3H1	X75965	V.vinifera F3H mRNA for flavanone 3-hydroxylase	0.85	1.23	0.96	1.16	0.73	0.47
LAR1	AJ865335	V.vinifera mRNA for leucoanthocyanidin reductase 1	0.94	1.10	1.11	1.46	3.70	0.64
4CL	TC44994 (VvGI)	similar to (Q9LL50) 4-coumarate:coA ligase 2	1.10	1.58	0.64	0.96	0.70	0.83
DFR	X75964	V.vinifera DFR mRNA for dihydroflavonol reductase	0.73	1.72	0.83	1.03	0.65	1.05
biological process unknown GO:0000004								
BT4M22-167*	Q9LZX2_ARATH	Hypothetical protein T20L15_10	2.87	1.36	0.99	1.05	0.77	0.88
BC1M11-292	TCVV019305(IASMA)		1.09	1.55	1.08	1.12	1.41	1.05
BC1M13-300	TCVV022348(IASMA)		1.30	1.82	0.94	1.33	1.05	0.97
BC1M41-437	BRNS0006444 (IASMA)		1.05	1.53	1.17	1.35	0.98	0.98
BC2M23-366	ROOT0006227(IASMA)		1.14	1.74	1.16	1.30	0.96	0.95
BT1M14-39	Q5M9Z9_TOBAC	Hypothetical protein orf106b	1.03	1.72	0.90	0.95	1.04	0.72
BT2M23-137	BER0059746(IASMA)		1.33	1.70	1.13	1.23	1.08	1.01
BT2M33-205	Q3E9A5_ARATH	Protein At5g20190	0.89	1.64	1.02	1.01	0.99	1.02
BT3M21-156	Q8GWD0_ARATH	Hypothetical protein At5g16810/F5E19_150	1.07	1.87	0.77	1.21	1.05	0.97
BT3M33-233	BER0006059,291		1.26	1.65	0.88	1.06	1.23	0.98
BT3M34-241	Q9LK58_ARATH	Hypothetical protein(At3g13150)	0.97	1.55	0.83	1.33	0.92	0.96
BT4M23-178	TCVV010408(IASMA)		1.07	1.75	1.06	1.23	1.05	0.77
BC2M33-408	Q7XXR3_ORYSA	Hypothetical protein	1.15	1.23	1.56	0.99	1.09	0.84
BC1M33-398	Q8GY89_ARATH	Hypothetical protein At1g31170/F28K20_12	0.87	1.05	0.83	1.69	0.91	0.94
BC4M33-427	Q9SJI1_ARATH	Expressed protein (DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein)	1.08	1.36	1.38	2.48	1.19	0.85
BC4M41-461	LEAF0023019 (IASMA)		1.00	1.02	1.00	1.52	0.86	0.84
BT2M12-64	TCVV013587(IASMA)		0.99	0.95	1.00	1.57	0.88	0.76
BC4M24-389	Q9G7G6_ARATH	Hypothetical protein F28P58	0.97	1.04	0.89	0.97	3.49	1.03
BT2M11-47	Q9LEN5_CICAR	Hypothetical protein (Fragment)	1.15	0.78	0.92	0.89	1.75	0.78
BT2M12-58	Q9SZ42_ARATH	Hypothetical protein F10M23370	1.16	1.48	0.96	1.08	1.59	1.01
BT2M12-59	Q1S1H6_MEDTR	Hypothetical protein	1.38	1.11	1.37	1.13	1.59	0.97
BT3M11-4	Q93ZV0_ARATH	Hypothetical protein At5g18980	1.36	1.31	1.02	1.09	2.21	0.86
BT4M12-85	Q9FKQ1_ARATH	Emb CAB894011 (AT5g65380/MNA5_11)	1.20	1.06	1.05	1.07	1.67	1.07
BT2M24-146	Q5ZF82_PLAMJ	Hypothetical protein	0.94	1.16	0.89	1.24	0.60	0.91
BC1M14-306	O82258_ARATH	Expressed protein (T9J237/T9J237) (At2g47910/T9J237)	1.05	0.95	0.91	1.05	1.43	0.62
BC2M31-403	LEAF0014445(IASMA)		1.16	1.85	1.03	1.57	1.50	1.07
BC2M13-318	TCVV021561(IASMA)		0.63	3.12	0.67	1.68	1.48	4.05
BT3M24-170	Q8GXY8_ARATH	Hypothetical protein At5g23240/MKD15_10	1.13	1.56	1.51	1.25	0.86	0.95
BT3M41-269	PDCL0001237(IASMA)		1.20	2.02	14.18	1.05	0.70	0.78
BC1M44-443	TCVV014744(IASMA)		1.06	1.79	1.07	1.62	0.98	0.92
BC2M43-469	TCVV000960(IASMA)		1.27	1.96	1.12	2.09	0.98	0.75
BC3M14-335	O82167_ARATH	Expressed protein	1.23	1.88	1.05	1.60	1.30	0.85
BC3M44-458	Q67Y06_ARATH	MRNA, complete cds, clone: RAFL25-20-E08	0.96	1.64	0.69	1.91	1.19	0.90
BT2M23-136	Q9C977_ARATH	Hypothetical protein F5I62	1.28	1.51	1.32	1.57	0.95	1.03
BT4M23-172	Q8H185_ARATH	Hypotetical protein (Q8H185)	0.90	1.81	0.88	1.95	1.21	1.14

1 EST/TC assegnati alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastn* contro database IASMA (es. LEAF0014445/TCVV021561) 2 Entry name assegnato alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastx* contro database UniProt (es. Q5BLY1_ACTCH) 4 GenBank Accession o TC VvGI vs. 4.0 delle sequenze non derivate da AFLP-TP (es.X76892/TC38204). *I valori in grassetto sono stati ottenuti facendo la media di più valori significativi ($FC \geq 1,5$ o $FC \leq 0,66$).

Gene	TC IASMA o TC VvGI_TIGR ¹ / Entry name ² / GenBank Acc ³	Descrizione	F ₁ 21/66		Teroldego		F ₁ 22/73	
			FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)	FC* (12hdi)	FC* (96hdi)
biological process unknown GO:0000004								
BC3M24-378	Q9C5A5_ARATH	Hypothetical protein At5g08720 (Hypothetical protein At5g08720/T2K12_70)	0.98	1.54	1.19	1.12	1.02	1.69
BT4M22-163*	Q9LUZ6_ARATH	Hypothetical protein At5g58600/mzn1_50)	1.17	1.72	0.95	1.16	1.41	1.70
BC4M33-426	TC70371 (VvGI)		1.25	2.01	1.07	0.65	1.58	0.89
BC2M23-366*	Q9SVQ9_ARATH	Short-chain alcohol dehydrogenase like protein	0.90	0.62	1.56	1.24	1.47	4.31
BC2M41-445	TCVV021557(IASMA)		0.42	1.61	1.39	2.42	0.46	0.59
BT1M24-119	Q94JT5_ARATH	AT4g35220/F23E12_220	1.08	1.73	0.68	1.17	0.64	0.60
BT3M43-284	Q9SZU7_ARATH	Hypothetical protein F6G17120 (Hypothetical protein AT4g37470)	1.06	1.62	0.67	0.81	0.65	0.85
BC1M31-393	Q8H0Y0_ARATH	Hypothetical protein At4g02890	1.29	1.77	1.11	1.00	0.75	0.44
BT4M22-164*	TCVV020242(IASMA)		0.95	1.51	1.00	1.08	0.96	0.57
BC1M23-344	Q9LVZ5_ARATH	Arabidopsis thaliana genomic DNA, Hypothetical protein At3g15840	0.82	1.88	0.56	1.31	0.58	1.03
BT2M31-194	TCVV012983(IASMA)		1.21	1.32	1.00	1.97	0.97	0.49
no hit found								
BC1M41-431		no hit found	1.04	1.55	0.84	0.91	1.05	0.98
BC2M43-466		no hit found	1.17	1.63	1.31	1.36	0.98	1.01
BC4M23-385		no hit found	1.35	1.59	0.93	1.28	0.92	0.92
BT1M22-105		no hit found	1.13	1.65	0.82	1.00	0.80	0.91
BT2M11-50_RC		no hit found	1.24	1.64	1.02	1.04	1.22	0.94
BT2M44-266_RC		no hit found	1.33	1.90	0.93	1.14	1.08	0.82
BT2M21-126		no hit found	0.65	1.22	1.01	1.07	0.70	0.93
BC1M32-395		no hit found	0.93	0.98	1.17	1.95	1.01	1.08
BC3M42-452		no hit found	1.04	1.23	1.09	1.50	1.22	0.76
BT1M31-464		no hit found	0.99	1.44	0.81	1.69	0.95	0.92
BT2M44-265_RC		no hit found	0.90	1.30	0.91	1.55	1.20	0.79
BC4M23-385_RC		no hit found	1.08	1.16	0.90	1.14	1.41	1.98
BC2M33-407		no hit found	1.13	0.88	0.97	1.36	1.59	0.93
BC3M31-414		no hit found	2.14	1.70	1.24	1.69	1.04	0.81
BC2M31-402		no hit found	0.94	1.57	1.55	1.14	1.24	0.99
BC3M14-337		no hit found	0.90	1.56	1.33	1.53	0.84	0.91
BT2M24-144		no hit found	1.20	1.51	0.83	1.52	0.78	0.95
BC2M22-358		no hit found	0.83	1.50	1.02	0.97	2.17	0.85
BC1M41-432		no hit found	0.83	0.94	1.58	1.05	1.74	0.87
BC1M41-435		no hit found	1.39	0.80	1.60	1.47	1.09	1.09
BT1M13-36		no hit found	1.21	1.95	1.30	1.02	0.51	0.46
BC3M33-420		no hit found	0.96	1.68	1.02	1.23	0.65	1.05
BT3M41-278 RC		no hit found	0.91	1.53	0.85	1.22	0.55	1.44

1 EST/TC assegnati alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastn* contro database IASMA (es. LEAF0014445/ TCVV021561) 2 Entry name assegnato alle sequenze di AFLP-TP tramite *blastx* contro database UniProt (es. Q5BLY1_ACTCH) 4 GenBank Accession o TC VvGI vs. 4.0 delle sequenze non derivate da AFLP-TP (es. X76892/ TC38204). *I valori in grassetto sono stati ottenuti facendo la media di più valori significativi ($FC \geq 1,5$ o $FC \leq 0,66$).

5 DISCUSSIONE

La vite, la cui specie più interessante dal punto di vista economico e commerciale è rappresentata da *Vitis vinifera* L., è coltivata in circa 60 paesi grazie alla sua adattabilità a climi e a suoli differenti. L'origine della maggior parte delle cultivar di *V. vinifera* oggi esistenti è dovuta all'incrocio non controllato tra piante coltivate e selvatiche e alla domesticazione di quest'ultime. Le caratteristiche di resistenza ai patogeni, tipiche della vite selvatica, sono andate progressivamente scomparendo nella vite coltivata ed i moderni programmi di miglioramento genetico cercano di coniugare l'introggressione di caratteri di resistenza al mantenimento delle caratteristiche qualitative del frutto tipiche della specie *V. vinifera* (Alleweldt e Possingham, 1998).

Lo sviluppo di marcatori molecolari e di analisi su larga scala, le cosiddette “omiche” (genomica, trascrittomica e metabolomica), ha assunto un ruolo fondamentale nel cercare di associare i caratteri di resistenza e qualità della bacca attraverso la selezione assistita da marcatori o indirizzando le pratiche agronomiche. Ad oggi risultano tuttavia poco noti i meccanismi molecolari alla base della resistenza alle malattie nelle diverse specie di *Vitis*.

Le principali malattie che a tutt'oggi mettono a dura prova le coltivazioni viticole sono causate da funghi che attaccano principalmente foglie e grappoli, tra cui *Plasmopara viticola*, un fungo biotrofico, appartenente all'ordine degli oomiceti, parassita obbligato di *V. vinifera* e di alcune altre specie di *Vitis*.

Sebbene un quadro completo della reazione di difesa messa in atto dalla vite nei confronti di *P. viticola* non sia ancora disponibile, è noto che all'infezione del patogeno fungino segue una serie di eventi che vanno dall'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno associata alla risposta ipersensibile, all'accumulo di composti fenolici a livello di parete, all'attivazione trascrizionale di geni codificanti enzimi di sintesi di fitolaessine e proteine connesse a patogenesi (PR) (Kortekamp e Zyprian, 2003).

L'obiettivo principale di questo progetto di dottorato è stato quello di approfondire, mediante lo studio della modulazione dell'espressione genica, i meccanismi molecolari alla base del processo di resistenza a *P. viticola* e di identificare potenziali geni marcatori di tale processo. Inoltre è stata valutata la correlazione tra sintesi di stilbeni dopo infezione con *P. viticola* e la resistenza al patogeno fungino sulla base di osservazioni precedenti presenti in letteratura (Pool *et al.*, 1981, Langcake, 1981, Stein e Hoss, 1984).

Lo studio è stato condotto su alcuni individui di una popolazione F_1 , derivante dall'incrocio tra Freiburg 993-60 (ibrido complesso di *V. vinifera*, *V. rupestris* e *V. lincecumii*) e la cultivar di *V. vinifera* 'Teroldego', rispettivamente parzialmente resistente e suscettibile a *P. viticola*, presenti presso l'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (IASMA).

La parziale resistenza di Freiburg 993-60 al patogeno fungino deriva dal fatto che esso è un ibrido tra due specie appartenenti al sottogenere *EuVitis*, *V. rupestris* e *V. lincecumii* (resistenti) e *V. vinifera* (suscettibile).

ANALISI FENOTIPICA DELLA POPOLAZIONE D'INCROCIO FREIBURG X 'TEROLDEGO' DOPO INFEZIONE CON *P. VITICOLA*

La caratterizzazione fenotipica della popolazione di incrocio eseguita a 10 giorni dall'infezione artificiale con *P. viticola* è stata effettuata valutando la percentuale di area fogliare infetta come percentuale di superficie sporulante sulla pagina fogliare inferiore e la presenza di necrosi e clorosi sulla pagina fogliare superiore (criteri OEPP/EPPO, 1997).

L'analisi condotta in due diverse annate (2005 e 2006), rispettivamente su 105 e 89 individui della progenie e sui parentali, ha evidenziato una notevole variabilità nella risposta al patogeno fungino dei diversi individui ed ha permesso di individuare 4 classi fenotipiche da totale resistenza a totale suscettibilità.

Ciascun individuo è stato quindi assegnato ad una delle classi fenotipiche ed in buona parte dei casi l'associazione individuo-classe è rimasta invariata in entrambe le annate, fatta eccezione per alcuni individui tra cui Freiburg. Nel 2006 tuttavia le classi fenotipiche intermedie sono risultate più popolate, probabilmente a causa della minore virulenza dell'inoculo fungino preparato in quella stagione.

La distribuzione delle classi di superficie sporulante tra gli individui è risultata significativamente normale ed ha assunto un andamento bimodale in entrambe le annate, come è tipico nel caso di caratteri quantitativi controllati da pochi geni "principali" (Fisher *et al.* 2004, Schmidlin *et al.*, 2006).

È noto infatti che la resistenza totale agli oomiceti, tra cui quella a *P. viticola*, è determinata da un "set" di *loci* R dominanti e che la manifestazione di fenotipi intermedi di resistenza e suscettibilità è determinata dalla combinazione delle diverse varianti alleliche di tali *loci*. (Kamoun *et al.*, 1999).

**ANALISI DEL CONTENUTO DI STILBENI NELLA POPOLAZIONE
D'INCROCIO FREIBURG X 'TEROLDEGO': IDENTIFICAZIONE DI
INDIVIDUI "ALTO PRODUTTORI" DI *TRANS*-RESVERATROLO E
VINIFERINE.**

La grande variabilità fenotipica riscontrata nella popolazione d'incrocio in risposta all'infezione con *P. viticola* ha spinto ad indagare se una simile variabilità fosse presente nel contenuto di stilbeni a livello metabolico, nella biosintesi di stilbeni e se i due fenomeni potessero essere in relazione.

L'iniziale analisi condotta con HPLC-DAD-MS su foglie infettate con il patogeno fungino di alcuni individui totalmente resistenti ha suggerito che la sintesi di stilbeni è molto dipendente dallo stadio di sviluppo fogliare: la terza foglia a partire dall'apice infatti ha sintetizzato una quantità di stilbeni di gran lunga superiore a quella delle foglie distali. Le foglie più giovani, con stomi neoformati e quindi facilmente attaccabili da *P. viticola*, sintetizzerebbero più stilbeni delle foglie più vecchie, che avendo gli stomi progressivamente chiusi, risultano di per sé difficilmente colonizzabili da parte del patogeno fungino (Stein e Blauch, 1985).

Inoltre è stato confermato che nella foglia gli stilbeni si formano per lo più in seguito ad infezione fungina, in tempi successivi alle 48 h, in accordo con i dati in letteratura (Pezet *et al.*, 2004a).

Sulla base dei risultati ottenuti nella prima fase, l'analisi degli stilbeni nei 105 individui della progenie e nei parentali è stata eseguita nella terza foglia, campionata a 6 giorni dall'infezione con *P. viticola*. L'analisi ha permesso di classificare gli individui come "alto", "basso" e "non-produttori" di *trans*-resveratrolo, confermando la variabilità osservata a livello fenotipico. Con sorpresa il parentale Freiburg è risultato appartenere al gruppo dei "non-produttori" di stilbeni a 6 giorni dall'infezione con *P. viticola*.

Complessivamente la concentrazione in *trans*-resveratrolo delle foglie infettate è risultata correlata significativamente con la resistenza, in accordo con lavori precedenti (Langcake, 1981, Sbaghi *et al.*, 1995, Pezet *et al.*, 2004a).

Il resveratrolo, così come il suo derivato glicosilato piceide, non sono composti altamente tossici, a causa del loro carattere idrofilico (Dercks e Creay, 1989, Perez e Pont, 1995, Pezet *et al.*, 2004b). Sono i derivati del resveratrolo, tra cui δ -viniferina e pterostilbene, rispettivamente dimero e derivato demetilato, i reali mediatori di resistenza, risultando molto più efficaci nell'inibire lo sviluppo del micelio di *P. viticola* (Pezet *et al.*, 2004a-b).

Nella popolazione d'incrocio molti individui hanno presentato livelli di *trans*- ϵ -viniferina, *trans*+*cis*- δ -viniferina e *trans*-pterostilbene al di sotto del limite di quantificazione, anche successivamente a trattamento con *P. viticola*. Tuttavia in 17 individui è stato quantificato almeno uno di tali composti e in 6 di essi è stato possibile quantificarli tutti. I sei individui produttori di tutti gli stilbeni appartenevano inoltre alla classe fenotipica di totale e parziale resistenza al fungo, in virtù della già evidenziata correlazione tra risposta al patogeno e produzione di fitoalessine.

Nell'analisi inoltre sono stati identificati degli oligostilbeni e stilbenoidi probabilmente non ancora isolati *Vitis* spp.. Si è quindi messo a punto un metodo per isolare tali composti a partire da un estratto fogliare grezzo, come presupposto per la successiva identificazione univoca tramite spettroscopia NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI 458 BANDE DIFFERENZIALMENTE ESPRESSE TRAMITE ANALISI AFLP-TP

La presenza, rivelata dall'analisi del profilo stilbenico e dal fenotipo di resistenza, di genotipi considerabili come “varianti trasgressive” rispetto al parentale Freiburg, fonte della resistenza a base genetica, ha sollecitato l'indagine delle basi molecolari del fenotipo di resistenza a *P. viticola* mediante un'analisi globale di espressione genica.

Grazie ad un'analisi AFLP-TP, è stato possibile monitorare i cambiamenti a livello trascrizionale a 12, 24 48, 96 ore dall'inoculo fungino nelle foglie dell'individuo F₁ 21/66 e del parentale Freiburg. Il primo era risultato totalmente resistente al fungo e “alto produttore” di *trans*-resveratrolo, il secondo parzialmente resistente e “non produttore” di *trans*-resveratrolo.

La logica del disegno sperimentale è stata quindi quella di confrontare, a livello trascrizionale, il parentale fonte della resistenza nell'incrocio e uno dei genotipi “trasgressivi” per cercare di studiare quali cambiamenti trascrizionali fossero alla base dell'interazione incompatibile a *P. viticola* in *Vitis* spp.

È stato scelto un arco temporale di analisi che fosse compatibile con il processo di infezione da parte di *P. viticola* e con gli eventi cellulari, a valle del riconoscimento del patogeno, che culminano con una riprogrammazione della trascrizione genica (Kortekamp e Zyprian, 2003).

Utilizzando 128 combinazioni di “primer” selettivi, è stato possibile seguire il profilo di espressione di circa 8.000 frammenti, derivanti da trascritti, di cui 458 hanno presentato una variazione di espressione tra il campione controllo e i campioni trattati, in entrambi gli individui o in uno solo dei due.

Sulla base della cinetica di modulazione, i 458 trascritti, di cui il 68% indotti e il 32% repressi, sono stati raggruppati in 10 principali gruppi di co-modulazione. Il risultato secondo cui la maggior parte dei trascritti (68%) ha una modulazione precoce è in accordo con la cinetica di modulazione, riportata in letteratura, per molti geni correlati con la difesa in foglie e bacche di vite infettate con funghi biotrofi, tra cui *P. viticola* (Busam *et al.*, 1997a e b, Bezier *et al.*, 2002, Borie *et al.*, 2004, Kortekamp, 2006). Inoltre il fatto che il 29% dei trascritti presenti una modulazione in fase tardiva (a partire dalle 48 h), la metà dei quali esclusivamente a 96 h dall'infezione fungina, rappresenta una fonte di informazione aggiuntiva rispetto alla letteratura, in cui lo spazio temporale di analisi si ferma a 48 h.

Il sequenziamento diretto dei prodotti dell'amplificazione selettiva corrispondenti ai 458 frammenti differenziali ha permesso l'ottenimento di sequenze di buona qualità per il 70% di essi (318). Tale percentuale di successo è in accordo coi risultati ottenuti in un lavoro di caratterizzazione trascrizionale con AFLP-TP in tabacco eseguito secondo il medesimo protocollo (Zago *et al.*, 2006).

L'annotazione, per omologia di sequenza, delle 318 sequenze mediante ricerca in banche dati nucleotidiche e proteiche (IASMA, <http://genomics.research.iasma.it> e GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html, UniProt, www.ebi.uniprot.org) ha evidenziato un 23% (73) di sequenze ignote (“*no hit found*”). Questo gruppo di sequenze è particolarmente interessante in quanto la sua analisi potrebbe rivelare degli aspetti specifici dell'interazione vite/ *P.viticola*. Le 245 sequenze rimanenti (77%) sono state assegnate a 297 termini del vocabolario del Gene Ontology (GO) sulla base dell'omologia di sequenza e di evidenze sperimentali della letteratura.. Il successivo raggruppamento in 9 categorie funzionali, definite da termini GO generici dell'ontologia *biological_process*, ha consentito di ottenere una panoramica dei cambiamenti, a livello di processo biologico, durante un'interazione incompatibile in vite.

In particolare è interessante quanto è emerso dall'analisi della distribuzione delle categorie funzionali tra i trascritti modulati precocemente (12 hdi) e tardivamente (96 hdi).

Le categorie funzionali “*response to stimulus*”, “*nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism*” e “*metabolic process*”, a cui risultano rispettivamente assegnati trascritti codificanti proteine di risposta a stimoli biotici, abiotici ed endogeni, regolatori trascrizionali e proteine del metabolismo primario, sono le più popolate sia in fase precoce che tardiva.

La classe fotosintetica (“*photosynthesis*”, 5,4%) invece è rappresentata solo da trascritti indotti in fase precoce, in accordo con evidenze in letteratura riguardo alla comunicazione tra le vie di

segnalazione dipendenti dalla luce e da acido salicilico per l'instaurarsi della risposta ipersensibile (Genaud *et al.*, 1998, Genaud *et al.*, 2002).

Inoltre è interessante notare come il 27% delle sequenze mostra omologia con proteine di cui non è nota la funzione biologica ("*biological process unknown*"), rappresentando insieme alle sequenze non annotate una risorsa di informazioni per comprendere il processo di resistenza al patogeno fungino.

L'approccio AFLP-TP si è dimostrato molto valido ed attendibile in quanto, senza nessuna informazione di sequenza *a priori*, ha permesso l'isolamento e l'identificazione di 458 trascritti differenzialmente espressi, di cui il 92% modulati nell'individuo totalmente resistente F₁ 21/66.

I risultati sono stati validati anche mediante l'analisi di espressione di 15 trascritti in "Real-time RT-PCR", che ha dimostrato un accordo, quasi completo, dei profili di espressione definiti con le due tecniche.

IDENTIFICAZIONE DI UN SET DI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI IN INDIVIDUI RESISTENTI E SUSCETTIBILI A *P. VITICOLA* TRAMITE ANALISI "OLIGO-MICROARRAY"

La possibilità di analizzare i livelli di trascrizione di molti geni in un unico esperimento ha stimolato la costruzione di un "oligo-array" contenente le sequenze ottenute nell'analisi AFLP-TP ed inoltre sequenze note per essere coinvolte nei meccanismi di resistenza a patogeno.

"Oligo-array" a tecnologia Combimatrix sono stati scelti in quanto consentivano una progettazione personale dell'"array" e risultavano relativamente poco costosi.

Il vetrino CustomArrayTM4x2K[®] (Combimatrix), dotato di 4 "array" indipendenti di ibridazione, ha permesso di estendere rapidamente l'analisi di espressione genica ad individui suscettibili della popolazione d'incrocio ('Teroldego' e individuo F₁ 22/73) e di ripetere l'analisi sull'individuo resistente F₁ 21/66. L'analisi trascrizionale è stata effettuata a 12 e 96 ore dall'infezione con *P. viticola*, che si sono rivelati i tempi più importanti dell'interazione incompatibile con il fungo.

L'analisi statistica SAM dei dati di ibridazione relativi ai 3 individui in studio ha permesso di identificare un set di geni differenzialmente espressi in uno o in entrambi i tempi analizzati. Tali geni sono stati successivamente utilizzati per caratterizzare i cambiamenti trascrizionali presenti in un individuo resistente rispetto ad uno suscettibile dopo infezione fungina.

L'analisi tra controllo e trattati all'interno di ciascun individuo ha evidenziato 159 geni modulati significativamente nell'individuo resistente F₁ 21/66 e 103 nel parentale suscettibile

‘Teroldego’. La maggior parte di questi è risultato indotto, mentre circa metà dei 114 geni significativamente modulati nell’individuo suscettibile F₁ 22/73 è risultato represso.

I risultati di questa prima analisi sottolineano quindi delle importanti differenze fra i tre individui esaminati, che possono forse spiegare la loro diversa suscettibilità al patogeno. Tuttavia è presumibile che siano anche rilevanti la cinetica e l’ampiezza di modulazione nel caso di trascritti modulati in tutti gli individui considerati.

LA RISPOSTA IPERSENSIBILE A *P. VITICOLA* DIPENDE DALL’ACCUMULO, TEMPORALMENTE CONTROLLATO, DI IONI CALCIO, COMPOSTI FENOLICI E FITOALESSINE E DALL’AZIONE DI PROTEINE CONNESSE A PATOGENESI

La sequenza e la durata degli eventi che si osservano già dai primi minuti dall’interazione ospite-patogeno variano in base al tipo di ospite e di patogeno. Tuttavia 3 eventi chiave sono comuni a tutte le interazioni, l’aumento della concentrazione di calcio citosolico e dei flussi ionici transmembrana, l’aumento dell’attività chinasi ed il verificarsi di un “burst” ossidativo e nitrosativo (Ebel e Mithofer, 1998, Bolwell, 1999).

Alla luce di questa conoscenza è significativo il ritrovamento di geni con modulazione già nelle prime 12 ore, che sembrano correlati a questi processi. In particolare si è verificata la repressione di un gene codificante la proteina legante calcio, calmodulina (Q6LCY3), l’induzione di geni codificanti un canale di K⁺ (Q9FS92) e di una H⁺-ATPasi vacuolare (Q9MB47) e la repressione di geni per fosfatasi (Q8GUC2 e Q9M3V1) unita all’induzione di geni per recettori coinvolti nella fosforilazione proteica (Q8GZ99, Q8VWW7, Q9FTF3, Q5Z9P3).

Per quanto riguarda l’interazione vite-*P.viticola* in particolare, studi *in vitro* con piantine di vite resistenti al fungo hanno mostrato come all’infezione segua un meccanismo attivo di difesa, temporalmente controllato, che prevede anche l’attivazione trascrizionale di geni codificanti proteine connesse a patogenesi (PR), enzimi che sintetizzano composti fenolici nella parete ed enzimi di sintesi di fitoalessine (Kortekamp e Zyprian, 2003).

Numerosi geni significativamente modulati nell’analisi “oligo-array” codificano per proteine PR ed il loro profilo di espressione sembra essere il risultato di una complessa regolazione, genotipo dipendente, tra il meccanismo di resistenza basale e quella indotta dal patogeno fungino.

Nel genotipo resistente l’induzione a 96 hdi del gene codificante per PR1 (AJ536326) è in accordo con la capacità di tali proteine di contrastare la crescita degli oomiceti patogeni,

sebbene la loro espressione non sia specifica ma spesso effetto di un meccanismo generale di stress (Van Loon *et al.*, 1999).

È significativo che il gene omologo ad un'osmotina (Y10992) è risultato indotto nell'individuo resistente F₁ 21/66 e represso precocemente nell'individuo suscettibile F₁ 22/73, mentre un altro gene codificante per una taumatina (TC38581) è risultato represso in entrambi gli individui.

Vi sono infatti evidenze contrastanti in vite riguardo al ruolo di taumatine ed osmotine (PR5) nella risposta a patogeni fungini: esse mostrano una forte attività antifungina *in vitro* inibendo lo sviluppo fungino (Monteiro *et al.*, 2003), ma risultano costitutivamente espresse in cultivar resistenti e suscettibili di *Vitis* spp. dopo infezione con *P. viticola* (Kortekamp, 2006).

La repressione dei due geni (Y10992 e TC38581) nell'individuo suscettibile è accompagnata dalla contemporanea induzione del gene codificante per una proteina "RING/C3HC4/PHD zinc finger-like" (Q84KA9). È noto che in piante di *Arabidopsis* in cui è stato sovraespresso il gene *CaRFP1* che codifica per una proteina RING/C3HC4 è accompagnata dalla repressione dei geni *PR5*, conferendo suscettibilità a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Hong *et al.*, 2006).

Il profilo di espressione nell'individuo resistente e in 'Teroldego' del gene *PR10.1* di *V. vinifera* (AJ291705), codificante per una proteina connessa a patogenesi con attività ribonucleasica, è in accordo con il ruolo ipotizzato per le proteine PR10 in cultivar di *Vitis* spp. resistenti e suscettibili a *P. viticola* (Kortekamp, 2006): l'induzione tardiva nell'individuo resistente sarebbe alla base dello sviluppo della risposta ipersensibile, l'induzione precoce nell'individuo suscettibile non sarebbe invece in grado di frenare il patogeno dopo la sua penetrazione.

Infine l'espressione costitutiva nell'individuo resistente dei geni per le chitinasi PR3 (DQ267094) e PR4 (AB105374) potrebbe rappresentare parte del meccanismo basale di resistenza, in contrasto con la repressione di PR3 in entrambi gli individui suscettibili. È diverso il caso del gene *PR2* codificante una β -1,3-glucanasi (AJ277900), che è risultato esclusivamente espresso dopo infezione nell'individuo resistente.

Dal momento che la parete cellulare di *P. viticola* e di altre Peronosporaceae è costituita da chitina e glicano, l'espressione costitutiva o indotta di chitinasi e glucanasi potrebbe contribuire all'inibizione della crescita del fungo o degradandone direttamente la parete cellulare o generando dei frammenti che funzionano da elicitivi di altri meccanismi di resistenza a valle (Robert *et al.*, 2002, Busam *et al.*, 1997b, Kortekamp, 2006).

Anche l'espressione di geni codificanti gli enzimi di sintesi di composti fenilpropanoidi è risultata fortemente dipendente dal genotipo.

L'induzione nel genotipo resistente dei geni 4CL (TC44994), COMT (Z54223) e DFR (X75964), codificanti rispettivamente per la 4-cumarato-CoA ligasi, la caffeico-O-metiltransferasi e la diidroflavonol 4-reduttasi, suggeriscono che in F₁ 21/66 la presenza del fungo stimoli sintesi di lignina e proantocianidine a differenza dei genotipi suscettibili, in cui tali geni sono repressi.

Anche l'espressione di membri delle stilbene sintasi, l'enzima di sintesi del resveratrolo, è strettamente dipendente dal "background genetico": il gene per la StSy (S63225), isolato nel lavoro da sospensioni cellulari di *Vitis vinifera* cv. Optima (Melchior e Kindl, 2001), è indotto solo nell'individuo resistente (F₁ 21/66), mentre il gene per la StSy (X76892), isolato nel lavoro di Sparvoli *et al.*, 2004, è indotto negli individui F₁ 21/66 e 'Teroldego' mentre è represso nell'individuo suscettibile F₁ 22/73.

Sulla base di questi risultati, il profilo di espressione del gene per la StSy (S63225), indotto esclusivamente nell'individuo resistente, è stato validato con "Real-time RT-PCR" ed analizzato anche al parentale Freiburg.

Il fatto che tale gene sia risultato costitutivamente espresso negli individui suscettibili, precocemente indotto e poi represso nel parentale Freiburg, parzialmente resistente, ed indotto gradualmente nell'individuo resistente è in accordo con pubblicazioni precedenti (Wiese *et al.*, 2004, Borie *et al.*, 2004, Serazetdinova *et al.*, 2005). Risultati simili sono stati ottenuti anche in un'analisi di espressione genica che utilizza cultivar resistenti e suscettibili di *Vitis* spp., trattate con *Uncinula necator*. Essi hanno evidenziato come il gene codificante la stilbene sintasi (S63225) venga indotto a 12 h e represso a 48 h dall'infezione nella cultivar suscettibile (Qiu W., *personal communication*).

Tali evidenze a livello molecolare sono in buon accordo con i risultati ottenuti a livello biochimico e presenti in letteratura (Pezet *et al.*, 2004a): l'induzione precoce della StSy negli individui suscettibili e la conseguente sintesi di resveratrolo, non conferirebbero resistenza, poiché lo stilbene verrebbe rapidamente trasformato nel derivato glicosilato e non tossico chiamato piceide; l'induzione precoce ma progressiva del gene nell'individuo resistente garantirebbe invece un continuo apporto di resveratrolo, che, per opera di specifiche perossidasi, verrebbe dimerizzato, con la sintesi di viniferine ad azione più tossica.

COMUNICAZIONE TRA VIE DI SEGNALE COINVOLTE NELLA DIFESA E TRA VIE DI SEGNALE IN RISPOSTA A STRESS BIOTICI ED ABIOTICI DOPO INFEZIONE CON *P. VITICOLA*.

La regolazione sia spaziale che temporale dell'espressione dei geni di difesa è cruciale nel determinare l'esito della risposta al patogeno. Per questo motivo esiste una stretta comunicazione tra vie di segnalazione coinvolte nella difesa e vie di segnalazione attivate da stress biotici ed abiotici (Schenk *et al.*, 2000, Wan *et al.*, 2002). Un ruolo importante in questo senso è svolto dai regolatori trascrizionali dei geni codificanti i determinanti della resistenza o di altre proteine correlate alla difesa.

Nell'individuo resistente è stata osservata l'induzione a 96 hdi dei geni codificanti i fattori di trascrizione WRKY3 (Q9M6E1) e WRKY4 (Q6RZW9). Esistono numerosi lavori che provano l'induzione dei geni codificanti i fattori WRKY in risposta a patogeno ed il loro legame ai "W-box" presenti nei promotori di molti geni correlati alla difesa (Eulgem *et al.*, 1999, Chen e Chen, 2000, Chen e Chen, 2002). In un recente lavoro l'applicazione esogena di ergosterolo, un elicitore non specifico fungino, in sospensioni cellulari di vite, ha indotto l'espressione dei geni *Vv WRKY1*, *Vv LTP1* e *Vv StSy1*, portando al conseguente accumulo di resveratrolo e ad un fenotipo di tolleranza a *Botrytis cinerea* (Laquittaine *et al.*, 2006).

Tuttavia in *A. thaliana* è stato evidenziato che i fattori WRKY possono agire anche come regolatori negativi della resistenza basale a *P. syringae* pv. *tomato* e questo potrebbe spiegare l'overespressione del fattore WRKY (Q9M6E0) osservata in questo studio nel parentale suscettibile (Journot-Catalino *et al.*, 2006).

Anche per alcuni membri della famiglia di fattori di trascrizione con dominio NAC è noto il coinvolgimento nella risposta a stress biotici, oltre che nello sviluppo (Xie *et al.*, 1999, Collinge and Boller, 2001, Oh *et al.*, 2005, McGrath *et al.*, 2005).

Il gene codificante un fattore di trascrizione con dominio NAC (Q6RH27) è risultato represso in tutti gli individui, in contrasto con la sua induzione evidenziata dall'analisi AFLP-TP poi validata con "Real-time RT-PCR". Ciò potrebbe essere dovuto alla scarsa capacità dell'analisi "microarray" nel discriminare sequenze con omologia di sequenza maggiore dell'80%.

Il ritrovamento inoltre di geni significativamente modulati che codificano per regolatori di trascrizione di risposta ad etilene (ERF), noti essere coinvolti nella risposta di difesa in *Arabidopsis* (Onate-Sanchez e Singh, 2002, Gutterson e Reuber, 2004, Onate-Sanchez *et al.*, 2007), suggerisce che la risposta al patogeno dipenda anche da questo ormone gassoso.

L'induzione di fattori di trascrizione di tipo ERF è risultata correlare nell'individuo resistente con l'induzione dei geni codificanti enzimi del "pathway" di sintesi di etilene, tra cui l'S-AdenosilMetionin Sintetasi 1 (TC38332) e l' ACC-Ossidasi (TC38453).

Inoltre negli individui suscettibili è risultata significativa l'induzione del gene codificante una chinasi MAPK3 (TC39559) insieme alla repressione di un gene per un fattore di risposta ad etilene di tipo DREB (TC45185). È noto infatti che in assenza di etilene si scatena una cascata di segnalazione dipendente da MAP chinasi che inibisce l'espressione di fattori di trascrizione di tipo DREB regolando negativamente il "pathway" di risposta dipendente da etilene (Wang *et al.*, 2002).

Se si considera però che *P. viticola* è un biotrofo obbligato, tali risultati sono in contrasto con ciò che è stato proposto nella pianta modello *Arabidopsis*: la risposta a patogeni biotrofi dipende esclusivamente da acido salicilico e quella a necrotrofi dalla sinergia tra acido giasmonico ed etilene (McGrath *et al.*, 2005, Glazebrook, 2005). La separazione tuttavia non è così netta, poichè vi sono prove in *Arabidopsis* dell'interazione tra etilene ed acido salicilico durante il processo di risposta sistemica (SAR) (Frye *et al.*, 2001).

La risposta di resistenza a *P. viticola* sembra essere inoltre strettamente connessa alla via di segnalazione dipendente dalla luce. Infatti nell'individuo resistente i geni della categoria "photosynthesis" risultano esclusivamente indotti, mentre negli individui suscettibili per lo più repressi. In particolare è evidente la forte induzione, esclusivamente nell'individuo resistente, di geni codificanti proteine che legano clorofilla a/b ("CAB-binding protein") (Q1A179, Q9XQB1, Q41424) ed il loro precursore (Q32291), appartenenti alla via di segnalazione dipendente da fitocromo A.

In *Arabidopsis* geni codificanti proteine CAB sono risultate indotte dopo trattamento con acido salicilico, supportando l'ipotesi che la via di segnalazione dipendente da acido salicilico comunichi con quella dipendente da fitocromo A (Genoud and Metraux, 1999). L'ipotesi è stata confermata dagli elevati livelli dell'espressione del gene *PR1* in un mutante negativo della segnalazione dipendente da fitocromo A e B (*psi2*), identificato in base ad un'elevata attività del transgene *CAB2-LUC* (CAB2-luciferasi) (Genoud *et al.*, 1998, Genoud *et al.*, 2002).

La repressione significativa di geni codificanti per una proteina del fotosistema II (Q6LDZ6) nell'individuo F₁ 22/73 e per proteine CAB (Q41424) e per la RuBisCO ("Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase") in entrambi gli individui suscettibili è probabilmente correlabile con la perdita della capacità fotosintetica associata allo sviluppo di clorosi nella manifestazione della malattia. Una significativa percentuale di geni repressi

codificanti proteine associate ai complessi fotosintetici è stata rilevata anche nella cultivar suscettibile 'Regent' dopo infezione con *P. viticola* (Polverari *et al.*, 2006) e nella cultivar suscettibile 'Carménère' durante un processo di infezione sistemica virale (Espinoza *et al.*, 2006).

IL CONFRONTO TRA I PROFILI DI ESPRESSIONE OTTENUTI CON AFLP-TP ED "OLIGO-MICROARRAY" HA MOSTRATO UN ACCORDO DEL 60%

Il confronto dei risultati di espressione genica ottenuti mediante AFLP-TP ed "oligo-array", relativi all'individuo resistente, ha mostrato che il 60% dei trascritti modulati in AFLP-TP a 12 ore risultava modulato di almeno 1,3 volte anche nell'esperimento di "microarray". Tale percentuale è in accordo con i risultati ottenuti in un lavoro di caratterizzazione trascrizionale del processo di maturazione della bacca di *V. vinifera* realizzato con AFLP-TP e "cDNA-microarray" (Ferrarini, 2006). Le differenze sono compatibili con il fatto che la tecnica "microarray", basata su ibridazione, ha una minor sensibilità rispetto alla tecnica AFLP-TP, che si basa su una reazione di amplificazione per PCR. Tuttavia il confronto tra le due tecniche per i dati relativi alle 96 ore non ha confermato un numero più elevato di trascritti modulati in AFLP-TP.

Per quanto riguarda la conservazione dei profili di espressione è stato rilevato un accordo del 60%. Le differenze potrebbero essere spiegate dalla minore capacità dell'analisi "microarray" nel discriminare sequenze con omologia di sequenza maggiore dell'80%, come nel caso di membri di una stessa famiglia genica.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La caratterizzazione fenotipica e metabolica della popolazione derivante dall'incrocio tra Freiburg x 'Teroldego', rispettivamente parzialmente resistente e suscettibile a *P. viticola*, ha evidenziato una forte variabilità, genotipo-dipendente, nella risposta di resistenza al patogeno fungino. In particolare ha permesso di identificare degli individui F₁, che risultano essere delle "varianti trasgressive" rispetto al parentale fonte della resistenza nell'incrocio. Essi manifestano infatti un fenotipo di totale resistenza nonché un notevole accumulo di stilbeni e potranno essere il punto di partenza per programmi di miglioramento genetico.

La caratterizzazione dei cambiamenti trascrizionali dopo infezione con il patogeno fungino ha permesso di evidenziare differenze nei profili di espressione tra individui resistenti e

suscettibili al patogeno, identificando geni che sono potenzialmente coinvolti nel processo di resistenza, ma che necessitano di ulteriori validazioni.

La variabilità riscontrata a livello fenotipico e metabolico è stata ritrovata anche a livello molecolare: la resistenza al patogeno fungino ha una base genetica complessa, la cui espressione sembra dipendere fortemente dal genotipo, oltre che dalle condizioni ambientali.

La Figura 30 è quindi una rappresentazione schematica degli eventi precoci e tardivi, a livello metabolico e trascrizionale, che avvengono in individui resistenti e suscettibili a *P. viticola*. Tuttavia non si tratta di un modello conclusivo ma esso dovrà essere arricchito dall'analisi di espressione di alcuni geni chiave, risultati differenzialmente espressi, in gruppi di individui appartenenti alle quattro classi fenotipiche individuate nella popolazione d'incrocio.

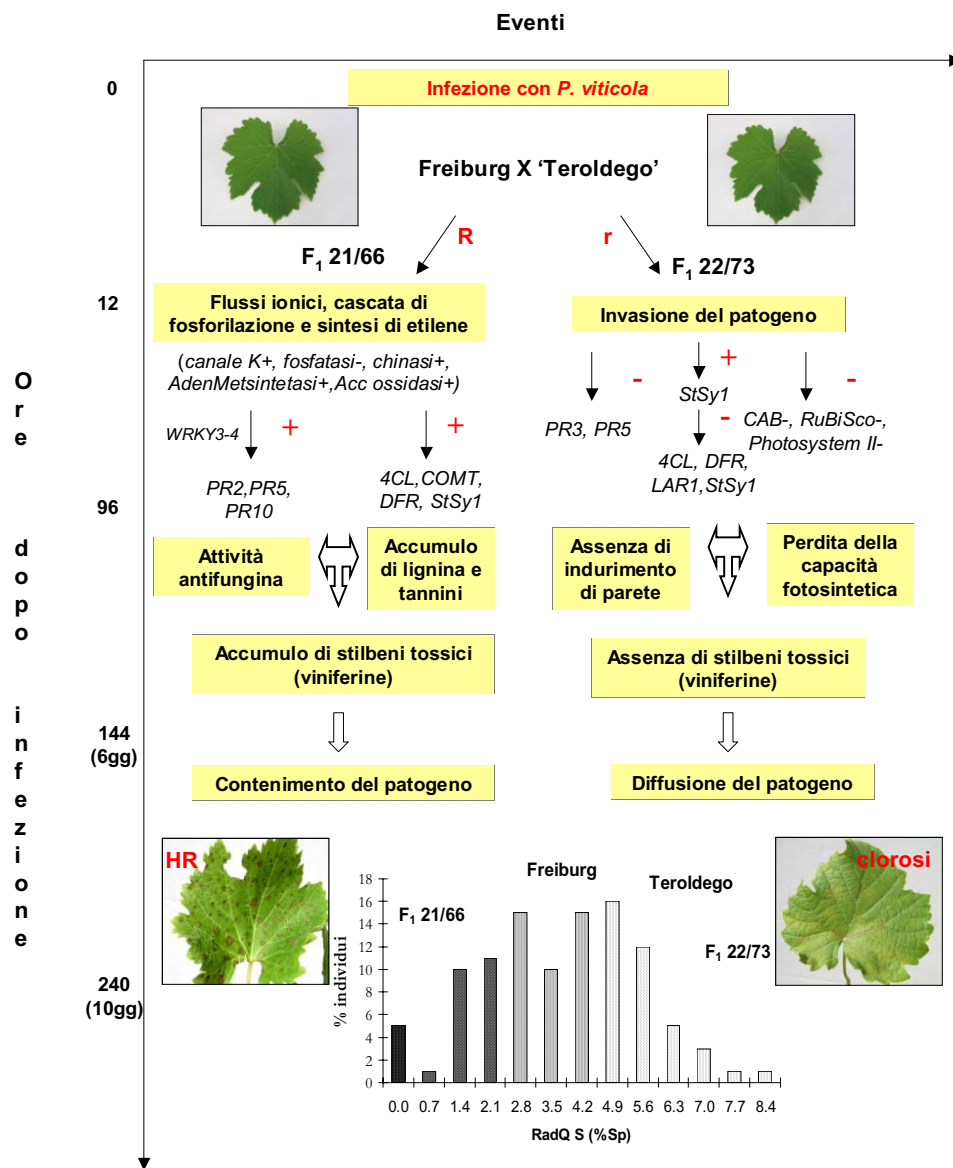


Figura 30 Rappresentazione schematica degli eventi precoci e tardivi dopo infezione con *P. viticola* in individui resistenti e suscettibili della popolazione d'incrocio.

6 SOMMARIO

La maggior parte delle varietà di *Vitis vinifera* oggi coltivate è stata generata dall'incrocio non controllato tra viti addomesticate e viti selvatiche e tale processo è stato accompagnato da una graduale perdita dei tratti di resistenza ai patogeni portati dalla vite selvatica. Tra gli agenti causali di malattie che colpiscono foglie e grappoli della vite coltivata, uno dei principali è costituito da *Plasmopara viticola*, fungo biotrofico appartenente all'ordine degli oomiceti.

L'obiettivo principale di questo progetto di dottorato è stato quello di approfondire, mediante lo studio della modulazione dei profili trascrizionali e metabolici, i meccanismi alla base del processo di resistenza della vite a *P. viticola*, per identificare geni e metaboliti coinvolti in tale processo.

Lo studio è stato condotto su alcuni individui di una popolazione F_1 segregante per il tratto di resistenza a *P. viticola* e derivante dall'incrocio tra Freiburg 993-60 (ibrido complesso di *V. vinifera*, *V. rupestris* e *V. lincecumii*) e la cultivar di *V. vinifera* 'Teroldego'. L'obiettivo è stato perseguito tramite l'impiego di tecniche di caratterizzazione trascrizionale e metabolica su ampia scala, quali AFLP-TP e "microarray" da un lato ed HPLC-DAD-MS dall'altro. Inizialmente è stata eseguita una caratterizzazione della risposta al fungo nella popolazione d'incrocio, a distanza di 10 giorni dall'infezione fungina, che ha evidenziato una variabilità di risposta genotipo-dipendente ed ha permesso di assegnare gli individui a classi fenotipiche con diverso grado di resistenza.

L'analisi HPLC-DAD-MS, condotta parallelamente sugli stessi campioni, ha portato a tre risultati principali: ha confermato l'accumulo di stilbeni in seguito all'infezione fungina, ha evidenziato individui "alto", "basso" e "non-produttori" di *trans*-resveratrolo ed ha identificato oligostilbeni e stilbenoidi non ancora isolati e caratterizzati in specie di vite. In particolare la concentrazione di *trans*-resveratrolo delle foglie infettate è risultata correlata significativamente con il fenotipo della resistenza come già riportato in altri studi.

Gli esperimenti di AFLP-TP, condotti a partire da RNA estratto dalle foglie dell'individuo F_1 21/66 e del parentale Freiburg, hanno permesso di monitorare i cambiamenti trascrizionali che avvengono a 12, 24, 48 e 96 ore dall'inoculo fungino. L'individuo F_1 21/66 era risultato totalmente resistente al fungo e "alto produttore" di *trans*-resveratrolo, mentre Freiburg era risultato parzialmente resistente e "non produttore" di *trans*-resveratrolo.

Mediante AFLP-TP sono stati isolati ed identificati 458 trascritti differenzialmente espressi rispetto ai controlli non trattati e la maggior parte di essi è risultata modulata nell'individuo totalmente resistente.

La successiva costruzione di "oligo-array" a tecnologia Combimatrix, a partire dalle 458 sequenze ottenute nell'analisi AFLP-TP, ha permesso di estendere rapidamente l'analisi di espressione genica al parentale 'Teroldego' e all'individuo F₁ 22/73, entrambi suscettibili al fungo e di ripetere l'analisi sull'individuo resistente F₁ 21/66. L'analisi trascrizionale è stata effettuata a 12 e 96 ore dall'infezione con *P. viticola*, che si sono rivelati i tempi con maggior modulazione nell'analisi AFLP-TP.

L'analisi statistica dei dati di ibridazione relativi ai 3 individui ha permesso di identificare un set di geni differenzialmente espressi in uno o in entrambi i tempi analizzati. In particolare il confronto tra controllo e trattati per ciascun individuo ha evidenziato 159 geni modulati significativamente nell'individuo resistente F₁ 21/66 e 103 nel parentale suscettibile 'Teroldego'. In entrambi, la maggior parte di questi geni è risultato indotto, mentre nell'individuo suscettibile F₁ 22/73 circa metà dei 114 geni significativamente modulati è risultato represso.

Per evidenziare ulteriori differenze fra gli individui sottoposti allo studio trascrizionale, le sequenze dei geni modulati sono state annotate con il vocabolario gerarchico Gene Ontology. Nell'individuo resistente (F₁ 21/66) è emersa la modulazione di geni codificanti proteine coinvolte sia negli eventi precoci, quali regolazione di flussi ionici e cascata di fosforilazione, successivi al riconoscimento del patogeno, sia in quelli tardivi quali sintesi di lignina, proantocianidine e stilbeni e degradazione di parete, che portano al contenimento ed alla morte del patogeno stesso. Negli individui suscettibili invece l'inibizione di geni codificanti chitinasi ed osmotine, enzimi di sintesi dei fenilpropanoidi e proteine dell'apparato fotosintetico, è in buon accordo con il fenotipo osservato, con l'incapacità di frenare la diffusione del patogeno e con la perdita delle funzionalità fotosintetiche e il conseguente sviluppo di clorosi.

7 BIBLIOGRAFIA

Ablett E, Seaton G, Scott K, Shelton D, Graham MW, Baverstock P, Lee LS, Henry R (2000) Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry *Plant Science* **159**: 87-95

Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold *J of Chemic Ecol* **23**:1689-1702

Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP; Rose LE, Beynon, JL (2004) Host-parasite coevolutionary conflict between Arabidopsis and downy mildew *Science* **306(5703)**:1957-60.

Alleweldt G, Possingham JV (1988) Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.*, **75**:669-673.

Alleweldt G, Spiegel-Roy P, Reisch BL (1990) Grapes (*Vitis*): 291-327 in Moore, JN e Ballington, JR Jr (eds) Genetic resources of temperate fruit and nut crops, vol I:488 pp

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleid Acid Res.* **25**:3389-3402.

Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JI, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Bohme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail MA, Churcher C, Hall N, Berriman M, Huang S, Kamoun S, Beynon JL, Birch PR (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm *Proc Natl Acad Sci USA* **102(21)**:7766-71.

Bachem CW, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development *Plant J* **9**: 745-753

- Barlass M, Miller RM, Douglas TJ** (1987) Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. II. Resveratrol production *Am J Enol Vitic* **38**:65-68
- Barker CL, Donald T, Pauquet J, Ratnaparkhe MB, Bouquet A, Adam-Blondon AF, Thomas MR, Dry I** (2005) Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Rm1*, using a bacterial artificial chromosome library *Theor Appl Genet* **111**: 370-377
- Bavaresco L, Petegolli D, Cantù E, Fregoni M, Chiusa G, Trevisan, M** (1997) Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea* *Vitis* **36** (2):77-83.
- Bavaresco L, Fregoni C, Cantu E, Trevisan M** (1999) Stilbene compounds: from the grapevine to wine *Drugs Exp Clin Res* **25**:57-63
- Bezier A, Lambert B, Baillieul F** (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea* *Eur J Plant Patbol* **108**:111-120
- Birch PR, Rehmany AP, Pritchard L, Kamoun S, Beynon JL** 2006 Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells *Trends Microbiol* **14**: 8-11
- Bisson LF, Waterhouse AL, Ebeler SE, Walker MA, Lapsley JT** (2002) The present and future of the international wine industry *Nature* **418**: 696-699
- Bolwell GP** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence *Curr Opin Plant Biol* **2**:287-294
- Borie B, Jeandet P, Parize A, Bessis R, Adrian M** (2004) Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors *Am J Enol Vitic* **55**:60-64
- Botella MA, Parker JE, Frost LN, Bittner-Eddy PD, Beynon JL, Daniels MJ, Holub EB, Jones JD** (1998) Three genes of the Arabidopsis RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants *Plant Cell* **10**: 1847-1860

- Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, Vanderhaeghen R, Inze D, Zabeau M** (2003) Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies *Mol Genet Genom* **269**: 173-179
- Bruggmann R, Abderhalden O, Reymond P, Dudler R** (2005) Analysis of epidermis- and mesophyll-specific transcript accumulation in powdery mildew-inoculated wheat leaves. *Plant Mol Biol* **58**: 247-267
- Buchanan BB, Gruissem, W, and Jones, RL** (2000). "Biochemistry & Molecular Biology of Plants". ASPP Press, pag.1101-1156.
- Busam G, Junghanns KT, Kneusel RE, Kassemeyer HH, Matern U** (1997a) Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol* **115**:1039-1048
- Busam G, Kassemeyer HH, Matern U** (1997b) Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge *Plant Physiol* **115**:1029-1038
- Chen C, Chen Z** (2000) Isolation and characterization of the two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco *Plant Mol Biol* **42**:387-396
- Chen C, Chen Z** (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor *Plant Physiol* **129**:706-716
- Collinge M, Boller T** (2001) Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding *Plant Mol Biol* **46**: 521-529
- Cramer GR, Ergul A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EAR, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schlauch KA, Schooley DA, Cushman JC** (2006) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles *Funct Integr Genomics* DOI 10.1007/s10142-006-0039-y
- Cui X, Churchill GA** (2003) Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments *Genome Biol* **4**: 210

- da Silva FG, Iandolino A, Al-Kayal F, Bohlmann MC, Cushman MA, Lim H, Ergul A, Figueroa R, Kabuloglu EK, Osborne C, Rowe J, Tattersall E, Leslie A, Xu J, Baek J, Cramer GR, Cushman JC, Cook DR (2005) Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development *Plant Physiol* **139**: 574-597
- Dai GH, Andary C, Mondolot-Cosson L, Boubals D (1995) Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola* *Physiol and Mol Plant Pathol* **46**:177-188
- Davies C, Robinson SP (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins *Plant Physiol* **122**: 803-812
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb, C (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:13454-13459
- Dercks W, Creasy LL (1989) The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction *Physiol Mol Plant Path* **34**:189-202
- Di Gaspero G, Cipriani G (2002) Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.) *Theor Appl Genet* **106**: 163-172
- Dixon MS, Jones DA, Feddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JDG (1996). The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins *Cell* **84**:451-459
- Donald TM, Pellerone F, Adam-Blondon AF, Bouquet A, Thomas MR, Dry IB (2002) Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor Appl Genet* **104**: 610-618
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* **16**: 755-768
- Doucleff M, Jin Y, Gao F, Riaz S, Krivanek AF, Walker MA (2004) A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica* *Theor Appl Genet* **109**: 1178-1187
-

- Ebel J, and Mithofer A** (1998) Early events in the elicitation of plant defense *Planta* **206**:35-348
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:14863-14868.
- Espinoza C, Vega A, Medina C, Schlauch K, Cramer G, Arce-Johnson P** (2006) Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. *Funct Integr Genomics* DOI 10.1007/s10142-006-0031-6
- Eulgem T, Weigman VJ, Chang HS, McDowell JM, Holub EB, Glazebrook J, Zhu T, Dangl JL** (2004) Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signalling pathway from downy mildew resistance *Plant Physiol* **135**:1129-1144
- Ewing B, Hiller L, Wendl MC, Green P** (1998) Base-calling of automate sequencer traces using phredI Accuracy assessment *Genome Res* **8**:175-185
- Ferrarini A** (2006) Caratterizzazione trascrizionale dei processi di sviluppo e maturazione della bacca di *Vitis vinifera* Tesi di dottorato in Biotecnologie Agro-Industriali, ciclo XVIII, università degli studi di VR, pag. 1-126
- Ferreira RB, Monteiro SS, Picarra-Pereira MA, Teixeira AR** (2004) Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability *Trends Biotechnol* **22**: 168-173
- Fisher BM, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Töpfer R, Zyprian EM** (2004) Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine *Theor Appl Genet* **108**:501-515.
- Fliegmann J, Schroder G, Schanz S, Britsch L, Schroder J** (1992) Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants *Plant Mol Biol* **18**: 489-503
- Flor HH** (1947) Host-parasite interactions in flax rust-Its genetics and other implications *Phytopathology* **45**:680-685
- Fontana P, Demattè L, Cestaro A, Segala C, Velasco R and Toppo S** (2006) GORetriever: a novel Gene Ontology annotation tool based on semantic similarity for

knowledge discovery in database In *Proceedings of Bioinformatics Italian Society* Bologna, Italy 28-29 April p57-58

Fung R, Fekete C, He Y, Qiu W, Kovacs L, Gonzalo M, McIntyre L, Huppert K, Schachtman D, Polacco J (2006) Comparative analysis of the powdery mildew-induced transcriptome in a resistant and a susceptible grapevine species using the *Vitis* GeneChip In: proceedings of the IXth International Conference of Grape Genetics and Breeding, Udine, Italia, 2-6 Luglio

Gabriel DW, and Rolfe BG (1990) Working models of specific recognition in plant-microbe interactions *Annu Rev Phytopathol* **28**:365-391

Genaud T, Millar AJ, Nishizawa N, Kay SA, Schäfer E, Nagatani A, and Chua NH (1998) An *Arabidopsis* mutant hypersensitive to red and far-red light signals *Plant Cell* **10**:889-904

Genoud T, Metraux JP (1999) Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network *Trends Plant Sci* **4**: 503-507

Genaud T, Buchala AJ, Chua NH, and Metraux JP (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis* *Plant J* **31(1)**:87-95

Gindro K, Pezet R, Viret O (2003) Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections *Plant Physiol and Biochem* **41**:846-853

Gindro K, Spring JL, Pezet R, Richter H, Viret O (2006) Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola* *Vitis* **45(4)**, 191-196

Glazebrook J, Rogers, EE, Ausuble, FM (1997) Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses *Annu Rev Genet* **31**:547-69

Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-227

- Goodwin PH, Hsiang T, Erickson L** (2000) A comparison of stilbene and chalcone synthases including a new stilbene synthase gene from *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier *Plant sci* **151**:1-8
- Grant JJ, Yun BW, Loake GJ** (2000) Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity *Plant J.* **24**:569-582
- Greenberg JT** (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:525-545
- Grimming B, Gonzales-Perez MN, Welzl G, Penuelas J, Schubert R, Hain R, Heidenreich B, Betz C, Langebartels C, Ernst D, Sandermann HJr** (2002) Ethylen- and ozone-induced regulation of a grapevine resveratrol synthase gene: different responsive promoter regions *Plant Physiol Biochem* **40**:865-870
- Gutterson N, Reuber TL** (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors *Curr Opin Plant Biol* **7**: 465-471
- Hamiduzzaman MM, Jakab G, Barnavon L, Neuhaus JM; Mauch-Mani B** (2005) β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling *Mol Plant Micro Inter* **18**(8):819-829
- Hart JH** (1981) Role of phytostilbenes in decay and disease resistance *Ann Rev Phytop* **69**:1138-1143
- Heath MC** (2000) Hypersensitive response-related death *Plant Mol. Biol.* **44**:321-334
- Hieter P, Boguski M** (1997) Functional genomics: it's all how you read it *Science* **278**: 601-602
- Hong JK, Choi HW, Hwang IS, Hwang BK** (2006) Role of a novel pathogen-induced pepper C3-H-C4 type RING-finger protein gene, CaRFP1, in disease susceptibility and osmotic stress tolerance *Plant Mol Biol* DOI 10.1007/s11103-006-9110-2
- Hoos G, Blaich R** (1990) Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola* *J. Phytopathol* **129**:102-110.
-

- Jean-Denis JB, Pezet R, Tabacchi R** (2006) Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry *J Chromatogr A* **1112**: 263-268
- Jean-Denis JB, Tabacchi R, Abou-mansour E, Pezet R** (2006) λ -viniferin, a new polyphenol characterized in stressed grapevine plants In Polyphenols communications 2006: XXIII International Conference on polyphenols Winnipeg, Mannitoba, Canada, 22-25 Agosto.
- Jeandet P, Bessis R, Sbaghi M, Meunier P** (1995b) The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to antocyanin content in grape berry skin *Vitis* **34**:91-94.
- Jeandet P, Douillet-Breuil, AC, Bessis, R, Debord, S, Sbaghi, M, Adrian, M** (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism *J. Agric. Food Chem.* **50**:2731-2734.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance *EMBO J* **19**(15):4004-4014
- Jordan BR** (1998) Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips" *J Biochem (Tokyo)* **124**: 251-258
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T** (2006) The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell* **18**: 3289-3302
- Kamoun S** (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes *Annu Rev Phytopathol* **44**: 41-60
- Kamoun S, Huitema E, Vleeshouwers VG** (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci* **4**: 196-200
- Katagiri F** (2004) A global view of defense gene expression regulation – a highly interconnected signalling network *Curr Opin Plant Biol* **7**:506-511
- Keen NT** (2000) A century of plant pathology: a retrospective view on understanding host-parasite interactions *Annu Rev Phytopathol* **38**:31-48

Kikkert JR (1997) Genetic engineering of grapevine (*Vitis sp.*) for enhancement of disease resistance *Acta Horti* **447**:273-279

Kindl H (2000) Interplay *Botrytis*-plant: plant stilbene synthase gene promoters responsive to *Botrytis*-made compounds and *Botrytis* chaperones sensitive to plant stilbenes phytoalexins. In Proceedings of the XIIth International *Botrytis* Symposium, Reims, Francia, 3-7 Luglio.

Kobayashi S, Ding CK, Nakamura Y, Nakajima I, Matsumoto R (2000) Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside) *Plant Cell Rep* **19**:904-910

Korhammer S, Reniero F, Mattivi F (1995) An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochem.* **38**:1501-1504.

Kortekamp A, Zyprian E (2003) Characterization of *Plasmopara*-Resistance in grapevine using *in vitro* plants. *J. Plant Physiol.* **160**:1393-1400

Kortekamp A (2005) Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of Peronosporaceae using light- and epifluorescence-microscopy *Mycol Res* **109**: 640-648

Kortekamp A (2006) Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen *Plant Physiol Biochem* **44**:58-67

Lam E, del Pozo O (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* **44**:417-428.

Langcake P, Pryce RJ (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other member of the *Vitaceae* as a response to infection and injury *Physiol Plant Pathol* **18**:213-226

Langcake P, Pryce RJ (1977a) A new class of phytoalexins from grapevines *Experientia* **33**(2):151-152.

Langcake P, Pryce RJ (1977b) The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation *Phytochem* **16**:1193-1196.

Langcake P, Lovell PA (1980) Light and electron microscopical studies of the infection of *Vitis* spp. by *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen *Vitis* **19**:321-337.

- Langcake P** (1981) Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiol Plant Pathol* **18**:213-226
- Lanz T, Tropf S, Marner FJ, Schroder J, Schroder G** (1991) The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways *J Biol Chem* **266**: 9971-9976
- Laquitaine L, Gomes E, Francois J, Marchive C, Pascal S, Hamdi S, Atanassova R, Delrot S, Coutos-Thevenot P** (2006) 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* **19**: 1103-1112
- Larronde F, Richard T, Delaunay JC, Decendit A, Monti JP, Krisa S, Merillon JM** (2005) New stilbenoid glucosides isolated from *Vitis vinifera* cell suspension cultures (cv. Cabernet Sauvignon) *Planta Med* **71**:888-90.
- Leister RT, and Katagiri F** (2000) A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeats class-can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo *Plant J* **4**:345-354
- Liang P, Pardee AB** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction *Science* **257**: 967-971
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL** (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays *Nat Biotechnol* **14**: 1675-1680
- Luo SL, He PC, Zhou P, Zheng XQ** (2001) Identification of molecular genetic markers tightly linked to downy mildew resistant genes in grape. *Yi Chuan Xue Bao* **28**: 76-82
- Marino R, Sevino F, Madini A, Vecchione A, Pertot I, Serra AD, Versini G, Velasco R, Grando MS** (2003) QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. In: proceedings of the VIIIth International Conference of Grape Genetics and Breeding *Acta Hort* (ISHS) **603**:527-533.

- Martin DM, Bohlmann J** (2004) Identification of *Vitis vinifera* (-)-alpha-terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry* **65**: 1223-1229
- Mattivi F, Reniero F** (1992) Oligostilbenes from the roots of genus *Vitis*. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* **16**:116-119.
- Mattivi F, Reniero F, Korhammer S** (1995) Isolation, characterization, and evolution in red wine vinifications of resveratrol monomers *J Agric Food Chem* **43**, 1820-1823
- Mattivi F, Clauser E, Tonon D, Forti D** (2000) Accumulation of resveratrol during the ripening of Cabernet Sauvignon and Merlot grape. In: proceedings of the XX Int. Conference on Polyphenols, Freising-Weihenstephan, Germany, September 11-15, Polyphenols Communications 2000, **2**:513-514.
- McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S, Holub EB, Dangl JL** (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis* *Plant Cell* **10**: 1861-1874
- McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, Scheible WR, Udvardi MK, Kazan K** (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression *Plant Physiol* **139**: 949-959
- Melchior F, Kindl H** (1991) Coordinate- and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima. *Arch Biochem Biophys* **288**: 552-557
- Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G, Greif C** (2003) Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia* *Acta Hort* (ISHS) **623**:451-456
- Merillon JM, Fauconneau B, Teguo PW, Barrier L, Vercauteren J, Huguet F** (1997) Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures *Clin Chem* **43**:1092-3

- Michel K, Abderhalden O, Bruggmann R, Dudler R** (2006) Transcriptional changes in powdery mildew infected wheat and *Arabidopsis* leaves undergoing syringolin-triggered hypersensitive cell death at infection sites *Plant Mol Biol* **62**: 561-578
- Monteiro S, Barakat M, Piçarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB** (2003) Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi *Phytopathol* **93**:1505-1512
- Moser C, Gatto P, Moser M, Pindo M, Velasco R** (2004) Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues *Mol Biotech* **26**:95-99
- Moser C, Segala C, Fontana P, Slakhudtinov I, Gatto P, Pindo M, Zyprian E, Toepfer R, Grando MS, Velasco R** (2005) Comparative analysis of expressed sequence tags from different grape organs of *Vitis vinifera* L. *Funct Integr Genomics* **5**:208-217
- Musetti R, Stringher L, Borselli S, Vecchione A, Zulini L, Pertot I** (2005) Ultrasctructural analysis of *Vitis vinifera* leaf tissues showing atypical symptoms of *Plasmopara viticola* *Micron* **36**:73-80
- OEPP/EPPO** (1997) Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products Vol 1-2 *OEPP/EPPO*, Francia
- Oh SK, Lee S, Yu SH, Choi D** (2005) Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens *Planta* **222**: 876-887
- Oñate-Sánchez L, Singh KB** (2002) Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection *Plant Physiol* **128**: 1313-1322
- Oñate-Sánchez L, Anderson JP, Young J, Singh KB** (2007) AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense *Plant Physiol* **143**: 400-409
- Pacey-Miller T, Scott K, Ablett E, Tingey S, Ching A, Henry R** (2003) Genes associated with the end of dormancy in grapes *Funct Integr Genomics* **3**:144-152

- Parker JE, Coleman MJ, Szabo V, Frost LN, Schmidt R, van der Biezen EA, Moores T, Dean C, Daniels MJ, Jones JD** (1997) The Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6 *Plant Cell* **9**: 879-894
- Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon AF** (2001) Establishment of a local map of AFLP markers round the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection *Theor Appl Genet* **103**:1201-1210
- Perez R, Pont V** (1995) Mode of action of the *Vitaceae* stilbenes on fungal cells. In Handbook of phytoalexin metabolism and action. Daniel M, PurkayashtaRP Eds: Marcel Dekker New York, 317, 331.
- Pezet R, Pont V** (1990) Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* *J of Phytopathol* **129**:19-30
- Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O** (2003) Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves *J Agric Food Chem* **27**:5488-92.
- Pezet R, Gindro K, Viret O, Spring JL** (2004a) Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew *Physiol. and Mol Plant Pathol* **65**:297-303
- Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H** (2004b) Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development *Vitis* **43**: 145-148
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucleic Acid Res* **29**:2002-2007
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L** (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e36
- Pilati S, Perazzolli M, Malossini A, Cestaro A, Demattè L, Fontana P, Dal Rì A, Viola R, Velasco R and Moser C** (2007) Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry development *Submitted to BMC Genomics*
-

- Polverari A, Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Regier N, Kortekamp A** (2007) Changes in grapevine transcriptional activity following infection with *Plasmopara viticola* In *Proceedings of XV Plant & Animal Genomes Conference*, San Diego, CA 13-17 Gennaio
- Pool RM, Creasy LL, Frackelton AS** 1981 Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs *Vitis* **20**:136-145.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data *Neurosciences Letters* **339**, 62-66
- Rehmany AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BT, Birch PRJ, Beynon JL** (2005) Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two Arabidopsis lines *Plant Cell* **17**:1839-1850.
- Reisch BL, Pratt C** (1996) Grapes: 297-369 in Janick, J, Moore, JN (eds) *Fruit breeding*, vol II:477 pp
- Reniero F, Rudolph M, Angioni A, Bernreuther A, Cabras P, Mattivi F** (1996) Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. *Vitis* **35**:125-127.
- Reymond P** (2001) DNA microarray and plant defences *Plant Physiol Biochem* **39**: 313-321.
- Richter H, Pezet R, Viret O, Gindro K** (2006) 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 Pathol* **67**:248-260
- Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R, Buffard D** (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens *Plant Sci* **162**: 389-400
- Rooney HC** (2005) *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**:1783-1786
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996) Systemic acquired resistance *Plant Cell* **8**:1809-1819
-

- Sbaghi M, Jeandet P, Faivre B, Bessis R, Fournioux JC** (1995) Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*) *Euphytica* **86**:41-47.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray *Science* **270**: 467-470
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11655-11660
- Schroder G, Brown JW, Schroder J** (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase *Eur J Biochem* **172**: 161-169
- Schmidlin L, Prado E, Coste P, Wiedemann-Merdinoglu S, Mestre P, Merdinoglu D** (2006) Analysis of cellular and molecular basis of downy mildew resistance in *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera* hybrids In:proceedings of the IXth International Conference of Grape Genetics and Breeding, Udine, Italia, 2-6 Luglio
- Serazetdinova L, Oldach KH, Lorz H** (2005) Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity *J Plant Physiol* **162**: 985-1002
- Shan W, Cao M, Leung D, Tyler BM** (2004) The Avr1b locus of Phytophthora sojae encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 394-403
- Smyth GK, Speed T** (2003) Normalization of cDNA microarray data *Methods* **31**: 265-273
- Terrier N, Ageorges A, Abbal P, Romieu C** (2001) Generation of ESTs from grape berry at various developmental stages *J Plant Physiol* **158**:1575-1583
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Leon C, Renaudin JP, Dedaldechamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S** (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* **222**: 832-847

- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G** (2001) Significant analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:5116-5121
- van der Biezen EA, Jones JDG** (1998b) Plant disease resistance proteins and “the gene-for-gene concept” *Trends Biochem Sci* **23**:454-456
- van Loon LC, van Strien EA** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins *Physiol Mol Plant Pathol* **55**:85-97
- Venter M, Burger AL, Botha FC** (2001) Molecular analysis of fruit ripening: the identification of differentially expressed sequences in *Vitis vinifera* using cDNA-AFLP technology *Vitis* **40**: 191-196
- Versari A, Parpinello GP, Tornielli GB, Ferrarini R, Giulivo C** (2001) Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J Agric Food Chem* **49**: 5531-5536
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al.** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Res* **23**: 4407-4414
- Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T, Matsuta N** (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens *Plant Cell Rep* **19**:639-646
- Waffo Teguo P, Decendit A, Vercauteren J, Deffieux G, Mérillon J-M** (1996) Trans-resveratrol-3-O-*glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* *Phytochem* **42**:1591-1593.
- Waffo-Teguo P, Fauconneau B, Deffieux G, Huguet F, Vercauteren J, Mérillon JM** (1998) Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures *J. Nat. Prod.* **61**:655-657.
- Waffo-Teguo P, Lee D, Cuendet M, Merillon J, Pezzuto JM, Kinghorn AD** (2001) Two new stilbene dimer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures *J Nat Prod.* **64** :136-8

- Walter M, Hollricher K, Salamini F, and Schulze-Lefert P** (1993) The mlo resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defense mimic phenotype *Mol Gen Genet* **239**: 122-128
- Wan J, Dunning FM, Bent AF** (2002) Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signalling using DNA microarrays *Funct Integr Genomics* **2**:259-273
- Wang KL, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks *Plant Cell* **14 Suppl**: S131-151
- Waterhouse AL, and Lamuela-Raventos RM** (1994) The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries *Phytochem* **37**:571-573
- Waters DL, Holton TA, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ** (2005) cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin *Funct Integr Genomics* **5**: 40-58
- Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Coste P, Dumas V, Butterlin G, Bouquet A, Merdinoglu D** (2006) Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia* In:proceedings of the VIIIth International Conference of Grape Genetics and Breeding, Udine (Italy), 2-6 luglio 2006
- Wiese W, Vornam B, Krause E, Kindl H** (1994) Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment *Plant Mol Biol* **26**: 667-677
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Guo H, Garcia JA, Gutierrez C** (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein *Plant Mol Biol* **39**: 647-656
- Zago E, Morsa E, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F** (2006) Nitric oxide-and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco *Plant Physiol* **141(2)**:404-411
- Zapata JM, Calderon AA, Munoz R, Ros Barcelo A** (1992) Oxidation of hydroquinone by both cellular and extracellular grapevine peroxidase fractions *Biochimie*. **74**:143-8.

8 APPENDICE

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC4M41-460	I	F1 21/66	TCVV011760	Q5BMA2_9ROSI	Secondary cell wall-related glycosyltransferase family 43.	GO:0009832:cell wall biosynthesis	cellular process (GO:0009987)
BC1M44-442	I	F1 21/66	TCVV024199	Q672Q8_LYCES	Adenylyl-sulfate reductase precursor	GO:0019421:sulfate reduction, APS pathway	
BT3M11-7	I	Fr e F1 21/66		Q4VC01_HUMAN	Plakophilin 2, isoform 2a	GO:0016337:cell-cell adhesion	
BC1M11-291	I	F1 21/66	FLW0018833	Q6SS00_ANTMA	YABBY-like transcription factor GRAMINIFOLIA	GO:0009908:flower development	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BC1M23-343*	I	Fr e F1 21/66	TCVV000736	Q9ZNX9_ARATH	Sigma-like factor precursor	GO:0006352:transcription initiation	
BC2M11-308	I	F1 21/66	TCVV007867	Q4VPE9_LOTJA	Lateral organ boundaries-like 1 (Fragment)	GO:0045449:regulation of transcription	
BC2M31-401	I	F1 21/66	TCVV020320	Q08707_PETCR	BPF-1 protein	GO:0045449:regulation of transcription	
BC1M13-301	I	Fr e F1 21/66	TCVV004081	Q8S3D7_ARATH	Putative bHLH transcription factor	GO:0045449:regulation of transcription	
BT3M21-157	I	Fr	TCVV008344	Q9FGC2_ARATH	DNA helicase-like	GO:0006352:transcription initiation	
BC2M11-309	I	F1 21/66	TCVV008062	Q6Z8E2_ORYSA	Putative relA/spoT homologous protein RSH2	GO:0015969:guanosine tetraphosphate metabolism	
BT4M13-89	I	Fr e F1 21/66		Q4U4H2_9ROSI	Putative squamosa promoter-binding protein (Fragment)	GO:0045449:regulation of transcription	
BC2M13-314	I	F1 21/66		Q9LNJ6_ARATH	Similar to transcription factor TINY	GO:0045449:regulation of transcription	
BT2M14-78	I	Fr e F1 21/66	BUD0000877	Q8VWW7_SOYBN	Putative receptor-like protein kinase RLPK1 [Fragment]	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	signal transduction (GO:0007178)
BT2M11-52	I	Fr e F1 21/66	TCVV000096	Q9FVI7_VITVI	Putative serine/threonine kinase GDBrPK (Fragment).	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	
BT2M33-203	I	F1 21/66	TCVV012164	Q8GUC2_LYCES	Putative phosphatase	GO:0006470:protein amino acid dephosphorylation	
BT2M12-62	I	Fr e F1 21/66	TCVV013233	Q9LSZ4_ARATH	Similarity to SGP1 monomeric G-protein;	GO:0007264:small GTPase mediated signal transduction	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi; II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi; VII=12-24-48 hdi; VIII=48-96 hdi; IX=24-48-96 hdi; X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰, Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶, Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT2M14-78	I	Fr e F1 21/66	BUD0000877	Q8VWW7_SOYBN	Putative receptor-like protein kinase RLPK1 [Fragment]	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	signal transduction (GO:0007178)
BT2M11-52	I	Fr e F1 21/66	TCVV000096	Q9FV17_VITVI	Putative serine/threonine kinase GDBrPK (Fragment)	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	
BC2M31-404	I	Fr e F1 21/66	TCVV000570	Q6TKQ6_VITAE	Putative ankyrin-repeat protein	GO:0042829:defense response to pathogen	response to stimulus (GO:0050896)
BC4M41-462	I	F1 21/66	TCVV002254	Q9LTT7_ARATH	DnaJ protein, putative (At3g13310).	GO:0006986:response to unfolded protein	
BT4M23-173	I	F1 21/66	TCVV004550	Q4F886_ORYSA	DT-related protein	GO:0009414:response to water deprivation	
BT3M41-270	I	Fr e F1 21/66	TCVV007929	CATA1_GOSHI	Catalase isozyme 1 (EC 1.11.1.6).	GO:0006979:response to oxidative stress	
BC2M11-309	I	F1 21/66	TCVV008062	Q6Z8E2_ORYSA	Putative relA/spoT homologous protein RSH2	GO:0042829:defense response to pathogen	
BC1M31-391	I	Fr e F1 21/66	TCVV009285	Q8H286_ANACO	PVR3-like protein (Fragment)	GO:0006869:lipid transport	
BC2M31-401	I	F1 21/66	TCVV020320	Q08707_PETCR	BPF-1 protein	GO:0042829:defense response to pathogen	
BT3M33-232	I	F1 21/66	TCVV023925	Q5J7N0_AGAAM	Putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase	GO:0046503:glycerolipid catabolism	
BC2M13-314	I	F1 21/66		Q9LNJ6_ARATH	Similar to transcription factor TINY	GO:0009723:response to ethylene stimulus	
BC1M23-348	I	F1 21/66	TCVV000265	RCA1_LARTR	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor	GO:0010110:regulation of photosynthesis, dark reaction	photosynthesis (GO:0015979)
BT2M43-256	I	F1 21/66	TCVV001586	Q32291_GOSHI	Chlorophyll A/B binding protein precursor	GO:0009768:photosynthesis light harvesting in photosystem I	
BT4M12-86	I	Fr e F1 21/66	TCVV011946	EID1_ARATH	Phytochrome A-associated F-box protein	GO:0010017:red or far red light signaling pathway	
BT2M31-191	I	F1 21/66	TCVV022582	CB24_TOBAC	Chlorophyll a/b binding protein	GO:0009765:photosynthesis light harvesting	
BC3M13-329	I	Fr e F1 21/66	TCVV022762	O65808_SOYBN	Magnesium chelatase subunit	GO:0015995:chlorophyll biosynthesis	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC3M24-377	I	Fr e F1 21/66	TCVV017476	Q19RP2_9MAGN	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor	GO:0010110:regulation of photosynthesis, dark reaction	photosynthesis (GO:0015979)
BT4M21-162*	I	F1 21/66	TCVV023694	PST2_GOSHI	Photosystem II 5 kDa protein, chloroplast precursor	GO:0009769:photosynthesis light harvesting in photosystem II	
BT1M12-25	I	F1 21/66	LEAF0016402	ATPX_SPIOL	ATP synthase B' chain, chloroplast precursor	GO:0015986:ATP synthesis coupled proton transport	
BT2M31-193a	I	Fr e F1 21/66		Q1A179_9MAGN	Chloroplast chlorophyll a/b binding protein	GO:0009768:photosynthesis light harvesting in photosystem I	
BC2M31-404	I	Fr e F1 21/66	TCVV000570	Q6TKQ6_VITAE	Putative ankyrin-repeat protein	GO:0016567:protein ubiquitination	metabolic process (GO:0008152)
BC4M41-459	I	F1 21/66	TCVV004074	Q7XZQ9_VITVI	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	GO:0006596:polyamine biosynthesis	
BT3M12-12**	I	F1 21/66	TCVV005146	Q6UA14_GOSBA	Fiber protein Fb25	GO:0006457:protein folding	
BT3M11-1	I	Fr e F1 21/66	TCVV000700	Q7XU78_ORYSA	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	GO:0006596:polyamine biosynthesis	
BT2M13-70	I	Fr e F1 21/66	TCVV018413	Q9FZL4_SOYBN	MGDG synthase type A	GO:0030259:lipid glycosylation	
BT3M33-232	I	F1 21/66	TCVV023925	Q5J7N0_AGAAM	Putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase	GO:0046503:glycerolipid catabolism	
BC2M14-324	I	F1 21/66		Q9ZTT3_SOYBN	Subtilisin-like protease C1	GO:0006508:proteolysis	
BT2M24-147	I	Fr e F1 21/66	TCVV001895	Q84QH3_9ROSA	Putative sorbitol transporter	GO:0008643:carbohydrate transport	transport (GO:0006810)
BC1M31-391	I	Fr e F1 21/66	TCVV009285	Q8H286_ANACO	PVR3-like protein (Fragment)	GO:0006869:lipid transport	
BC1M12-298	I	Fr e F1 21/66	TCVV011686	O49931_PEA	Rieske iron-sulfur protein Tic55 precursor	GO:0019750:chloroplast transport	
BT2M42-252	I,VI	Fr e F1 21/66	PDCL0003896	ATPA_TOBAC	ATPase alpha subunit	GO:0015986:ATP synthesis coupled proton transport	
BT1M12-25	I	F1 21/66	LEAF0016402	ATPX_SPIOL	ATP synthase B' chain, chloroplast precursor	GO:0015986:ATP synthesis coupled proton transport	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT4M22-171	I	F1 21/66	TCVV012210	Q9FV14_LOTJA	Putative ammonium transporter AMT1;1.	GO:0015696:ammonium transport	transport (GO:0006810)
BT2M23-139	I	Fr		Q9FM20_ARATH	Nitrate transporter NTL1	GO:0015706:nitrate transport	
BT4M21-156*	I	F1 21/66	TCVV008489	Q8S948_ARATH	Solanesyl diphosphate synthase 1	GO:0008299:isoprenoid biosynthesis	secondary metabolism (GO:0019748)
BC1M13-301	I	Fr e F1 21/66	TCVV004081	Q8S3D7_ARATH	Putative bHLH transcription factor	GO:0009698:phenylpropanoid metabolism	
BT1M12-30	I	F1 21/66	TCVV022357	Q8GSM7_TOBAC	Hydroxycinnamoyl transferase	GO:0009698:phenylpropanoid metabolism	
BT4M13-94	I	Fr e F1 21/66	BRNS0002298	Q9M2W2_ARATH	Hypothetical protein T15C9_60	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT1M24-120	I	F1 21/66	BER0046169	Q9XIP8_ARATH	Hypothetical protein At1g64980	GO:0000004:biological process unknown	
BT3M11-6	I	Fr e F1 21/66	TCVV007385	Q9LXJ1_ARATH	Hypothetical protein AT3g52740	GO:0000004:biological process unknown	
BT4M22-163*	I	Fr e F1 21/66	TCVV010058	Q9LUZ6_ARATH	Hypothetical protein At5g58600/mzn1_50)	GO:0000004:biological process unknown	
BT2M12-58	I	Fr e F1 21/66	TCVV011021	Q9SZ42_ARATH	Hypothetical protein F10M23.370	GO:0000004:biological process unknown	
BT4M22-167*	I	F1 21/66	TCVV017012	Q9LZX2_ARATH	Hypothetical protein T20L15_10	GO:0000004:biological process unknown	
BC2M21-356	I	Fr e F1 21/66	TCVV019654	Q9SMS0_ARATH	Hypothetical protein AT4g09350	GO:0000004:biological process unknown	
BT4M12-85	I	Fr e F1 21/66	TCVV019791	Q9FKQ1_ARATH	AT5g65380	GO:0000004:biological process unknown	
BC1M11-293	I	Fr e F1 21/66	TCVV022190	Q9SGU7_ARATH	F1N19.25 (At1g64680	GO:0000004:biological process unknown	
BT4M12-84	I	Fr e F1 21/66	TCVV023825	Q3E9A0_ARATH	Protein At5g20380	GO:0000004:biological process unknown	
BC3M14-335	I	F1 21/66	TCVV006067	O82167_ARATH	Expressed protein	GO:0000004:biological process unknown	
BT2M23-135	I	Fr e F1 21/66	TCVV009622	Q6Z557_ORYSA	Hypothetical protein OSJNBa0007M04.29	GO:0045449:biological process unknown	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi; II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT2M12-59	I	Fr e F1 21/66	TCVV016068	Q1S1H6_MEDTR	Hypothetical protein	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BC4M24-389	I	Fr e F1 21/66	TCVV017096	Q9G7G6_ARATH	Hypothetical protein F28P5.8	GO:0000004:biological process unknown	
BT2M33-205	I	F1 21/66		Q3E9A5_ARATH	Protein At5g20190	GO:0000004:biological process unknown	
BC3M44-458	I	F1 21/66		Q67Y06_ARATH	MRNA, complete cds, clone: RAFL25-20-E08	GO:0000004:biological process unknown	
BC3M24-378	I	Fr e F1 21/66		Q9C5A5_ARATH	Hypothetical protein At5g08720	GO:0000004:biological process unknown	
BC2M31-403	I	F1 21/66	LEAF0014445			GO:0000004:biological process unknown	
BC4M41-461	I	F1 21/66	LEAF0023019			GO:0000004:biological process unknown	
BT2M32-201	I	Fr e F1 21/66	TCVV005644			GO:0000004:biological process unknown	
BT3M31-218	I	Fr	TCVV009123			GO:0000004:biological process unknown	
BC1M14-305	I	F1 21/66	TCVV010372			GO:0000004:biological process unknown	
BT4M23-178	I	Fr e F1 21/66	TCVV010408			GO:0000004:biological process unknown	
BC1M44-443	I	F1 21/66	TCVV014744			GO:0000004:biological process unknown	
BC1M11-292	I	F1 21/66	TCVV019305			GO:0000004:biological process unknown	
BC1M13-300	I	Fr e F1 21/66	TCVV022348			GO:0000004:biological process unknown	
BC3M31-414	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC2M22-360	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC2M22-362	I	F1 21/66	no hit found				

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC1M32-395	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC3M31-413	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BT1M12-28	I	F1 21/66	no hit found				
BT1M14-40	I	F1 21/66	no hit found				
BT2M31-196	I	F1 21/66	no hit found				
BT4M13-93	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC1M44-444	I	F1 21/66	no hit found				
BC2M13-316	I	F1 21/66	no hit found				
BC2M13-315	II	F1 21/66	TCVV001389	Q8S568_VITVI	Catalase.	GO:0006979:response to oxidative stress	response to stimulus (GO:0050896)
BC2M34-412	II	F1 21/66	TCVV001993	Q6RZW7_VITAE	Putative ethylene response factor 5	GO:0009723:response to ethylene stimulus	
BT4M13-90	II	F1 21/66	TCVV003008	Q8RVF8_TOBAC	Thioredoxin peroxidase	GO:0006979:response to oxidative stress	
BC1M23-347	II	F1 21/66	TCVV004034	O04002_SOLTU	CDSP32 protein	GO:0009414:response to water deprivation	
BT1M23-108	II	F1 21/66	TCVV006188	Q9LMQ9_ARATH	CTV.2	GO:0042829:defense response to pathogen	
BC4M11-338	II	F1 21/66	TCVV012736	Q07446_LYCES	Peroxidase precursor	GO:0006979:response to oxidative stress	
BT3M12-11	II	F1 21/66		Q3ZDK3_PICAB	Early-responsive to dehydration stress protein [Fragment]	GO:0009414:response to water deprivation	
BC2M43-467	II	F1 21/66	TCVV002465	Q5D875_MEDTR	Calcium-dependent protein kinase CDPK1444	GO:0009723:response to ethylene stimulus	
BT2M43-258	II	F1 21/66	TCVV003528	Q60D20_SOLDE	Putative TPR domain containing protein	GO:0006979:response to oxidative stress	
BT2M33-206	II	F1 21/66	TCVV022610	O04892_TOBAC	Cytochrome P450 like_TBP	GO:0009621:response to pathogenic fungi	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT3M41-271	II	F1 21/66	TCVV001456	ERF3_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor 3	GO:0009723:response to ethylene stimulus	response to stimulus (GO:0050896)
BC2M11-310	II	F1 21/66	TCVV024161	Q8H222_9ROSI	Putative RING protein	GO:0042829:defense response to pathogen	
BT3M43-285	II	F1 21/66		O04002_SOLTU	CDSP32 protein	GO:0009414:response to water deprivation	
BC2M34-412	II	F1 21/66	TCVV001993	Q6RZW7_VITAE	Putative ethylene response factor 5	GO:0045449:regulation of transcription	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BC2M11-310	II	F1 21/66	TCVV024161	Q8H222_9ROSI	Putative RING protein	GO:0045449:regulation of transcription	
BC1M33-400	II	F1 21/66	TCVV022424	Q9LRC4_9ROSI	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor	GO:0042549:photosystem II stabilization	photosynthesis (GO:0015979)
BC3M43-453	II	F1 21/66	TCVV023527	Q41424_SOLTU	Chlorophyll a/b binding protein	GO:0009765:photosynthesis light harvesting	
BC3M23-372	II	F1 21/66	TCVV022484	QOZJ16_VITVI	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K	GO:0006118:electron transport	
BC1M24-351*	II	F1 21/66	TCVV023877	Q9XQB1_PHAUU	LHCII type III chlorophyll a/b binding protein	GO:0009768:photosynthesis light harvesting in photosystem I	
BC2M14-325	II	F1 21/66	TCVV000303	VATL1_ARATH	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit 1/3/5	GO:0015986:ATP synthesis coupled proton transport	
BT3M32-228	II	F1 21/66	STM0001460	Q9AV87_ORYSA	60S ribosomal protein L21	GO:0042255:ribosome assembly	metabolic process (GO:0008152)
BT2M44-264	II	F1 21/66	TCVV002170	TKTC_SOLTU	Transketolase, chloroplast precursor	GO:0005996:monosaccharide metabolism	
BC2M43-467	II	F1 21/66	TCVV002465	Q5D875_MEDTR	Calcium-dependent protein kinase CDPK1444	GO:0006468:protein amino acid phosphorylation	
BT2M24-150	II	F1 21/66	TCVV003258	Q43815_PEA	ADP-glucose pyrophosphorylase precursor	GO:0005978:glycogen biosynthesis	
BC3M23-374	II	F1 21/66	TCVV003355	Q6Z702_ORYSA	Putative 3-isopropylmalate dehydratase large subunit	GO:0006520:amino acid metabolism	
BC4M31-424	II	F1 21/66	TCVV006493	Q8LL68_HEVBR	Latex plastidic aldolase-like protein	GO:0006096:glycolysis	
BT3M43-283	II	F1 21/66	TCVV008233	Q8H0S9_ARATH	Putative aminopeptidase (At1g63770)	GO:0030163:protein catabolism	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT3M31-219	II	F1 21/66	TCVV023705	Q3LUM5_GOSHI	Elongation factor 1-alpha 1	GO:0006414:translational elongation	metabolic process (GO:0008152)
BC2M11-310	II	F1 21/66	TCVV024161	Q8H222_9ROSI	Putative RING protein	GO:0031396:regulation of protein ubiquitination	
BT3M34-238	II	F1 21/66		Q8L5C7_PEA	UDP-glucuronosyltransferase	GO:0035251:UDP-glucosyltransferase activity	
BC3M33-422	II	F1 21/66		Q8RW43_LUPAL	TCP1 protein	GO:0006457:protein folding	
BT2M33-206	II	F1 21/66	TCVV022610	O04892_TOBAC	Cytochrome P450 like_TBP	GO:0006118:electron transport	transport (GO:0006810)
BC2M14-325	II	F1 21/66	TCVV000303	VATL1_ARATH	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit 1/3/5	GO:0015986:ATP synthesis coupled proton transport	
BT1M14-39	II	F1 21/66	PDCL0003063	Q5M9Z9_TOBAC	Hypothetical protein orf106b.	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M21-156	II	F1 21/66	TCVV014692	Q8GWD0_ARATH	Hypothetical protein At5g16810/F5E19_150	GO:0000004:biological process unknown	
BC1M33-398	II, III	Fr e F1 21/66	TCVV021127	Q8GY89_ARATH	Hypothetical protein At1g31170/F28K20_12	GO:0000004:biological process unknown	
BT3M43-284	II	Fr e F1 21/66	TCVV023373	Q9SZU7_ARATH	Hypothetical protein AT4g37470	GO:0000004:biological process unknown	
BC4M33-426	II	F1 21/66	FLW0008756			GO:0000004:biological process unknown	
BC3M13-334	II	F1 21/66	TCVV004898			GO:0000004:biological process unknown	
BC2M41-445	II, I	Fr e F1 21/66	TCVV021557			GO:0000004:biological process unknown	
BC2M43-469	II	F1 21/66	TCVV000960			GO:0000004:biological process unknown	
BT2M21-126	II	F1 21/66	no hit found				
BT4M14-95	II	F1 21/66	no hit found				
BT2M14-75	III	F1 21/66		Q5N802_ORYSA	Putative bHLH transcription factor	GO:0045449:regulation of transcription	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi; VII=12-24-48 hdi; VIII=48-96 hdi; IX=24-48-96 hdi; X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰, Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶, Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC3M11-327	III	F1 21/66		O49855_SOYBN	Acid phosphatase	GO:0008610:lipid biosynthesis	metabolic process (GO:0008152)
BT3M44-286	III	F1 21/66	LEAF0025479	Q9MAL6_ARATH	T25K16.18	GO:0006118:electron transport	transport (GO:0006810)
BT2M14-75	III	F1 21/66		Q5N802_ORYSA	Putative bHLH transcription factor	GO:0009810:phenylpropanoid metabolism	secondary metabolism (GO:0019748)
BC1M33-398	II, III	Fr e F1 21/66	TCVV021127	Q8GY89_ARATH	Hypothetical protein At1g31170/F28K20_12	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M41-275	III	F1 21/66	BER0014274			GO:0000004:biological process unknown	
BT2M23-137	III	F1 21/66	BER0059746			GO:0000004:biological process unknown	
BT2M11-50	III	F1 21/66	no hit found				
BC2M34-411	III	F1 21/66	no hit found				
BC4M22-381	IV	Fr	TCVV023661	Q76MV0_TOBAC	H3 histone	GO:0007001:chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota)	cellular process (GO:0009987)
BC3M23-371	IV	F1 21/66	PTL0003593	Q9M6E1_TOBAC	DNA-binding protein3 [Fragment]	GO:0045449:regulation of transcription	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BC4M21-380	IV	F1 21/66	TCVV001975	Q6RH27_LYCES	NAC domain protein	GO:0045449:regulation of transcription	
BT1M13-32	IV	F1 21/66	TCVV008571	Q52QR5_SOYBN	NAC domain protein NAC1	GO:0045449:regulation of transcription	
BC3M43-456	IV	F1 21/66	TCVV022774	Q9M6E0_TOBAC	DNA-binding protein4	GO:0045449:regulation of transcription	
BT2M24-143	IV	F1 21/66	TCVV016870	Q84KA9_CUCME	RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein	GO:0045449:regulation of transcription	
BT3M11-2	IV	F1 21/66		TF2B2_ARATH	Transcription initiation factor IIB-2	GO:0045941:positive regulation of transcription	
BT1M21-101	V,IV	Fr e F1 21/66	PTL0001274	Q9FTF3_ORYSA	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	signal transduction (GO:0007178)

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi; II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT3M12-10	IV	F1 21/66	TCVV024052	Q9ATQ4_WHEAT	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	signal transduction (GO:0007178)
BT1M21-101	V,IV	Fr e F1 21/66	PTL0001274	Q9FTF3_ORYSA	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	response to stimulus (GO:0050896)
BC3M23-371	IV	F1 21/66	PTL0003593	Q9M6E0_TOBAC	DNA-binding protein 4 [Fragment]	GO:0045449:regulation of transcription	
BC4M21-380	IV	F1 21/66	TCVV001975	Q6RH27_LYCES	NAC domain protein	GO:0045449:regulation of transcription	
BT1M13-32	IV	F1 21/66	TCVV008571	Q52QR5_SOYBN	NAC domain protein NAC1	GO:0045449:regulation of transcription	
BC3M43-456	IV	F1 21/66	TCVV022774	Q9M6E0_TOBAC	DNA-binding protein4	GO:0045449:regulation of transcription	
BT2M24-143	IV	F1 21/66	TCVV016870	Q84KA9_CUCME	RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein	GO:0042829:defense response to pathogen	
BT2M11-48	IV	F1 21/66	FLW0010820	Q6V8R2_MALDO	Putative DnaJ protein (Fragment).	GO:0006986:response to unfolded protein	
BT3M12-10	IV	F1 21/66	TCVV024052	Q9ATQ4_WHEAT	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	
BC2M11-311	IV	F1 21/66	TCVV001759	Q7Y0S8_SOLTU	Erg-1	GO:0009719:response to pathogen and endogenous stimulus	
BC4M11-339	IV	F1 21/66	TCVV002206	P93499_PHAVU	DnaJ-like protein	GO:0006986:response to unfolded protein	
BC1M41-433	I, IV	Fr e F1 21/66	TCVV015194	Q1S3D5_METR	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor	GO:0006869:lipid transport	
BC3M24-376	IV	F1 21/66		Q9LJ20_ORYSA	Putative subtilisin-like protein	GO:0042829:defense response to pathogen	
BT1M11-23	IV	F1 21/66		Q52QX4_MANES	Auxin-repressed protein-like protein ARP1	GO:0009733:response to auxin stimulus	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT3M43-282	IV	F1 21/66	BER0038598	Q7XCS3_ORYSA	Gamma-lyase, putative	GO:0006520:amino acid metabolism	metabolic process (GO:0008152)
BT2M24-143	IV	F1 21/66	TCVV016870	Q84KA9_CUCME	RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein	GO:0031396:regulation of protein ubiquitination	
BC2M23-364	IV	F1 21/66	PTL0000177	Q852R1_LOTJA	Serine palmitoyltransferase	GO:0009058:biosynthesis	
BT1M13-33	IV	F1 21/66	TCVV000598	Q9ZTW5_SOLTU	GDP-mannose pyrophosphorylase	GO:0009058:biosynthesis	
BC3M24-376	IV	F1 21/66		Q9LJ20_ORYSA	Putative subtilisin-like protein	GO:0006508:proteolysis	
BC2M24-369	IV	F1 21/66		Q3HVK6_SOLTU	Drm3-like protein	GO:0006306:DNA methylation	
BC1M41-433	I, IV	Fr e F1 21/66	TCVV015194	Q1S3D5_METR	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor	GO:0006869:lipid transport	transport (GO:0006810)
BT1M21-99	V, IV	Fr e F1 21/66	TCVV001671	Q9SJI9_ARATH	Expressed protein	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M11-3	IV	F1 21/66	TCVV003692	Q5WMS9_ORYSA	Hypothetical protein OJ1333_C12.2	GO:0000004:biological process unknown	
BC2M33-408	IV	F1 21/66	TCVV017887	Q7XXR3_ORYSA	Hypothetical protein	GO:0000004:biological process unknown	
BT1M13-34	IV	F1 21/66	TCVV005375			GO:0000004:biological process unknown	
BT4M22-166*	IV	F1 21/66	TCVV006688			GO:0000004:biological process unknown	
BT4M22-164*	IV	F1 21/66	TCVV020242			GO:0000004:biological process unknown	
BC2M23-366	IV	F1 21/66	ROOT0006227			GO:0000004:biological process unknown	
BC2M31-402	IV	F1 21/66	no hit found				
BC1M41-431	IV, VII	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC1M41-432	IV, VII	Fr e F1 21/66	no hit found				

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC1M41-435	IV, VII	Fr e F1 21/66	no hit found				
BT1M23-110	IV	F1 21/66	no hit found				
BT1M13-36	IV	F1 21/66	no hit found				
BC1M11-294	IV	F1 21/66	no hit found				
BT1M21-100	V, IV	Fr e F1 21/66	no hit found				
BT1M23-111	IV	F1 21/66	no hit found				
BT2M21-127	IV	F1 21/66	no hit found				
BT2M32-200	IV	F1 21/66	no hit found				
BT4M21-160*	IV	F1 21/66	no hit found				
BC2M22-361	IV, II	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC1M41-439	IV, VII	Fr e F1 21/66	no hit found				
BT4M22-170*	IV	F1 21/66	no hit found				
BT2M33-204	V	F1 21/66	STM0003791	Q5ME66_PSEMZ	Alpha tubulin 1	GO:0007010:cytoskeleton organization and biogenesis	cellular process (GO:0009987)
BC2M32-405	V	F1 21/66	TCVV009250	Q9M7N8_ARATH	prolin-reach protein 4	GO:0008047:cell wall organization and biogenesis	
BC4M31-423	V	F1 21/66	TCVV023957	FLA10_ARATH	Fasciclin-like arabinogalactan protein 10 precursor	GO:0007154:cell communication	
BT1M21-101	V,IV	Fr e F1 21/66	PTL0001274	Q9FTF3_ORYSA	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	signal transduction (GO:0007178)

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC1M24-350	V	F1 21/66	LEAF0002129	O49675_ARATH	Neoxanthin cleavage enzyme-like protein	GO:0009688:abscisic acid biosynthesis	response to stimulus (GO:0050896)
BT1M21-101	V,IV	Fr e F1 21/66	PTL0001274	Q9FTF3_ORYSA	Putative receptor serine/threonine kinase PR5K	GO:0042829:defense response to pathogen	
BC1M31-392	V	F1 21/66	TCVV019293	Q9M8Y5_ARATH	Putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase	GO:0042829:defense response to pathogen	
BC2M32-405	V	F1 21/66	TCVV009250	Q9M7N8_ARATH	prolin-reach protein 4	GO:0008047:cell wall organization and biogenesis	
BT3M32-225	V	F1 21/66	TCVV023330	ML423_ARATH	MLP-like protein 423	GO:0006952:defense response	
BC3M33-421	V	F1 21/66	LEAF0042142	Q67H34_9LILI	Photosystem II CP43 protein [Fragment]	GO:0009769:photosynthesis light harvesting in photosystem II	photosynthesis (GO:0015979)
BC1M12-296	V	F1 21/66 (12 e24)	LEAF0013738	Q6LDZ6_SOYBN	Photosystem II thylakoid membrane protein	GO:0009765:photosynthesis light harvesting	
BC1M31-392	V	F1 21/66	TCVV019293	Q9M8Y5_ARATH	Putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase	GO:0046503:glycerolipid catabolism	metabolism (GO:0008152)
BC1M24-351**	V	F1 21/66	PDCL0002947	Q8L6A3_VITVI	Putative ribosomal protein L2 [Fragment]	GO:0042255:ribosome assembly	
BC3M13-332	V	F1 21/66	TCVV023401	Q6RJY1_CAPAN	60S ribosomal protein L12	GO:0042255:ribosome assembly	
BC3M43-454	V	F1 21/66	TCVV011966	Q9STI0_ARATH	Flavonoid 3', 5'-hydroxylase-like protein	GO:0009698:phenylpropanoid metabolism	secondary metabolism (GO:0019748)
BT4M22-168*	V	F1 21/66	FLW0029734	FL3H_VITVI	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase (Flavonone-3-hydroxylase)	GO:0009699:phenylpropanoid biosynthesis	
BC1M24-350	V	F1 21/66	LEAF0002129	O49675_ARATH	Neoxanthin cleavage enzyme-like protein	GO:0009688:abscisic acid biosynthesis	
BC1M31-393	V	F1 21/66	TCVV000647	Q8H0Y0_ARATH	Hypothetical protein At4g02890	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT1M21-99	V, IV	Fr e F1 21/66	TCVV001671	Q9SJI9_ARATH	Expressed protein	GO:0000004:biological process unknown	
BT1M24-119	V	F1 21/66	TCVV023218	Q94JT5_ARATH	AT4g35220/F23E12_220	GO:0000004:biological process unknown	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi; II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT4M23-175	V	F1 21/66	TCVV007372	Q84YI9_ORYSA	Hypothetical protein	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT2M31-194	V	F1 21/66	TCVV012983			GO:0000004:biological process unknown	
BT2M44-266	V	Fr	no hit found				
BC4M13-341	V	F1 21/66	no hit found				
BC3M33-420	V	F1 21/66	no hit found				
BC4M22-383	V	F1 21/66	no hit found				
BT1M21-100	V, IV	Fr e F1 21/66	no hit found				
BT4M22-169*	V	F1 21/66	no hit found				
BC1M24-351	V	F1 21/66	no hit found				
BC2M44-449	VI	F1 21/66	TCVV008916	Q9ZS21_SOYBN	Glyoxalase I (EC 4.4.1.5).	GO:0009651:response to salt stress	response to stimulus (GO:0050896)
BC2M22-359	I, VII	Fr e F1 21/66	TCVV014777	SUT33_ARATH	Sulfate transporter AST91 from Arabidopsis thaliana	GO:0008272:sulfate transport	transport (GO:0006810)
BC1M41-437	IV,VII	Fr e F1 21/66	BRNS0006444			GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT4M22-165	VII	F1 21/66	no hit found				
BC1M41-439	IV, VII	Fr e F1 21/66	no hit found				
BT2M24-145	VIII	F1 21/66		Q9FUU9_PHAVU	Leaf senescence-associated receptor-like protein kinase	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	signal transduction (GO:0007165)

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella A Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP INDOTTI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT1M21-102	VIII	F1 21/66	TCVV005096	Q84VH0_MALPU	Glutathione S-transferase Z1	GO:0006979:response to oxidative stress	response to stimulus (GO:0050896)
BT1M13-37	VIII	F1 21/66	TCVV000720	Q84UT6_GENTR	Perchloric acid soluble translation inhibitor protein homolog	GO:0017148:negative regulation of protein biosynthesis	metabolism (GO:0008152)
BT2M24-152	VIII	Fr	TCVV008788	PCNA_TOBAC	Proliferating cell nuclear antigen	GO:0006275:regulation of DNA replication	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BT2M11-47	VIII	F1 21/66	TCVV001817	Q9LEN5_CICAR	Hypothetical protein (Fragment).	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M11-4	VIII	F1 21/66	TCVV005747	Q93ZV0_ARATH	Hypothetical protein At5g18980	GO:0000004:biological process unknown	
BT1M23-113	VIII	F1 21/66	no hit found				
BC3M11-328	IX	F1 21/66	TCVV022972	Q6RZW9_VITAE	Putative WRKY4 transcription factor	GO:0045449:regulation of transcription	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BT2M32-198	IX	F1 21/66	LEAF0027343	ARF_ORYSA	ADP ribosylation factor 002	GO:0007264:small GTPase mediated signal transduction	signal transduction (GO:0007165)
BC3M11-328	IX	F1 21/66	TCVV022972	Q6RZW9_VITAE	Putative WRKY4 transcription factor	GO:0006355:regulation of regulation of transcription, DNA-dependent	response to stimulus (GO:0050896)
BT2M24-151	IX	F1 21/66	CLC0002810	Q9FZ96_ARATH	Purine permease	GO:0006863:purine transport	transport (GO:0006810)
BT3M41-269	IX	F1 21/66	PDCL0001237			GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BC2M24-368*a	IX	F1 21/66	no hit found				
BC2M24-368*b	IX	F1 21/66	no hit found				
BT1M22-105	IX	F1 21/66	no hit found				
BC3M14-337	IX	F1 21/66	no hit found				
BT3M11-5	IX	F1 21/66	no hit found				
BT1M13-38	IX	F1 21/66	no hit found				
BT3M11-5	IX	F1 21/66	no hit found				
BC1M14-303	X	F1 21/66	no hit found				

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC2M43-465	I	Fr e F1 21/66	TCVV002570	Q5F306_LYCES	Copper-containing amine oxidase [Fragment]	GO:0005507:copper ion binding	cellular process (GO:0009987)
BC4M22-382	I	F1 21/66		Q9SD06_ARATH	Strictosidine synthase-like protein (At3g51430)	GO:0009058:biosynthesis	
BT3M12-12*	I	Fr e F1 21/66	TCVV015154	Q8LAC1_ARATH	Putative iojap protein	GO:0016547:RNA editing	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BT3M34-240	I	Fr	TCVV023614	Q9LKG4_ATRHO	Putative DNA binding protein	GO:0003677:DNA binding	
BT4M21-161*	I	F1 21/66	BER0043118	Q9M3V1_FAGSY	Protein phosphatase 2C (PP2C)	GO:0006470:protein amino acid dephosphorylation	signal transduction (GO:0007165)
BT1M24-118	I	Fr e F1 21/66	TCVV021677	Q8GZ99_ARATH	Putative receptor protein kinase-like	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	
BT4M24-179	I	F1 21/66	TCVV024240	Q93X44_LYCES	Protein tyrosine phosphatase	GO:0006470:protein amino acid dephosphorylation	
BC1M31-390	I	Fr e F1 21/66	TCVV008781	GLR37_ARATH	Glutamate receptor 3.7 precursor	GO:0035235:ionotropic glutamate receptor signaling pathway	
BC3M13-331	I	F1 21/66		Q93V91_LYCES	Verticillium wilt disease resistance protein Ve2	GO:0006468:protein amino acid phosphorylation	
BT2M23-141	I	Fr e F1 21/66	LEAF0030711	CKX7_ARATH	Cytokinin dehydrogenase 7	GO:0009736:cytokinin mediated signaling	response to stimulus (GO:0050896)
BT2M12-57	I	F1 21/66	TCVV001311	Q6B4R7_ARATH	GIGANTEA	GO:0010018:far red light signaling pathway	
BT2M22-131	I	F1 21/66	TCVV002490	Q39636_CUCSA	CR9 protein	GO:0009736:cytokinin mediated signaling	
BC2M43-465	I	Fr e F1 21/66	TCVV002570	Q5F306_LYCES	Copper-containing amine oxidase [Fragment]	GO:0009809:lignin biosynthesis	
BT2M23-140	I	Fr e F1 21/66	TCVV011183	CKX7_ARATH	Cytokinin dehydrogenase 7 (Cytokinin oxidase 7)	GO:0009736:cytokinin mediated signaling	
BT1M24-118	I	Fr e F1 21/66	TCVV021677	Q8GZ99_ARATH	Putative receptor protein kinase-like	GO:0042829:defense response to pathogen	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT3M32-226a	I	Fr e F1 21/66		ML423_ARATH	MLP-like protein 423	GO:0006952:defense response	response to stimulus (GO:0050896)
BC3M13-331	I	F1 21/66		Q93V91_LYCES	Verticillium wilt disease resistance protein Ve2	GO:0006468:protein amino acid phosphorylation	
BT2M44-263	I	F1 21/66	BER0040380	Q9SEY5_ARATH	Putative amp-binding protein	GO:0044238:primary metabolism	metabolic process (GO:0008152)
BT4M21-161*	I	F1 21/66	BER0043118	Q9M3V1_FAGSY	Protein phpsphatase 2C (PP2C) (EC 3.1.3.16).	GO:0006470:protein amino acid dephosphorylation	
BT2M24-148	I	Fr e F1 21/66	TCVV004679	Q9LUL0_ARATH	Similarity to diaminopimelate decarboxylase	GO:0009089:lysine biosynthesis via diaminopimelate	
BT3M31-216	I	F1 21/66	TCVV017770	COQ4_ARATH	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog	GO:0006744:ubiquinone biosynthesis	
BC3M32-417	I	F1 21/66	TCVV024191	Q84P52_LYCES	Gamma-aminobutyrate transaminase subunit isozyme 3	GO:0006520:amino acid metabolism	
BT4M24-179	I	F1 21/66	TCVV024240	Q93X44_LYCES	Protein tyrosine phosphatase	GO:0006470:protein amino acid dephosphorylation	
BC1M32-394	I	Fr e F1 21/66	TCVV002012	Q5BLY1_ACTCH	Plastid alpha-amylase	GO:0005975:carbohydrate metabolism	
BT2M44-261	I	F1 21/66		Q7XSA5_ORYSA	OJ000126_13.11 protein	GO:0006412:protein biosynthesis	
BT1M22-104	I	Fr e F1 21/66		Q9MA64_ARATH	Phospholipid/glycerol acyltransferase.	GO:0008415:acyltransferase activity	
BC1M23-345	I	Fr e F1 21/66		SUI11_ARATH	Protein translation factor SUI1 homolog 1	GO:0043037:translation	
BC3M24-375	I	Fr e F1 21/66	LEAF0021828	Q9M4G8_VITVI	Putative ripening-related P-450 enzyme	GO:0006118:electron transport	transport (GO:0006810)
BC3M44-457	I	Fr	TCVV011994	Q56XS7_ARATH	Fe(II) transport protein 3, chloroplast precursor	GO:0006829:zinc ion transport	
BC2M13-317	I	Fr e F1 21/66	TCVV022803	Q9MB47_CITUN	Vacuolar H ⁺ -ATPase A subunit (Fragment	GO:0015986:ATP synthesis coupled proton transport	
BC1M12-295	I	F1 21/66	TCVV008684	Q1SX88_MEDTR	Heavy metal transport/detoxification protein; Harpin-induced 1	GO:0006823:heavy metal ion transport	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC3M32-418	I	Fr e F1 21/66		Q9FS92_SAMSA	Shaker-like potassium channel	GO:0006813:potassium ion transport	transport (GO:0006810)
BT2M23-140	I	Fr e F1 21/66	TCVV011183	CKX7_ARATH	Cytokinin dehydrogenase 7 (Cytokinin oxidase 7)	GO:0009690:cytokinin metabolism	secondary metabolism (GO:0019748)
BC4M23-387	I	Fr e F1 21/66	TCVV014116	Q66PF2_FRAAN	Putative UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase	GO:0009837:ripening, non-climacteric	
BC2M43-465	I	Fr e F1 21/66	TCVV002570	Q5F306_LYCES	Copper-containing amine oxidase [Fragment]	GO:0009809:lignin biosynthesis	
BT2M23-141	I	Fr e F1 21/66	LEAF0030711	CKX7_ARATH	Cytokinin dehydrogenase 7	GO:0009690:cytokinin metabolism	
BC3M41-451	I	Fr e F1 21/66	BER0018490	Q9FKF4_ARATH	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, TAC clone:K11J9	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT4M24-180	I	F1 21/66	TCVV000157	Q93V62_ARATH	Hypothetical protein At4g27450	GO:0000004:biological process unknown	
BC1M23-344	I	F1 21/66	TCVV004774	Q9LVZ5_ARATH	Hypothetical protein At3g15840	GO:0000004:biological process unknown	
BT2M23-136	I	Fr e F1 21/66	TCVV005655	Q9C977_ARATH	Hypothetical protein F5I6.2	GO:0000004:biological process unknown	
BT2M24-146	I	Fr e F1 21/66	TCVV007365	Q5ZF82_PLAMJ	Hypothetical protein	GO:0000004:biological process unknown	
BT3M41-272	I	Fr e F1 21/66	TCVV009589	Q9LHC4_ARATH	Hypothetical protein At3g32930	GO:0000004:biological process unknown	
BT3M24-170	I	Fr e F1 21/66	TCVV019709	Q8GXY8_ARATH	Hypothetical protein At5g23240/MKD15_10	GO:0000004:biological process unknown	
BC2M21-354	I, V	Fr e F1 21/66		Q9C9B9_ARATH	Hypothetical protein F2P9.15	GO:0000004:biological process unknown	
BT3M33-235	I, II	Fr e F1 21/66		Q9FGE4_ARATH	Hypothetical protein At5g24460	GO:0000004:biological process unknown	
BT3M34-241	I	Fr		Q9LK58_ARATH	At3g13150	GO:0000004:biological process unknown	
BT1M33-189	I	Fr e F1 21/66	TCVV008844			GO:0000004:biological process unknown	
BC2M41-445	II, I	Fr e F1 21/66	TCVV021557			GO:0000004:biological process unknown	

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BC2M13-318	I	Fr e F1 21/66	TCVV021561			GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M32-226b	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC2M22-358	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BT3M32-223	I	F1 21/66	no hit found				
BT3M41-274	I	F1 21/66	no hit found				
BT4M24-181	I	F1 21/66	no hit found				
BC2M43-466	I	F1 21/66	no hit found				
BT3M41-278	I	F1 21/66	no hit found				
BT2M32-197	I	Fr e F1 21/66	no hit found				
BC2M24-346	I	F1 21/66	no hit found				
BT3M12-13**	I	F1 21/66	no hit found				
BT3M13-19	I	F1 21/66	no hit found				
BT3M32-224	I	F1 21/66	no hit found				
BT2M42-254	I	F1 21/66	no hit found				
BC2M43-468	I	F1 21/66	no hit found				
BT2M34-213	I	Fr e F1 21/66	no hit found				

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT3M33-236	II	F1 21/66	TCVV007152	Q9FX74_ARATH	Putative glycosyl transferase	GO:0016051:carbohydrate biosynthesis	metabolic process (GO:0008152)
BC1M14-306	II	F1 21/66	TCVV002632	O82258_ARATH	Hypothetical protein.	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M31-215	II	F1 21/66	TCVV015214			GO:0000004:biological process unknown	
BT3M33-235	I, II	Fr e F1 21/66		Q9FGE4_ARATH	Hypothetical protein At5g24460	GO:0000004:biological process unknown	
BT2M44-262	IV	F1 21/66	LEAF0034861	Q8LI69_ORYSA	Putative DNA-directed RNA polymerase lia	GO:0003677:DNA binding	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BC2M12-312	IV	F1 21/66	TCVV022942	CH10_BRANA	Putative 10kd chaperonin (Putative 10kDa chaperonin (CPN10) protein).	GO:0006457:protein folding	metabolic process (GO:0008152)
BC1M14-302	I, IV	Fr e F1 21/66		Q9LNJ3_ARATH	F6F3.10 protein (Chloroplast nucleoid DNA binding protein, putative)	GO:0006508:proteolysis	
BC3M23-370	VIII, IV	Fr e F1 21/66	TCVV015290	Q3ZTF5_TOBAC	Trehalose-phosphate phosphatase	GO:0005991:threolose metabolim	metabolic process (GO:0008152)
BT2M13-72	IV	F1 21/66	TCVV012445	Q9LE54_ARATH	Putative nitrilase-associated protein	GO:0009851:auxin biosynthetic process	
BT2M13-72	IV	F1 21/66	TCVV012445	Q9LE54_ARATH	Putative nitrilase-associated protein	GO:0009851:auxin biosynthetic process	response to stimulus (GO:0050896)
BC4M33-427	IV	Fr	TCVV022091	Q9SJI1_ARATH	Expressed protein (DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein)	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M21-159	IV	Fre F1 21/66	no hit found				

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT2M31-192	V	F1 21/66		Q5Z9P3_ORYSA	Receptor-like protein kinase-like	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	signal transduction (GO:0007165)
BC1M42-441	V	F1 21/66	TCVV006324	HSP12_MEDSA	18.2 kDa class I heat shock protein	GO:0006986:response to unfolded protein	response to stimulus (GO:0050896)
BT2M31-192	V	F1 21/66		Q5Z9P3_ORYSA	Receptor-like protein kinase-like	GO:0007178:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	
BC1M33-399	V	F1 21/66		C82A4_SOYBN	Cytochrome P450 82A4	GO:0009621:response to pathogenic fungi	
BT2M23-138	V	F1 21/66	FLW0027740	Q9LML6_ARATH	F10K1.4 protein	GO:0009058:biosynthesis	metabolic process (GO:0008152)
BC1M33-399	V	F1 21/66		C82A4_SOYBN	Cytochrome P450 82A4	GO:0006118:electron transport	transport (GO:0006810)
BC2M21-354	I, V	Fr e F1 21/66		Q9C9B9_ARATH	Hypothetical protein F2P9.15	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT3M33-233	V	F1 21/66	BER0006059				
BT1M13-35	V	F1 21/66	no hit found				
BT1M44-251	V	F1 21/66	no hit found				
BT2M22-128	VI	Fr e F1 21/66	TCVV008507	Q94EU9_SOLTU	Beta-amylase enzyme (EC 3.2.1.2).	GO:0000272:polysaccharide catabolism	metabolic process (GO:0008152)
BT3M32-222	VII	F1 21/66	TCVV003083	Q6LCY3_PEA	Calmodulin	GO:0050848:regulation of calcium-mediated signaling	signal transduction (GO:0007165)
BT3M32-222	VII	F1 21/66	TCVV003083	Q6LCY3_PEA	Calmodulin	GO:0006979:response to oxidative stress	response to stimulus (GO:0050896)
BC2M23-365	VII	F1 21/66	TCVV019280	Q69D51_VITRI	Beta-1,3-glucanase	GO:0009621:response to pathogenic fungi	
BC2M23-366*	VII	F1 21/66	TCVV002165	Q9SVQ9_ARATH	Short-chain alcohol dehydrogenase like protein	GO:0006066:alcohol metabolism	metabolic process (GO:0008152)

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT1M23-109	VII	F1 21/66	TCVV007620	Q75NU0_TOBAC	Putative ATPase protein	GO:0015991:ATP hydrolysis coupled proton transport	transport (GO:0006810)
BT3M34-239	VIII	F1 21/66	TCVV011669	Q9M4A9_PEA	Beta-1,3 glucanase precursor	GO:0009621:response to pathogenic fungi	response to stimulus (GO:0050896)
BT4M21-154*	VIII	Fr	TCVV001506	Q8VWQ0_GOSHI	Putative serine carboxypeptidase	GO:0030163:protein catabolism	metabolic process (GO:0008152)
BC3M23-370	VIII, IV	Fr e F1 21/66	TCVV015290	Q3ZTF5_TOBAC	Trehalose-phosphate phosphatase	GO:0005991:threolose metabolim	
BC3M32-415	VIII	Fr e F1 21/66	TCVV000495			GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BC3M42-452	VIII	Fr	no hit found				
BT2M12-61	VIII	Fr	no hit found				
BT4M21-155-	IX	F1 21/66		Q9FN03_ARATH	UVB-resistance protein UVR8	GO:0010224:response to UVB	response to stimulus (GO:0050896)
BC4M23-386	IX	F1 21/66	BER0037468	CIP8_ARATH	Ubiquitin ligase protein CIP8 (COP1-interacting protein8)	GO:0016567:protein ubiquitination	metabolic process (GO:0008152)
BT4M14-96	IX	F1 21/66	TCVV002751	Q9FVQ0_ARATH	Flavin-containing monooxygenase	GO:0006118:electron transport	transport (GO:0006810)
BT3M21-155	IX	F1 21/66	TCVV019712	Q8W592_ARATH	putative ribonucleoprotein	GO:0006396:RNA processing	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)
BT4M23-172	IX	F1 21/66	TCVV001275	Q8H185_ARATH	Hypotetical protein (Q8H185)	GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BC2M33-407	IX	F1 21/66	no hit found				
BC4M23-385	IX	F1 21/66	no hit found				

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

Tabella B Identificazione ed annotazione funzionale dei FRAMMENTI di cDNA-AFLP REPRESSI dopo infezione con *P. viticola*

frammento cDNA	gruppo di co-mod. ¹	individuo	EST /TC IASMA ²	Entry name ³	Descrizione	termini GO specifici ⁴	categoria funzionale ⁴ (GO)
BT2M14-76	X	F1 21/66	TCVV023869	Q7XJ89_VITVI	Flavonol synthase (Fragment).	GO:0042829:defense response to pathogen	secondary metabolism (GO:0019748)
BT1M14-41	X	F1 21/66	TCVV001406	Q9M435_QUERO	phase-change related protein precursor	GO:0042829:defense response to pathogen	
BT4M21-157*	X	F1 21/66	TCVV008960	Q42810_SOYBN	GmCK2p	GO:0009651:response to salt stress	
BT3M11-9	X	Fr e F1 21/66	TCVV024015	Q8S8L0_ARATH	Putative prolylcarboxypeptidase i	GO:0030163:protein catabolism	metabolic process (GO:0008152)
BT2M14-76	X	F1 21/66	TCVV023869	Q7XJ89_VITVI	Flavonol synthase (Fragment).	GO:0009698:phenylpropanoid metabolism	secondary metabolism (GO:0019748)
BT2M12-64	X	F1 21/66	TCVV013587			GO:0000004:biological process unknown	biological process unknown (GO:0000004)
BT2M24-144	X	F1 21/66	no hit found				
BT1M31-464	X	F1 21/66	no hit found				
BT3M12-17	X	F1 21/66	no hit found				

1 gruppo di co-modulazione I=12 hdi, II=24 hdi; III=48 hdi; IV=96 hdi; V=12-24 hdi; VI= 24-48 hdi;VII=12-24-48 hdi;VIII=48-96 hdi;IX=24-48-96 hdi;X=12-24-48-96 hdi 2 EST/TC assegnati alle sequenze tramite *blastn* contro database IASMA (Evalue<10⁻¹⁰,Id>90%) 3 Entry name assegnato alle sequenze tramite *blastx* contro database UniProt (Evalue<10⁻⁶,Id>40%) 4 Termini GO dell'ontologia *biological_process* assegnati tramite GoRetriver (Fontana et al., 2006). I dati in tabella sono suddivisi per gruppo di co-modulazione e successivamente per categoria funzionale

9 RINGRAZIAMENTI

Il lavoro di dottorato di ricerca descritto è stato svolto presso il laboratorio di Genomica e Bioinformatica - responsabile il dott. Claudio Moser- nel dipartimento di Biologia e Genetica Molecolare dell'Istituto Agrario di San Michele all'Adige - coordinatore il dott. Riccardo Velasco - in collaborazione con il laboratorio di Biotecnologie Genetiche del Dipartimento Scientifico e Tecnologico della Facoltà di scienze MM.FF.NN (Università degli studi di Verona) - responsabile il prof. Massimo Delledonne.

Un sentito ringraziamento è rivolto a tutte le persone che hanno consentito lo svolgimento di questo lavoro:

il dott. Riccardo Velasco, responsabile del progetto di ricerca e co-tutore di dottorato, per avermi dato la possibilità di svolgere il lavoro e di apprendere numerose metodologie;

il prof. Massimo Delledonne, mio tutore di dottorato, per le numerose occasioni di confronto scientifico e per l'accoglienza durante lo svolgimento delle analisi di espressione genica;

il dott. Claudio Moser, co-tutore di dottorato, per il supporto scientifico nello svolgimento del lavoro e per l'accurata revisione della tesi;

il dott. Fulvio Mattivi e la dott.ssa Urska Vrovsek per il grande supporto nello svolgimento delle analisi degli stilbeni e per le conoscenze fornitemi nel campo dell'analisi HPLC-DAD-MS;

il dott. Marco Stefanini e il dott. Luca Zulini per il grande aiuto nella gestione del materiale vegetale e nell'elaborazione dei dati fenotipici;

la dott.ssa Elisa Zago, il dott. Alberto Ferrarini e il dott. David Glissant, per la disponibilità e l'aiuto durante le analisi di espressione genica.

Un ringraziamento va anche a tutti i colleghi di lavoro (non li nomino per non dimenticare nessuno), presso IASMA e presso l'università di Verona, per i numerosi momenti di confronto durante il lavoro ma anche per i momenti di svago e di amicizia passati insieme.

Un ringraziamento speciale va alla mia mamma per i costanti sostegno ed incoraggiamento, nonostante le vicende della vita che ci hanno messo a dura prova, e al mio papà, che mi ha trasmesso il piacere dell'indagine e della ricerca.

L'ultimo ringraziamento, ma non per questo meno importante, va a mio marito Stefano per aver condiviso quotidianamente e pazientemente le soddisfazioni di questo lavoro, frutto di un continuo mettersi alla prova.