



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Corso di Dottorato di Ricerca in

GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE- XXVIII Ciclo.

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

CARATTERIZZAZIONE DEI MECCANISMI DI RISPOSTA DELLA VITE
AD INFEZIONI DI PERONOSPORA ED OIDIO
MEDIANTE APPROCCI DI MICRODISSEZIONE LASER E SILENZIAMENTO GENICO

BIO/10

Tesi di dottorato di:

Dott. LENZI LUISA

Luisa Lenzi

Coordinatore del corso

Prof. GIORGIO PRANTERA

Firma

Giorgio Pranterà

Tutori

Prof. CARLA CARUSO

Firma

Carla Caruso

Dott. MICHELE PERAZZOLLI
(Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Trento)

Firma

Michele Perazzoli

Data della discussione

5 maggio 2016

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Corso di Dottorato di Ricerca in
GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE- XXVIII Ciclo

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
CARATTERIZZAZIONE DEI MECCANISMI DI RISPOSTA DELLA VITE
AD INFEZIONI DI PERONOSPORA ED OIDIO
MEDIANTE APPROCCI DI MICRODISSEZIONE LASER E SILENZIAMENTO GENICO
BIO/10

Tesi di dottorato di:

Dott. LENZI LUISA

Coordinatore del corso

Prof. GIORGIO PRANTERA

Tutori

Prof. CARLA CARUSO

Dott. MICHELE PERAZZOLLI

(Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Trento)

Data della discussione

5 maggio 2016

Ci si stanca di tutto, tranne di capire.

(Virgilio)

INDICE

INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE	V
RIASSUNTO	IX
ABSTRACT	XI
ABBREVIAZIONI	XIII
1 INTRODUZIONE.....	1
1.1 Caratteristiche generali della vite	1
1.1.1 Classificazione tassonomica della vite	1
1.1.2 Importanza economica della vite	1
1.1.3 Principali patologie della vite	3
1.2 Caratteristiche generali della peronospora della vite.....	3
1.2.1 <i>Plasmopara viticola</i> : agente causale della peronospora della vite	3
1.2.2 Classificazione tassonomica di <i>Plasmopara viticola</i>	3
1.2.3 Ciclo di infezione di <i>Plasmopara viticola</i>	4
1.2.4 Sintomi dell'infezione di <i>Plasmopara viticola</i>	5
1.2.4.1 Sintomi dell'infezione di <i>Plasmopara viticola</i> sulle foglie	5
1.2.4.2 Sintomi dell'infezione di <i>Plasmopara viticola</i> sul grappolo	6
1.2.4.3 Sintomi dell'infezione di <i>Plasmopara viticola</i> sul germoglio ed altri organi verdi.....	7
1.3 Caratteristiche generali dell'oidio della vite	7
1.3.1 <i>Erysiphe necator</i> : agente causale dell'oidio della vite	7
1.3.2 Classificazione tassonomica di <i>Erysiphe necator</i>	7
1.3.3 Ciclo di infezione di <i>Erysiphe necator</i>	8
1.3.4 Sintomi dell'infezione di <i>Erysiphe necator</i>	9
1.3.4.1 Sintomi dell'infezione di <i>Erysiphe necator</i> sulle foglie	9
1.3.4.2 Sintomi dell'infezione di <i>Erysiphe necator</i> sul germoglio	10
1.3.4.3 Sintomi dell'infezione di <i>Erysiphe necator</i> sul grappolo	10
1.4 Meccanismi di difesa delle piante.....	11
1.4.1 Aspetti generali dei meccanismi di difesa	11
1.4.2 Meccanismi di resistenza pre-infezione.....	12
1.4.3 Meccanismi di resistenza indotti	12
1.4.3.1 Resistenza sistemica acquisita	16
1.4.3.2 Resistenza sistemica indotta	16
1.4.4 Meccanismi di resistenza della vite a <i>Plasmopara viticola</i>	17

1.4.5	Meccanismi di resistenza della vite a <i>Erysiphe necator</i>	19
1.5	Metodi di difesa della vite contro peronospora ed oidio.....	20
1.5.1	Metodi di lotta convenzionale contro peronospora ed oidio	20
1.5.2	Sistemi alternativi per il controllo della peronospora e dell'oidio	21
1.5.2.1	Agenti microbici e sostanze naturali per il controllo biologico	21
1.5.2.2	Miglioramento genetico della vite	23
1.5.2.2.1	Geni di resistenza	23
1.5.2.2.2	Geni di suscettibilità.....	25
1.5.2.2.2.1	Geni di suscettibilità MLO	25
1.6	Metodi per lo studio funzionale dei meccanismi di difesa della vite.....	29
1.6.1	Trasformazione genetica ed applicazioni pratiche	29
1.6.1.1	Silenziamento genico mediante <i>RNA interference</i>	30
1.6.2	Meccanismi cellulari e microdissezione laser.....	32
2	SCOPO	35
3	MATERIALI E METODI	37
3.1	Materiale vegetale e condizioni di crescita.....	37
3.2	Trasformazione genetica della vite.....	38
3.2.1	Clonaggio e preparazione dei costrutti.....	38
3.2.2	Trasformazione genetica della vite ed acclimatazione delle piante trasformate	39
3.2.3	Selezione delle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i>	40
3.2.3.1	Estrazione del DNA genomico.....	40
3.2.3.2	Conferma dell'inserimento del costrutto tramite PCR	40
3.3	Inoculo con <i>Plasmopara viticola</i>	41
3.3.1	Isolamento e propagazione dell'inoculo di <i>Plasmopara viticola</i>	41
3.3.2	Inoculo con <i>Plasmopara viticola</i> di foglie di piante di vite cresciute <i>in vitro</i>	41
3.3.3	Inoculo con <i>Plasmopara viticola</i> di piante di vite cresciute in serra	43
3.3.4	Valutazione della severità della peronospora della vite	44
3.3.4.1	Valutazione visiva della severità della peronospora della vite.....	44
3.3.4.2	Quantificazione della sporulazione di <i>Plasmopara viticola</i>	44
3.4	Inoculo con <i>Erysiphe necator</i>.....	45
3.4.1	Preparazione dell'inoculo di <i>Erysiphe necator</i>	45
3.4.2	Inoculo con <i>Erysiphe necator</i> di piante di vite cresciute in serra	45
3.4.3	Valutazione della severità dell'oidio della vite	45
3.4.3.1	Valutazione visiva della severità dell'oidio della vite	45

3.4.3.2	Quantificazione dei conidi di <i>Erysiphe necator</i>	46
3.5	Microdissezione laser di foglie di piante vite cresciute <i>in vitro</i>	46
3.5.1	Fissazione del campione fogliare.....	46
3.5.2	Selezione delle regioni di interesse mediante microdissezione laser.....	47
3.6	Estrazione dell'RNA totale e sintesi del cDNA	47
3.6.1	Estrazione dell'RNA totale da foglie intere fresche di vite e trattamento con DNasi.....	47
3.6.2	Sintesi del cDNA di foglie intere fresche di vite	49
3.6.3	Estrazione dell'RNA totale dai tessuti fogliari fissati e sottoposti a microdissezione.....	49
3.6.4	Amplificazione dell'RNA e sintesi del cDNA dei campioni fogliari fissati e sottoposti a microdissezione	50
3.7	Verifica del cDNA tramite PCR	51
3.8	Elettroforesi in gel di agarosio.....	52
3.9	Analisi dell'espressione genica mediante real time PCR.....	53
3.9.1	Preparazione delle reazioni per l'analisi real time PCR	53
3.9.2	Analisi dei dati di real time PCR	54
3.10	Analisi istologica	56
3.10.1	Analisi istologica delle foglie inoculate con <i>Plasmopara viticola</i>	56
3.10.2	Analisi istologica delle foglie inoculate con <i>Erysiphe necator</i>	56
3.11	Analisi statistica	57
4	RISULTATI	61
4.1	Ottimizzazione del protocollo di microdissezione laser per lo studio della risposta sito-specifica della vite a peronospora	61
4.1.1	Inoculo con <i>Plasmopara viticola</i> di foglie di piante cresciute <i>in vitro</i>	61
4.1.2	Analisi dell'espressione genica in foglie intere fresche.....	62
4.1.2.1	Estrazione dell'RNA da foglie intere fresche e valutazione della qualità.....	62
4.1.2.2	Valutazione del cDNA ottenuto da foglie intere fresche	63
4.1.2.3	Quantificazione di <i>Plasmopara viticola</i> nelle foglie intere fresche.....	63
4.1.2.4	Analisi dell'espressione genica in foglie intere fresche inoculate con <i>Plasmopara viticola</i>	64
4.1.3	Isolamento degli stomi e delle regioni circostanti mediante microdissezione laser di foglie inoculate con <i>Plasmopara viticola</i>	66
4.1.3.1	Ottimizzazione del protocollo di fissazione di foglie per la microdissezione laser	66
4.1.3.2	Microdissezione ed estrazione dell'RNA da stomi, regioni circostanti e da foglie intere fissate inoculate con <i>Plasmopara viticola</i>	67

4.1.3.3	Valutazione del cDNA ottenuto da foglie intere fissate e dalla microdissezione di stomi e regioni circostanti.....	68
4.1.3.4	Quantificazione di <i>Plasmopara viticola</i> nelle foglie intere fissate, negli stomi e nelle regioni circostanti.....	69
4.1.3.5	Analisi dell'espressione genica negli stomi e nelle regioni circostanti di foglie inoculate con <i>Plasmopara viticola</i>	70
4.2	Caratterizzazione delle piante di vite trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i>.....	72
4.2.1	Selezione delle linee che mostrano silenziamento per i geni <i>MLO</i>	72
4.2.2	Analisi del grado di resistenza a <i>Erysiphe necator</i> delle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i>	73
4.2.3	Analisi della resistenza a <i>Plasmopara viticola</i> delle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i>	76
4.2.4	Analisi dell'espressione dei geni <i>MLO</i> nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i>	76
4.2.5	Caratterizzazione della linea TLB4 trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i>	78
4.2.5.1	Analisi istologica della linea TLB4 e della linea controllo EVB.....	78
4.2.5.2	Analisi dell'espressione di geni legati alla risposta della vite ad oidio nella linea TLB4 e nella linea controllo EVB.....	80
5	DISCUSSIONE.....	83
5.1	La microdissezione laser di foglie di vite rivela una risposta sito-specifica alla peronospora.....	83
5.2	Il silenziamento dei geni <i>MLO</i> riduce la suscettibilità della vite ad oidio.....	86
6	CONCLUSIONI.....	89
7	APPENDICE: PUBBLICAZIONI OTTENUTE.....	91
8	REFERENZE.....	117
	RINGRAZIAMENTI.....	129

INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

Figura 1.1: Produzione media della vite dal 1993 al 2014.	1
Figura 1.2: Percentuale media (dal 1993 al 2014) della produzione di uva a livello mondiale.....	2
Figura 1.3: I primi 5 produttori di uva (da vino e da tavola) a livello mondiale.	2
Figura 1.4: Ciclo di infezione di <i>Plasmopara viticola</i>	4
Figura 1.5: Zoospore nei pressi dello stoma.....	5
Figura 1.6: Sviluppo di <i>Plasmopara viticola</i> all'interno del tessuto fogliare.....	5
Figura 1.7: Sintomi della peronospora sulle foglie.	6
Figura 1.8: Sintomi della peronospora sui grappoli.	7
Figura 1.9: Ciclo di infezione di <i>Erysiphe necator</i>	8
Figura 1.10: Conidio di <i>E. necator</i> germinato con la formazione dell'appressorio (ap) visualizzato mediante colorazione con blu di anilina in microscopia ottica.	9
Figura 1.11: Sintomi dell'oidio sulle foglie.	10
Figura 1.12: Sintomi dell'oidio sul tralcio.	10
Figura 1.13: Sintomi dell'oidio sui grappoli.	11
Figura 1.14: Modello a <i>zig-zag</i> dell'interazione pianta-patogeno.	13
Figura 1.15: Rappresentazione schematica dei meccanismi di percezione, segnalazione e risposta alla base	14
dell'interazione pianta-patogeno.	14
Tabella 1.1: Famiglie conosciute di proteine di difesa correlate alla patogenesi (PR).	15
Figura 1.16: Rappresentazione schematica della resistenza sistemica acquisita (SAR) e della resistenza sistemica indotta (ISR).	17
Figura 1.17: Le otto classi dei geni di resistenza (geni <i>R</i>).....	24
Figura 1.18: Rappresentazione schematica delle proteine MLO.....	26
Figura 1.19: Modello del silenziamento genico in pianta mediante RNAi.	30
Figura 1.20: Struttura del costrutto per RNAi.	32
Figura 1.21: Schema rappresentativo del processo di microdissezione laser.	33
Figura 3.1: Piante di vite <i>cultivar</i> Pinot Noir ENTAV115 cresciute <i>in vitro</i> per 2 mesi.....	37
Figura 3.2: Calli embriogenetici di <i>Vitis vinifera cultivar</i> Brachetto a Grappolo lungo.	37
Tabella 3.1: Primer usati per il clonaggio dei geni <i>MLO</i>	38
Figura 3.3: Vettore pENTR/SD/D-TOPO.....	38
Figura 3.4: Vettore usato (A) per la trasformazione di piante controllo e (B) per il silenziamento dei geni MLO di vite.....	39
Tabella 3.2: Costrutti usati per la trasformazione genetica della vite.....	39
Tabella 3.3: Composizione dei terreni usati per la trasformazione e rigenerazione delle piante.....	40
Tabella 3.4: Miscela per la reazione di PCR.	41
Tabella 3.5: Schema dei cicli di amplificazione.....	41
Figura 3.5: Foglie di vite sterilizzate che mostrano la sporulazione di <i>Plasmopara viticola</i>	42

Figura 3.6: Immagine schematica dell'inoculo con <i>Plasmopara viticola</i> sulle foglie di piante di vite cresciute <i>in vitro</i>	42
Tabella 3.6: Schema riassuntivo del campionamento delle foglie <i>in vitro</i>	43
Figura 3.7: Foglie di vite che mostrano la sporulazione di <i>Plasmopara viticola</i> sulla pagina inferiore.....	44
Figura 3.8: Foglie di vite che mostrano sporulazione di <i>Erysiphe necator</i> sulla pagina superiore.....	45
Figura 3.9: Sequenza del gene <i>Actina</i> con gli esoni evidenziati in grigio, gli introni in bianco e le UTR in giallo. I primer <i>Act_PCR_For</i> e <i>Act_PCR_Rev</i> usati per verificare l'assenza di DNA nel cDNA sono indicati in rosso.	51
Tabella 3.7: Miscela per la reazione di PCR.....	52
Tabella 3.8: Schema dei cicli di amplificazione.	52
Figura 3.10: Esempio di curva di amplificazione nella real time PCR.....	53
Tabella 3.9: Sequenze dei primer dei geni di risposta della vite a <i>Plasmopara viticola</i> per l'analisi dell'espressione mediante real time PCR.	59
Tabella 3.10: Sequenze dei primer dei geni di risposta della vite a <i>Erysiphe necator</i> per l'analisi dell'espressione mediante real time PCR.	60
Figura 4.1: Analisi istologica dello sviluppo di <i>Plasmopara viticola</i> nelle foglie di piante cresciute <i>in vitro</i> ad 1 dpi.	61
Figura 4.2: Infezione di <i>Plasmopara viticola</i> nelle foglie di piante cresciute <i>in vitro</i>	62
Figura 4.3: Corsa elettroforetica in gel di agarosio dell'RNA estratto da foglie di piante cresciute <i>in vitro</i>	62
Figura 4.4: Controllo della qualità del cDNA ottenuto da foglie intere fresche.	63
Figura 4.5: Quantificazione di <i>Plasmopara viticola</i> in foglie intere fresche.....	64
Figura 4.6: Analisi dell'espressione genica nelle foglie intere fresche di piante cresciute <i>in vitro</i>	65
Figura 4.7: Elettroforesi capillare dell'RNA estratto da stomi di foglie fissate.	66
Figura 4.8: Microdissezione laser di stomi e regioni circostanti da foglie di piante cresciute <i>in vitro</i>	67
Figura 4.9: Elettroforesi capillare dell'RNA totale estratto da foglie intere fissate.....	68
Figura 4.10: Controllo della qualità del cDNA ottenuto dalla microdissezione di stomi e regioni circostanti e dalle foglie intere fissate in seguito a microdissezione.....	68
Figura 4.11: Quantificazione di <i>Plasmopara viticola</i> in foglie intere fissate, negli stomi e nelle regioni circostanti.....	69
Figura 4.12: Analisi dell'espressione genica negli stomi, nelle regioni circostanti e nelle foglie intere fissate... 71	71
Tabella 4.1: Numero delle linee di piante trasformate e rigenerate per ciascun costrutto.	72
Figura 4.13: Presenza del transgene nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i> . 73	73
Figura 4.14: Analisi della progressione della malattia (AUDPC) di <i>Erysiphe necator</i> nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i> (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6 e TLB7).	73
Figura 4.15: Severità dei sintomi dell'infezione di <i>Erysiphe necator</i> nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni <i>MLO</i> (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6, TLB7).	74
Figura 4.16: Osservazione macroscopica delle foglie in seguito ad infezione con oidio.	74

Tabella 4.2: Percentuale della riduzione della malattia nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6 e TLB7) calcolata rispetto alla severità della malattia nella linea EVB..... 75

Figura 4.17: Intensità della sporulazione di *Erysiphe necator* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6 e TLB7)..... 75

Figura 4.18: Severità dei sintomi dell'infezione di *Plasmopara viticola* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB3 e TLB4)..... 76

Figura 4.19: Analisi dell'espressione dei geni *MLO* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con i costrutti per i geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6). 77

Tabella 4.3: Livello di espressione relativa percentuale dei geni *MLO* nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6). 78

Figura 4.20: Analisi istologiche dello sviluppo di *Erysiphe necator* nelle foglie della linea controllo (EVB) e della linea trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB4) a 3, 10 e 21 giorni dall'inoculo (dpi) con il patogeno..... 79

Figura 4.21: Formazione della papilla nella linea controllo (EVB) e nella linea trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB4)..... 79

Figura 4.22: Analisi dell'espressione genica nella linea controllo (EVB) e nella linea trasformata per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB4)..... 81

RIASSUNTO

La vite (*Vitis vinifera*) è una delle più importanti colture a livello mondiale, soprattutto in termini economici. La maggior parte delle varietà usate per la produzione di uva da tavola e da vino sono però suscettibili a numerose malattie, tra le quali la peronospora (causata da *Plasmopara viticola*) ed l'oidio (causato da *Erysiphe necator*). Queste malattie sono controllate dall'uso frequente di fungicidi chimici che, oltre ad avere un elevato costo economico per il produttore, hanno effetti nocivi sull'uomo e sull'ambiente e possono causare l'insorgenza di resistenza del patogeno. Per questo motivo vi è un enorme interesse nello sviluppo di alternative eco-compatibili per il controllo di queste due malattie. Ad esempio, l'ottenimento di varietà di vite resistenti ai patogeni rappresenta un'opzione promettente per limitare l'applicazione dei pesticidi chimici in viticoltura. La comprensione approfondita dei meccanismi di difesa della vite a peronospora ed oidio e l'identificazione dei geni chiave della resistenza sono quindi fondamentali per aiutare i programmi di miglioramento genetico finalizzati all'ottenimento di varietà resistenti. Oltre ai geni di resistenza, i geni di suscettibilità sono regolatori chiave dei processi di difesa nelle piante, come i geni *Mildew Locus O (MLO)* noti per essere responsabili della suscettibilità all'oidio in piante erbacee. Le analisi di espressione genica sono state ampiamente impiegate per comprendere i processi di regolazione dell'interazione della vite con la peronospora e l'oidio e per individuare i geni marcatori della resistenza, ma tutti gli studi condotti finora hanno preso in considerazione la foglia intera. Tuttavia, solo poche cellule sono realmente in contatto con il patogeno ai primi stadi di infezione e i cambiamenti trascrizionali altamente localizzati nelle cellule infette possono essere mascherati dalle restanti cellule non infette nelle analisi di organi interi.

L'obiettivo finale di questo progetto di dottorato era quello di identificare i geni chiave ed i processi cellulari coinvolti nei meccanismi di difesa e di suscettibilità della vite contro la peronospora e l'oidio, per in seguito sviluppare metodologie innovative per il controllo di queste malattie, come varietà resistenti ed induttori di resistenza efficaci. Gli obiettivi specifici sono stati: i) la caratterizzazione della risposta della vite nei siti di infezione della peronospora per individuare le regolazioni trascrizionali sito-specifiche attivate negli stomi infetti, nelle regioni circostanti e nella parte distale non infetta dal patogeno; ii) il silenziamento di quattro geni *MLO* della vite (*MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13*), attraverso la metodologia denominata *RNA interference*, per identificare i geni chiave responsabili della suscettibilità all'oidio.

Per la caratterizzazione delle regolazioni trascrizionali sito-specifiche, è stato ottimizzato il protocollo di microdissezione laser per l'isolamento degli stomi e delle regioni circostanti agli stomi da foglie di vite cresciute *in vitro* ed è stata analizzata l'espressione di dieci geni nelle fasi iniziali dell'infezione di *P. viticola*. Il livello di espressione di sette geni di risposta a *P. viticola* è risultato maggiore nelle microdissezioni rispetto alla foglia intera, indicando una regolazione trascrizionale sito-specifica della risposta della vite alla peronospora. La modulazione dei geni era localizzata negli stomi e nelle regioni circostanti suggerendo l'attivazione di segnali cellulari con un'azione a breve distanza nel tessuto infetto. L'elevata sensibilità della microdissezione laser ha inoltre permesso di identificare la modulazione di tre geni che era completamente mascherata nell'analisi della foglia intera.

Per la caratterizzazione dei geni di suscettibilità, tre linee silenziate nell'espressione dei geni *MLO* hanno mostrato una maggiore resistenza ad oidio. L'analisi dell'espressione genica nelle linee resistenti e suscettibili ha dimostrato il ruolo chiave del gene *MLO-7* nei processi responsabili della suscettibilità all'oidio, con un

contributo additivo dei geni *MLO-6* e *MLO-11*. Il livello di espressione di tredici geni di difesa della vite era inferiore nella linea resistente rispetto alla linea controllo, indicando che la ridotta infezione di *E. necator* nella linea resistente non era sufficiente per attivare la risposta della pianta. I tre geni *MLO* identificati in questo lavoro rappresentano quindi nuovi marcatori di resistenza della vite e possono essere utilizzati per la selezione di piante resistenti all'oidio mediante programmi di miglioramento genetico assistito. Il protocollo per la microdissezione laser ottimizzato in questo studio permette inoltre di aumentare la sensibilità di future analisi trascrizionali e di consentire l'identificazione di nuovi geni marcatori della risposta di difesa della vite all'infezione dei patogeni.

ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera*) is one of the most economically important fruit crops worldwide, but many cultivars conventionally used for table grape and wine production are susceptible to two several diseases, such as downy mildew (caused by *Plasmopara viticola*) and powdery mildew (caused by *Erysiphe necator*). These pathogens are controlled by frequent applications of chemical fungicides to avoid significant losses in yield and berry quality. However, the ecological drawbacks of pesticides and the rapid appearance of resistant pathogen strains have sparked crescent interest in sustainable control alternatives. The development of resistant grapevine hybrids represents a promising option to limit the application of chemical pesticides in viticulture. Thus, a better understanding of the mechanisms responsible for the grapevine defense against downy and powdery mildew and the identification of key resistance genes will help breeding programs to develop resistant varieties. In addition to the resistance genes, the susceptibility genes are key regulators of defense processes in plants, such as the *Mildew Locus O (MLO)* genes that are known to be responsible for powdery mildew susceptibility in herbaceous plants. Gene expression profiling has been used extensively to investigate regulation processes of the grapevine interaction with mildews and to identify gene markers of the grapevine resistance. However, all studies to date have involved the use of whole leaves, while only a small fraction of host cells is in contact with the pathogen at the early infection stages. Therefore, highly localized transcriptional changes of infected cells may be masked by the large portion of non-infected cells when analyzing the whole leaf.

The final goal of this PhD project was to develop innovative methods for disease control, such as resistant varieties and efficient resistance inducers, based on a better understanding of the key genes and cellular processes involved in the defense and susceptibility mechanisms of the grapevine against downy and powdery mildew. Specific aims were i) to characterize the grapevine response in the sites of downy mildew infection in order to identify site-specific transcriptional regulations in infected stomata, in surrounding areas and in distal part non-infected by the pathogen, and ii) to silence four grapevine *MLO* genes (*MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11* and *MLO-13*) through RNA interference in order to identify the key genes responsible for powdery mildew susceptibility.

For the characterization of the site-specific transcriptional regulations against downy mildew, a laser microdissection protocol was optimized to collect stomata and surrounding cells from leaves of *in vitro*-grown grapevines at early stages of pathogen infection, and the expression levels of ten genes involved in the grapevine response to downy mildew were investigated by real time PCR. The expression levels of seven *P. viticola*-responsive genes were greater in microdissected cells than in whole leaves, highlighting the site-specific transcriptional regulation of the host response. The gene modulation was restricted to the stomata cells and to the surrounding areas of infected tissues, indicating that short-distance signals are implicated. The high sensitivity of the laser microdissection analysis showed significant modulations of three genes that were completely masked in the whole tissue analysis.

For the characterization of susceptibility genes, three grapevine lines silenced in the expression of *MLO* genes showed an increased resistance against powdery mildew. Expression analyses of resistant and susceptible lines demonstrated the key role of the *MLO-7* gene in the susceptibility of powdery mildew, with an additive contribution of the *MLO-6* and *MLO-11* genes. The expression level of thirteen defense-related genes was lower in resistant than in susceptible lines, highlighting an early *MLO*-dependent reduction of powdery mildew invasion. However, the accumulation of defense-related compounds was comparable in resistance and

susceptible lines, suggesting that further analysis are required to better clarify the complex resistance mechanisms against powdery mildew. The protocol for the laser microdissection analysis optimized in this study could greatly increase the sensitivity of further transcriptomic studies to identify new marker genes of the grapevine defense activated at the sites of infection. Specifically, the three *MLO* genes identified in this project represent novel markers of grapevine resistance and they could be used for marker-assisted selection in breeding programs of powdery mildew-resistant grapevines.

ABBREVIAZIONI

Act	Actina
ASL	Acetolattato sintasi
AUDPC	<i>Area under disease progress curve</i>
bp	paia di basi
CellS	cellulosa sintasi
CHI	calcione isomerasi
cv	<i>cultivar</i>
dpi	<i>day(s) post inoculation</i>
EDS	Enhanced disease susceptibility
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
EF-1α	Fattore di elongazione-1 α
EVB	<i>Empty vector of Brachetto</i>
ET	Etilene
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
GADPH	Glutaraldeide 3-fosfato deidrogenasi
geni R	geni di resistenza
geni S	geni di suscettibilità
GLP	Germin-like protein
HR	Risposta ipersensibile
ISR	Resistenza sistemica indotta
JA	Acido jasmonico
LOX	lipossigenasi
LSU	Large ribosomal subunit
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MLO	Mildew Locus O
NPF	Trasportatore NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻
OSM	osmotina
PAD	Phytoalexin deficient
PR	proteine di patogenesi
PTGS	<i>Post transcriptional gene silencing</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	rivoluzioni per minuto
SA	Acido salicilico
SAR	Resistenza sistemica acquisita
TLB	<i>Transgenic Line of Brachetto</i>
TLP	Thaumatolike protein
v/v	volume su volume
w/v	peso su volume

1 INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche generali della vite

1.1.1 Classificazione tassonomica della vite

La vite (*Vitis vinifera* Linneo) è una delle più importanti colture a livello mondiale soprattutto in termini economici. L'uva può essere infatti usata come frutta fresca (uva da tavola), per la produzione di succhi o di uva essiccata, oltre che per la produzione di beni con un elevato valore aggiunto come il vino e altre bevande alcoliche. La vite riveste anche un'importanza storica e culturale in quanto è sempre stata coltivata sin dai tempi più antichi.

Secondo la classificazione botanica, la vite appartiene al regno delle *Viridiplantae*, ordine *Vitales*, famiglia *Vitaceae*, genere *Vitis*. Il genere *Vitis* è suddiviso in due sottogeneri, ossia *Muscadinia* ed *Euvtis*, i cui membri hanno scarsa infertilità. I membri del sottogenere *Muscadinia* hanno infatti un numero cromosomico pari a 20, mentre quelli appartenenti al sottogenere *Eurovitis* pari a 19. Al primo gruppo appartengono solo tre specie di origine americana (*V. munsoniana*, *V. rotundifolia* e *V. popenoei*); il secondo comprende 62 specie di origine americana, eurasiatica tutte interfertili tra loro, raggruppate in base all'origine geografica e alla morfologia. Le viti americane *V. rupestris*, *V. riparia* e *V. berlandieri* sono usate principalmente come portainnesti resistenti alla fillossera (*Daktulosphaira vitifoliae*), e portano inoltre caratteri di resistenza a peronospora ed oidio. La maggior parte delle varietà coltivate (*cultivar*), soprattutto per la produzione di vino, sono invece classificate come *Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera* (o *sativa*).

1.1.2 Importanza economica della vite

La coltivazione della vite copre un'area di 7,6 milioni di ettari con una produzione globale di 77 milioni di tonnellate nel 2014 (FAOSTAT 2014) (Figura 1.1).

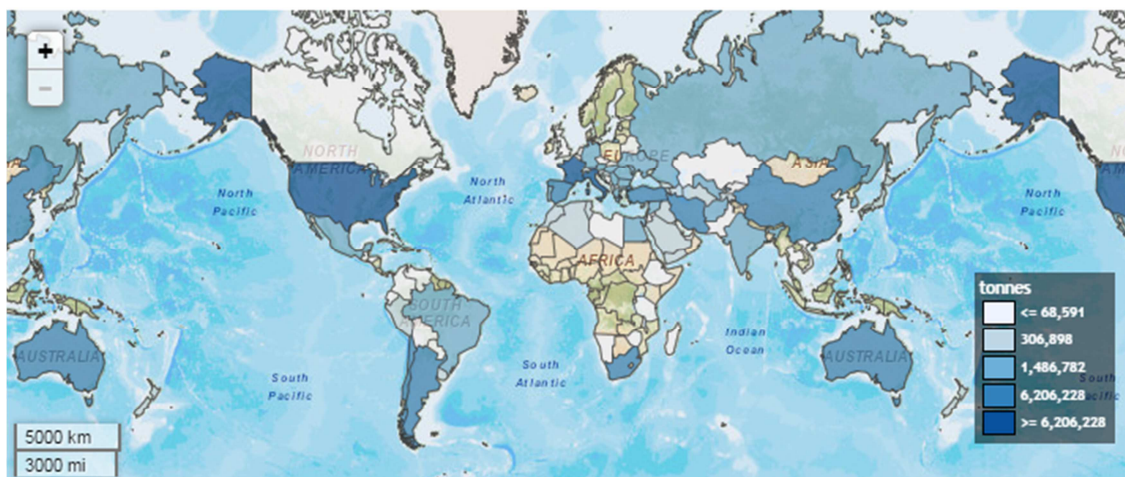


Figura 1.1: Produzione media della vite dal 1993 al 2014.
Sono riportati i dati dal sito www.faostat.fao.org.

L'Europa è il maggior produttore di uva a livello mondiale (Figura 1.2). Specialmente i paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo sono i maggiori produttori, grazie alle condizioni climatiche favorevoli che garantiscono la produzione di uve da tavola e da vino di ottima qualità.

L'Italia è uno tra i maggiori produttori di vino e di uva da tavola a livello mondiale (Figura 1.3). La viticoltura risulta la prima attività agricola e la coltivazione della vite è stata pari a 8,3 milioni di tonnellate nel 2014. Dal sesto censimento ISTAT sullo stato dell'agricoltura è infatti emerso che il 5,2% (circa 600-700 ettari) della superficie totale è destinato alla coltivazione della vite (ISTAT 2010).

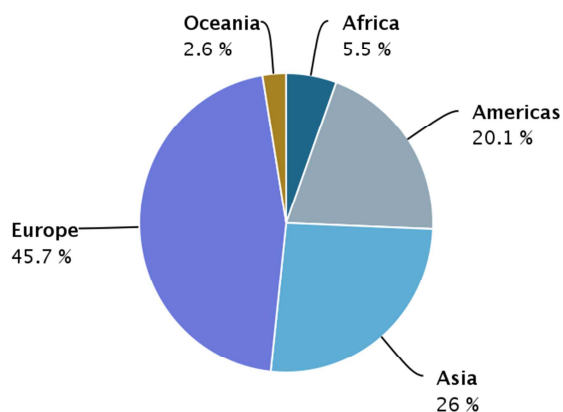


Figura 1.2: Percentuale media (dal 1993 al 2014) della produzione di uva a livello mondiale. Sono riportati i dati del sito www.faostat.fao.org.

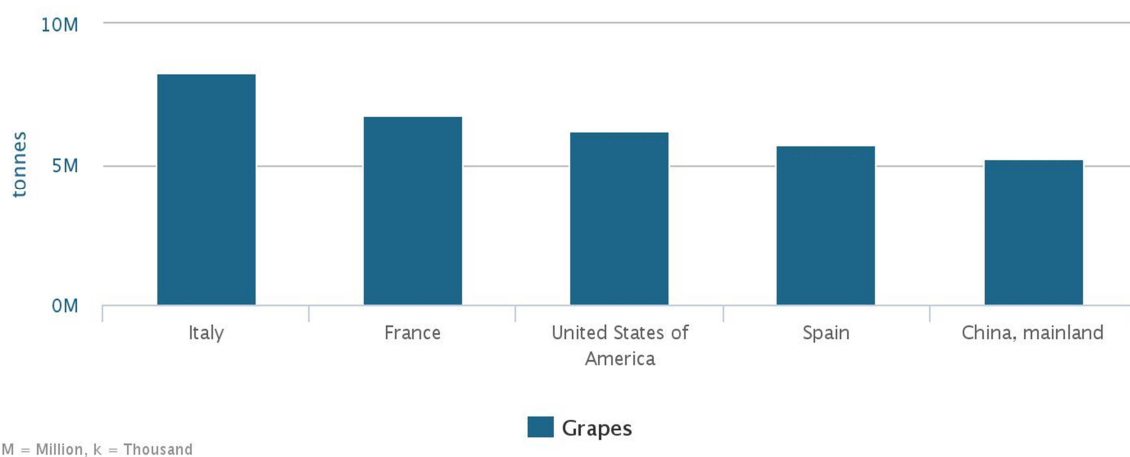


Figura 1.3: I primi 5 produttori di uva (da vino e da tavola) a livello mondiale. Nel 2014 l'Italia ha coperto il 45% della produzione mondiale di uva. Sono riportati i dati dal sito www.faostat.fao.org.

1.1.3 Principali patologie della vite

Come molte altre specie vegetali coltivate, la vite è suscettibile a numerose avversità biotiche e abiotiche che spesso compromettono sia la produttività dei vigneti sia la qualità delle uve prodotte, causando ingenti danni economici non solo al coltivatore ma anche a tutto il settore della trasformazione. Il controllo delle malattie è comunemente basato sull'intensa applicazione di prodotti chimici, spesso dannosi per l'uomo e per l'ambiente. Negli ultimi anni però vi è una forte pressione sociale e legislativa che impone una graduale riduzione dell'uso dei prodotti chimici in agricoltura (regolamentazione europea 1107/2009).

Vitis vinifera è suscettibile a numerosi patogeni, in particolare i funghi ed gli oomiceti rappresentano un importante classe di patogeni che compromettono qualità e resa della vite (Delaunoy et al. 2014). Tra questi, l'oomicete biotrofo *Plasmopara viticola* (agente causale della peronospora della vite), l'ascomicete biotrofo *Erysiphe necator* (agente causale dell'oidio della vite) e il deuteromicete necrotrofo *Botrytis cinerea* (agente causale del marciume grigio) sono i tre principali agenti patogeni (Delaunoy et al. 2014). Inoltre, i funghi associati alle malattie del legno della vite (ad esempio *Phomopsis viticola*, *Botryosphaeria dothidea* e *Eutypa lata*) sono responsabili di altre importanti malattie della vite (Ferreira et al. 2004). Per la sua importanza storica, sociale ed economica la vite è una delle specie di interesse agrario maggiormente studiate per la prevenzione e la protezione dalle avversità naturali ed è quindi una specie arborea "modello" per lo studio dei meccanismi di interazione pianta-patogeno (Delaunoy et al. 2014).

1.2 Caratteristiche generali della peronospora della vite

1.2.1 *Plasmopara viticola*: agente causale della peronospora della vite

La peronospora causata da *P. viticola* (Berkeley e Curtis) Barlesse e De Toni rappresenta una delle più gravi malattie della vite, in particolare in climi miti e umidi (Gessler et al. 2011). La maggior parte delle *cultivar* di vite usate per la produzione di uva da tavola o da vino sono suscettibili alla peronospora, e le infezioni di questa malattia causano ingenti danni economici a causa della riduzione della produzione sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo. *P. viticola* colpisce foglie, germogli, infiorescenze ed infruttescenze ed è controllata dall'intensa applicazione di prodotti chimici (Gessler et al. 2011).

1.2.2 Classificazione tassonomica di *Plasmopara viticola*

L'oomicete *P. viticola* è originario dell'America del Nord e venne introdotto in Europa nella seconda metà del XIX secolo, in seguito all'importazione di viti americane utilizzate per la ricostruzione dei vitigni europei distrutti dalla fillossera. In particolare, la peronospora fece la sua comparsa per la prima volta in Francia nel 1878 e l'anno successivo fu identificata per la prima volta in Italia. La malattia si diffuse rapidamente in tutta Europa, in seguito in Turchia e nelle zone viticole della Russia meridionale e successivamente in Africa.

La classificazione del patogeno iniziò nel 1834, Schweinitz lo inserì erroneamente tra i microrganismi appartenenti alla specie *Botrytis cana* e successivamente Berkeley e Curtis lo descrissero come una nuova specie, *Botrytis viticola*. Nel 1848, con un attento studio del fungo, De Bary descrisse accuratamente la forma asessuata e sessuata e lo riferì al genere *Peronospora*, classificandolo come *Peronospora viticola*. In seguito, nel 1886, Shroder suddivise il genere *Peronospora* spp. in *Peronospora* spp. e *Plasmopara* spp., ma il riferimento

sistemico a *Plasmopara* avvenne per opera di Barlesse in collaborazione con De Toni nel 1888. La separazione degli oomiceti dal regno dei funghi è invece più recente. Gli oomiceti si differenziano dai funghi per molti aspetti, tra i quali la parete cellulare composta di cellulosa e non di chitina, nuclei diploidi e non aploidi (come nei funghi ascomiceti) o dicariotici (come nei funghi basidiomiceti) e per la presenza di zoospore biflagellate.

1.2.3 Ciclo di infezione di *Plasmopara viticola*

P. viticola è un patogeno obbligato, le ife si sviluppano negli spazi intercellulari dell'ospite e assorbono nutrienti dalle cellule vive dell'ospite tramite gli austori. Gli austori sono strutture organizzate che si insinuano all'interno delle cellule della pianta ospite e permettono l'assimilazione delle sostanze nutritive per il patogeno e lo scambio di altri metaboliti (Jones and Dangl 2006). In Figura 1.4 viene riportato il ciclo biologico di infezione di *P. viticola*.

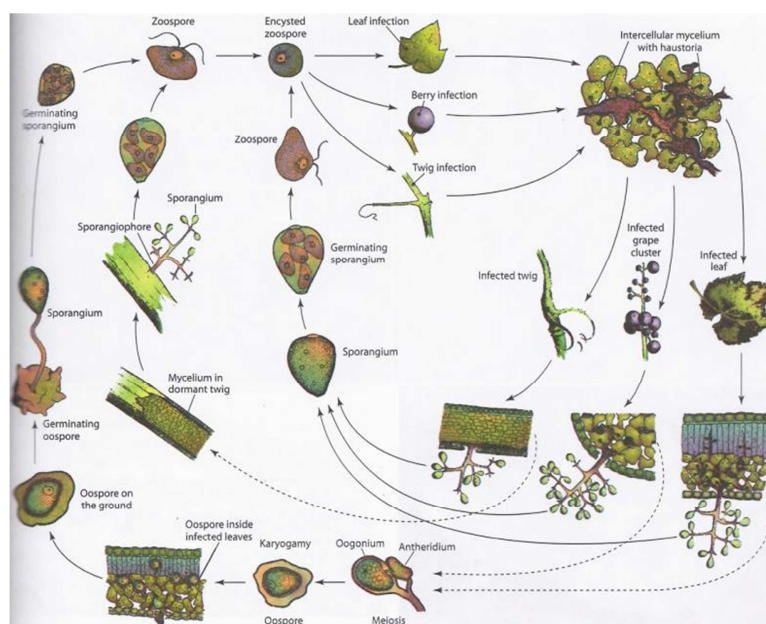


Figura 1.4: Ciclo di infezione di *Plasmopara viticola*.
(Agrios 2005)

Il patogeno sverna per mezzo di oospore presenti in tessuti fogliari in decomposizione. Le oospore si formano per riproduzione sessuata durante tutto il periodo vegetativo, e, in particolare, dal momento in cui i tessuti colpiti riducono la loro attività fisiologica o in coincidenza delle precipitazioni annuali. Nei tessuti vegetali si ha la formazione di una cellula femminile (oogonio) dall'estremità di un filamento di micelio e di una cellula maschile (anteridio) che si differenzia da una seconda ifa. In seguito a fecondazione si genera l'oospora che subisce un processo di maturazione, l'oospora matura è una struttura di conservazione che può rimanere vitale fino a 10 anni (Gessler et al. 2011). In primavera ed inizio estate (Aprile-Luglio), le oospore mature germinano in condizioni microclimatiche favorevoli, producendo un macrosporangio in grado di rilasciare zoospore che danno origine all'infezione primaria. Alla prima pioggia dopo la germinazione, gli sporangi e le zoospore sono trasportati sulla vegetazione dagli schizzi d'acqua e dai movimenti dell'aria. Le zoospore flagellate, al contatto con la superficie fogliare bagnata, si muovono verso le aperture stomatiche, sulla pagina inferiore della foglia, sugli organi verdi e sugli acini negli stadi iniziali di accrescimento.

È stato dimostrato che le zoospore sono guidate verso gli stomi da fattori rilasciati dagli stomi aperti della pianta (Kiefer et al. 2002, Díez-Navajas et al. 2008), ma la natura di questi fattori dell'ospite non è ancora nota. Una volta prossime allo stoma, le zoospore perdono i flagelli (zoospore incistate) ed emettono un tubetto germinativo (Figura 1.5) che raggiunge la cavità sottostomatica.

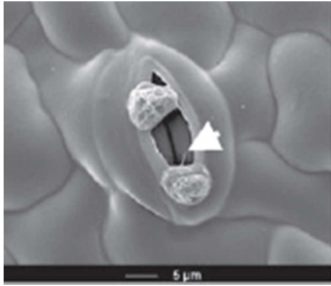


Figura 1.5: Zoospore nei pressi dello stoma.

La freccia indica la formazione del tubetto germinativo (Jürges et al. 2009).

Il patogeno forma delle vescicole nella cavità sottostomatica, da questa vescicola si origina l'ifa primaria che cresce tra le cellule parenchimatiche, formando l'austorio primario, in seguito le ife si accrescono e invadono il tessuto dell'ospite (Unger et al. 2007) (Figura 1.6).

Il calcolo delle condizioni a rischio per le infezioni primarie è basato sulla regola dei "tre dieci" secondo la quale sono necessari una temperatura superiore di 10°C, una pioggia superiore a 10 millimetri e foglie di almeno 6-8 cm² che corrispondono ad un germoglio di 10 cm di sviluppo (Baldacci 1947, Baldacci and Refatti 1956). Il ciclo secondario (o agamico) è caratterizzato dalla produzione di rami sporangiofori e sporangi, visibili sotto forma di muffa bianca sulla pagina inferiore delle foglie e sui tessuti verdi della pianta. Le condizioni ideali per la sporulazione sono una temperatura superiore a 12°C, con un ottimo attorno a 18-20°C, e un'umidità relativa molto elevata (>93%). Gli sporangi possono essere diffusi grazie a gocce d'acqua e, come nel caso delle infezioni primarie, rilasciare quindi zoospore che nuotano sullo strato d'acqua che ricopre la pagina inferiore delle foglie fino a raggiungere gli stomi.

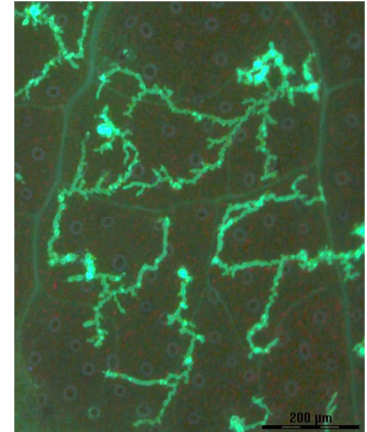


Figura 1.6: Sviluppo di *Plasmopara viticola* all'interno del tessuto fogliare.

Le ife di *P. viticola* all'interno del mesofillo sono state colorate con blu di anilina e visualizzate in microscopia fluorescente.

1.2.4 Sintomi dell'infezione di *Plasmopara viticola*

I danni causati dalle infezioni di *P. viticola* sono molteplici e riguardano vari organi. *P. viticola* infetta tutti gli organi erbacei della vite: foglie, germogli, infiorescenze, infruttescenze e grappoli. Gli attacchi ai grappoli possono portare ad una consistente perdita di produzione, mentre i danni alle foglie determinano una riduzione dell'attività fotosintetica e, quindi, dell'accumulo di zuccheri e aromi (Pertot et al. 2005). Inoltre, la diminuzione dell'attività fotosintetica si ripercuote anche sulle riserve negli organi legnosi e nelle radici (Pertot et al. 2005). Le infezioni più gravi possono compromettere l'intero metabolismo della pianta e mettere a rischio la ripresa vegetativa nell'anno successivo.

1.2.4.1 Sintomi dell'infezione di *Plasmopara viticola* sulle foglie

Il sintomo caratteristico dell'infezione di *P. viticola* sulle foglie di vite è la presenza di "macchie d'olio", cioè chiazze traslucide che compaiono dopo un periodo di incubazione di 4-18 giorni, a seconda della temperatura ambientale (Figura 1.7 A). Ai limiti delle macchie d'olio si formano delle marginature brunastre, poi i tessuti imbruniscono, dissecano e le foglie infine cadono. Il periodo di incubazione della malattia può variare da un minimo di 4-5 giorni ad un massimo di 15-18 giorni in funzione della temperatura. Al termine del periodo di incubazione, con un'umidità ambientale elevata, compaiono i rami conidiofori che formano la tipica muffa

biancastra facilmente riconoscibile sulla pagina inferiore delle foglie in corrispondenza delle macchie d'olio (Figura 1.7 B). L'età della foglia gioca un ruolo fondamentale sull'infezione. Le foglie giovani, con un diametro inferiore a 2 cm, presentano aperture stomatiche non differenziate e non sono soggette all'infezione (Pertot et al. 2005). Le foglie con età superiore ai 50-60 giorni diventano meno suscettibili agli attacchi del patogeno, principalmente per effetto di una resistenza strutturale dei tessuti e un maggior contenuto di polifenoli ad azione antimicrobica (resistenza ontogenica). La diffusione delle ife nel tessuto fogliare vecchio viene limitata dall'aumentare della consistenza delle nervature, le infezioni tardive su foglie adulte si manifestano quindi con numerose piccole macchie delimitate dalle nervature (peronospora a mosaico) (Pertot et al. 2005).

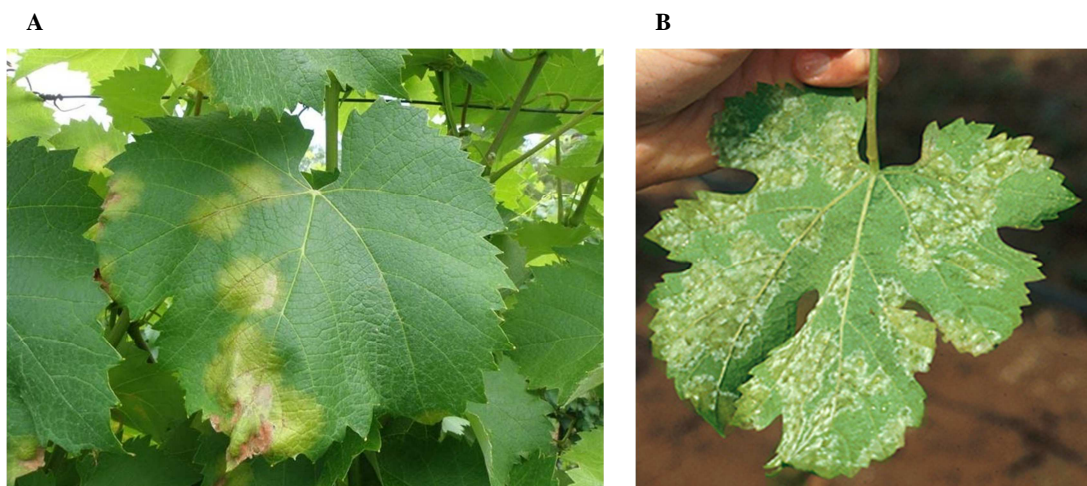


Figura 1.7: Sintomi della peronospora sulle foglie.

(A) Macchie d'olio sulla pagina superiore della foglia. (B) Sporulazione bianca sulla pagina inferiore della foglia (Gessler et al. 2011).

1.2.4.2 Sintomi dell'infezione di *Plasmopara viticola* sul grappolo

Gli attacchi di peronospora sui grappoli sono estremamente pericolosi per il loro impatto sulla produzione. Le infiorescenze sono molto sensibili ai patogeni a partire dalla loro differenziazione fino alla fioritura. I sintomi sulle infiorescenze si manifestano con una muffa che ricopre i fiori, similmente a quanto avviene sulle foglie. Quando l'attacco è precoce l'intera infiorescenza può necrotizzare o deformarsi ed assumere una tipica "forma ad S", le porzioni colpite possono presentare allessature ed imbrunimenti.

Sui grappoli giovani, la via di penetrazione del patogeno è rappresentata dagli stomi degli acini, dei raspi e dei racimoli (Pertot et al. 2005). L'infezione del giovane grappolo determina allessamento e ripiegamento ad "S" del rachide. In seguito compare una muffa bianco-grigiastra emessa dagli stomi e dalle fessurazione della buccia chiamata marciume grigio (Figura 1.8 A). Quando gli acini raggiungono un diametro di 2 mm, gli stomi atrofizzano e gli acini diventano meno sensibili e non possono più essere colpiti direttamente. Tuttavia, il patogeno può penetrare attraverso gli stomi dei pedicelli e propagarsi anche all'interno degli acini. In questo caso, in assenza di stomi, la peronospora non può manifestarsi emettendo la tipica muffa bianca, gli acini colpiti si colorano di blu-marrone, induriscono e tendono a cadere (marciume bruno o peronospora larvata) (Pertot et al. 2005) (Figura 1.8 B).

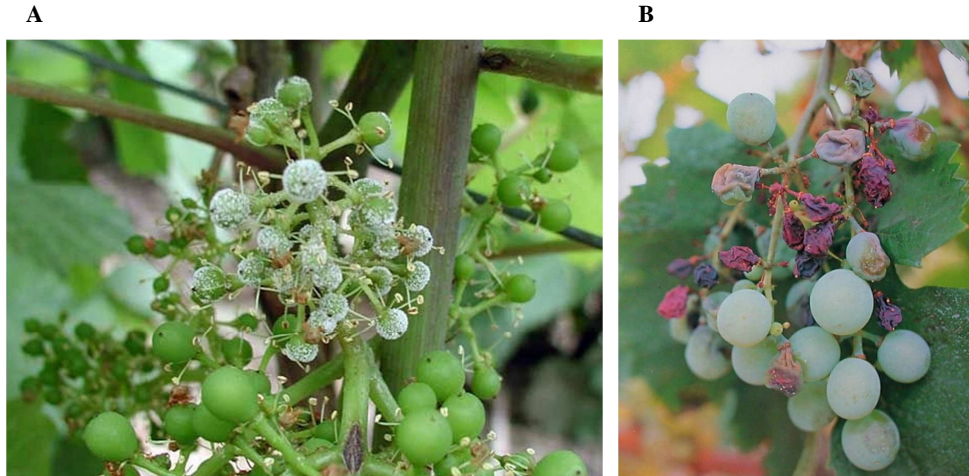


Figura 1.8: Sintomi della peronospora sui grappoli.
(A) marciume grigio, (B) marciume bruno (Pertot et al. 2005).

1.2.4.3 Sintomi dell'infezione di *Plasmopara viticola* sul germoglio ed altri organi verdi

Tutti gli organi verdi con stomi attivi e differenziati possono essere colpiti. I germogli erbacei possono quindi essere attaccati soprattutto vicino ai nodi, in maniera diretta attraverso gli stomi o in maniera indiretta, attraverso infezioni dei piccioli fogliari. Le zone infette mostrano allessamenti e imbrunimenti e, in casi di infezione precoce, si osserva un portamento contorto del tralcio e del viticcio, dovuto a fenomeni di ipertrofia cellulare. Con l'avanzare del processo di lignificazione diminuisce la ricettività dei tralci e i sintomi sono caratterizzati da lesioni dei tessuti corticali e da piccoli cancri (Pertot et al. 2005).

1.3 Caratteristiche generali dell'oidio della vite

1.3.1 *Erysiphe necator*: agente causale dell'oidio della vite

L'oidio, conosciuto anche con il nome di “mal bianco” è causato dal fungo ascomicete *Erysiphe necator* Schwein nella sua forma gamica (precedentemente noto con il nome di *Uncinula necator* [Schwein] Burill) e di *Oidium tuckeri* Berkeley in forma agamica. L'oidio, può avere un impatto disastroso sulla produzione viticola, sia in termini quantitativi che qualitativi, a causa delle caratteristiche biologiche del fungo che lo rendono poco dipendente dalle condizioni climatiche e capace di moltiplicarsi e diffondersi velocemente, rendendo particolarmente impegnativa la difesa contro questa malattia (Angeli and Pertot 2007).

1.3.2 Classificazione tassonomica di *Erysiphe necator*

Come nel caso della peronospora, l'agente causale *Erysiphe necator* venne introdotto in Europa dall'America del Nord e la malattia dell'oidio fu segnalata in Francia nel 1847 e da allora si diffuse rapidamente nelle varie regioni viticole europee, al punto che negli anni 1850-51 era presente in tutto il bacino del Mediterraneo, dove determinò ingenti danni alla produzione. L'agente causale venne descritto per la prima volta nel 1834 da Schweinitz definendolo come *E. necator*. Più tardi, nel 1847, Berkeley descrisse le principali caratteristiche del patogeno, denominando la forma agamica del fungo come *Oidium tuckeri*. Esistono diversi sinonimi, tra cui

Uncinula necator Schweinitz Burrill (1892) ancora comunemente usato. Il fungo è un ascomicete, produce corpi fruttiferi contenenti gli aschi con le ascospore nella fase gamica o ascofora, mentre forma i conidi nella forma agamica o conidiofora.

1.3.3 Ciclo di infezione di *Erysiphe necator*

L'oidio della vite è un ectoparassita obbligato, cioè sviluppa il micelio all'esterno dei tessuti colpiti entro i quali inserisce gli austori per assorbire le sostanze nutritive della cellula vegetale e non può sopravvivere in assenza dell'ospite. Il fungo può svernare in due forme: asessuata, cioè come micelio nelle gemme infette, oppure sessuata, attraverso i corpi fruttiferi, i cleistoteci (Figura 1.9).

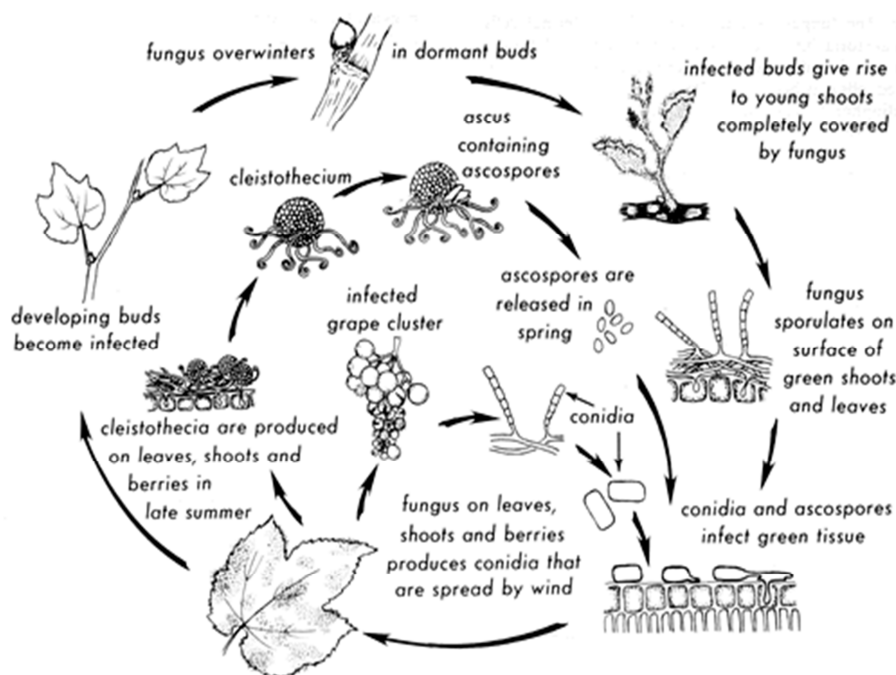


Figura 1.9: Ciclo di infezione di *Erysiphe necator*.
(<http://www.metos.at/>)

In condizioni ambientali favorevoli, il micelio svernante origina nuovi conidi, responsabili delle infezioni secondarie, mentre i cleistoteci originano le ascospore che sono responsabili delle infezioni primarie. I cleistoteci sono corpuscoli sferici con diametro di circa 0,1 mm. Negli stadi giovanili sono trasparenti e successivamente diventano gialli, marroni e, quando sono completamente maturi, neri. Ciascun cleistotecio contiene 6 aschi, ciascuno dei quali produce 4-8 ascospore (Angeli and Pertot 2007). I cleistoteci cominciano a formarsi in massiccia quantità a partire dal mese di agosto nei tessuti infetti, in particolare su foglie e tralci, e vengono trasportati dal vento e dalle piogge autunnali all'interno delle screpolature della corteccia dove si conservano fino alla primavera successiva. Quando la temperatura raggiunge i 10°C, in seguito ad una leggera pioggia (2-5 mm) e con 15-20 ore di bagnatura, i cleistoteci si aprono e liberano le ascospore.

Se le condizioni rimangono favorevoli le ascospore germinano producendo un tubetto germinativo che termina in un appressorio trilobato che le ancora all'epidermide (Figura 1.10). Dall'appressorio si origina uno stiletto di penetrazione che determina la formazione di un poro di penetrazione (0,5 μm) vincendo le barriere della cuticola e della parete cellulare della pianta. Al di sotto dell'appressorio si sviluppa un austorio lobato (Gadoury et al. 2012). Successivamente dalla spora si origina, generalmente al polo opposto al tubo germinativo, un'ifa primaria che si allunga, emette il primo appressorio ifale e poi ramifica. Il micelio cresce sull'epidermide fogliare, le ife producono appressori che assicurano l'ancoraggio ad intervalli regolari e una penetrazione efficace nell'ospite. Dopo un periodo di incubazione variabile tra 7-8 e 10-12 giorni, a seconda della temperatura, l'infezione diventa visibile sotto forma del tipico micelio biancastro dal quale si differenziano, perpendicolarmente alla superficie fogliare, rami conidiofori multisettati che portano catene di conidi di forma ovoidale. Le infezioni primarie si esauriscono nella prima parte della stagione. I conidi sono invece responsabili delle infezioni secondarie che sono favorite dal verificarsi di specifiche condizioni climatiche: periodi privi di piogge per più di 6-7 giorni, assenza di pioggia consistente (> 25 mm) e temperature medie variabili tra i 20-30°C. Mentre le piogge non favoriscono il progredire della malattia, poiché sono responsabili del dilavamento dei conidi e dell'inibizione della loro germinazione, l'umidità relativa non rappresenta un ostacolo allo sviluppo del patogeno e valori compresi tra 40 e 90% sono idonei per la germinazione dei conidi (Angeli and Pertot 2007).

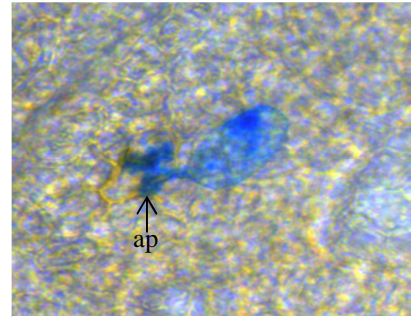


Figura 1.10: Conidio di *E. necator* germinato con la formazione dell'appressorio (ap) visualizzato mediante colorazione con blu di anilina in microscopia ottica.

1.3.4 Sintomi dell'infezione di *Erysiphe necator*

I danni diretti o indiretti sono molteplici e sono determinati dalla capacità del patogeno di colpire tutti i tessuti verdi della pianta. Gli attacchi dell'oidio non portano mai alla morte della pianta ma ne riducono fortemente la produttività e lo sviluppo vegetativo favorendo anche altri patogeni. I germogli e i tralci infetti non si sviluppano adeguatamente e le foglie hanno minore capacità fotosintetica con minore disponibilità di zuccheri ed altri metaboliti, limitando così la crescita dei tessuti.

1.3.4.1 Sintomi dell'infezione di *Erysiphe necator* sulle foglie

I sintomi sulle foglie sono caratterizzati da aree più chiare sulle quali compare inizialmente una patina biancastra evanescente ed in seguito una efflorescenza polverulenta (Figura 1.11 A). In caso di forti attacchi e con l'evolvere della malattia compaiono imbrunimenti delle nervature e punteggiature necrotiche. Nella fase iniziale della malattia i sintomi non sono sempre facilmente visibili. Osservando in controluce il tessuto fogliare in corrispondenza delle lesioni, appare decolorato e traslucido. Con la progressione della malattia la lamina fogliare si piega verso l'alto assumendo la tipica forma "a coppa" (Figura 1.11 B). In seguito la foglia ingiallisce, necrotizza e cade anticipatamente. L'oidio si manifesta su entrambe le superfici della foglia, sulla pagina superiore l'oidio si può sviluppare molto precocemente con la formazione di macchie traslucide ricoperte da una lieve muffa di color bianco-avorio.

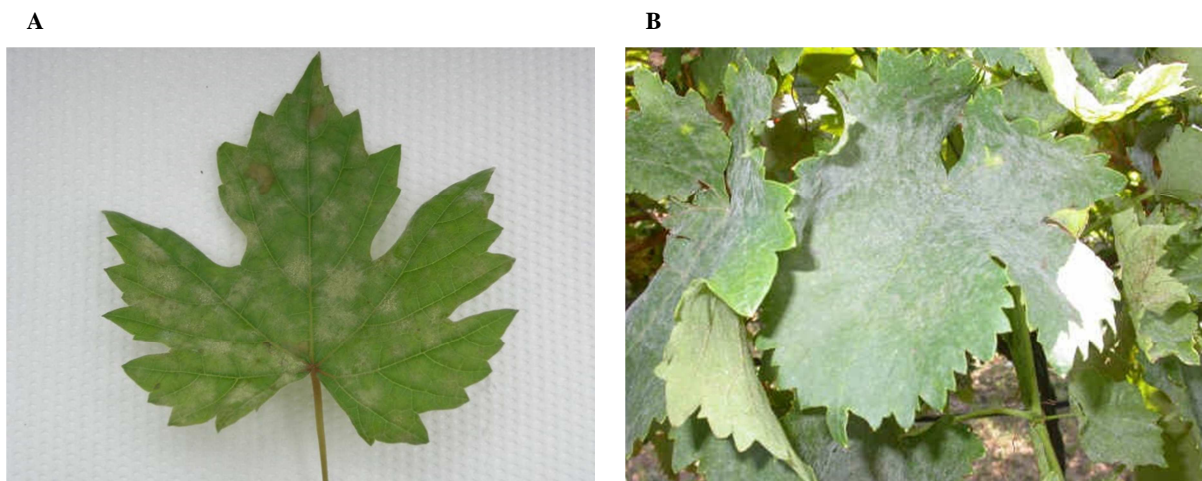


Figura 1.11: Sintomi dell'oidio sulle foglie.

(A) Efflorescenza polverosa sulle foglie. (B) La lamina fogliare si piega verso l'alto ("forma a coppa") (Angeli and Pertot 2007).

1.3.4.2 Sintomi dell'infezione di *Erysiphe necator* sul germoglio

L'oidio può colpire anche i tessuti giovani dei tralci. Nelle fasi iniziali dell'infezione il sintomo non è facilmente visibile in quanto è costituito da micelio rado e scarsa sporulazione. In seguito alla necrosi delle cellule superficiali dovuta all'azione del patogeno compaiono delle aree brune dall'aspetto reticolato che rimangono visibili anche dopo la lignificazione (Figura 1.12). Sui germogli il sintomo è causato dalla rapida colonizzazione dei tessuti da parte del micelio svernante protetto dalle perule all'interno delle gemme (Angeli and Pertot 2007). In primavera i germogli infetti sono precocemente ricoperti da un'abbondante muffa biancastra polverulenta e, poiché lo sviluppo della lamina fogliare è ridotto dall'attività del patogeno, assumono un aspetto particolare denominato "germogli a bandiera" dal termine inglese "*flag-shoots*" (Angeli and Pertot 2007).



Figura 1.12: Sintomi dell'oidio sul tralcio. (Angeli and Pertot 2007).

1.3.4.3 Sintomi dell'infezione di *Erysiphe necator* sul grappolo

I sintomi più gravi si hanno sulle infiorescenze che sono suscettibili già prima della fioritura. Gli attacchi precoci causano l'aborto e la caduta dei fiori ed inibiscono la crescita dei grappoli. Le infezioni post-fiorali causano necrosi delle cellule dell'epidermide con conseguente rottura dell'acino, aprendo così la strada ad altre infezioni (Figura 1.13 B) (Angeli and Pertot 2007). In caso di attacchi deboli o più tardivi sugli acini si formano punteggiature ed imbrunimenti, accompagnati dalla classica efflorescenza biancastra (Figura 1.13 A).

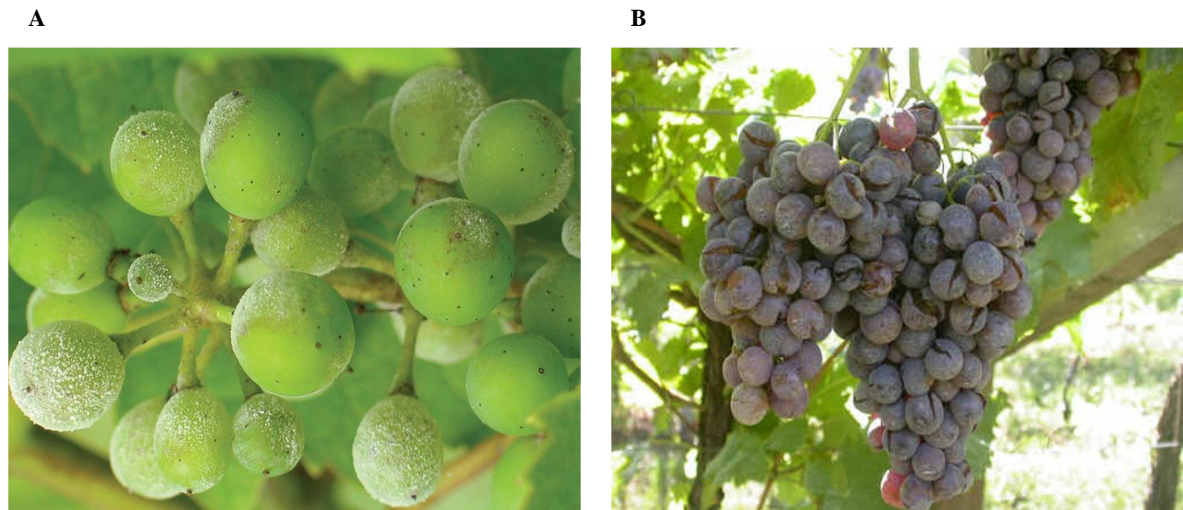


Figura 1.13: Sintomi dell'oidio sui grappoli.
 (A) Efflorescenza biancastra sui grappoli. (B) Spaccature sugli acini causate dall'oidio (Angeli and Pertot 2007).

1.4 Meccanismi di difesa delle piante

1.4.1 Aspetti generali dei meccanismi di difesa

Le piante subiscono continuamente l'attacco di patogeni e predatori, come virus, batteri, funghi, oomiceti, nematodi ed insetti, i quali evolvono dei meccanismi in grado di stabilire una relazione di parassitismo con la pianta ospite (Pieterse et al. 2009). I patogeni possono essere distinti a seconda del loro stile di vita in biotrofi e necrotrofi. I biotrofi ricavano nutrimento dai tessuti vegetali dell'ospite vivente attraverso strutture specializzate nel recuperare nutrimento dai tessuti delle cellule ospiti. I necrotrofi invece provocano la morte dei tessuti dell'ospite secernendo tossine o enzimi litici e si nutrono di quello che rimane (Pieterse et al. 2009).

Poiché la pianta non è in grado di evitare l'attacco del patogeno spostandosi in un ambiente favorevole, deve riuscire ad attivare tempestivamente dei meccanismi di difesa efficaci, tali da permettere la limitazione dell'infezione (Thomma et al. 2001). Le strategie messe in atto per arrestare o limitare l'azione invasiva del patogeno sono molteplici e possono essere indipendenti o dipendenti dall'interazione con il patogeno. Le prime includono risposte pre-esistenti o costitutive della pianta, come la presenza di barriere strutturali e la produzione costitutiva di composti antimicrobici che possono fornire una protezione non-specifica verso un'ampia gamma di microrganismi. Le seconde riguardano meccanismi post-infezione, inducibili in seguito alla percezione di segnali provenienti dal patogeno.

In risposta all'attacco dei patogeni, la pianta può attivare diversi tipi di difesa. La resistenza definita "ospite-specifica" è quella espressa solo da particolari genotipi appartenenti a specie vegetali ospiti, suscettibili ad una particolare specie patogena, ed è circoscritta ad un unico genotipo di tale specie patogena. Si tratta di una resistenza comunemente espressa da una particolare *cultivar* vegetale contro uno specifico genotipo della specie patogena (*pathovar*, nel caso di batteri, e *forma speciale*, nel caso di funghi), per questo viene anche definita come resistenza *razza-cultivar* (Nurnberger and Lipka 2005).

Un secondo tipo di resistenza si verifica quando un'intera specie vegetale non ospita mai nessuna razza di una determinata specie che si è dimostrata patogena nei confronti di un'altra specie vegetale (Mysore and Ryu 2004). Questo tipo di resistenza è denominata "non-ospite" ed è espressa da tutte le piante verso la maggior parte dei

microrganismi potenzialmente patogeni (Heath 2000). In questo contesto, un microrganismo che è patogeno per una specie vegetale ma che non è però in grado di causare malattia in un'altra specie vegetale, viene indicato come patogeno non-ospite di quest'ultima specie vegetale (Mysore and Ryu 2004). La resistenza non-ospite è un tipo di resistenza altamente efficace e duratura contro una vasta gamma di patogeni (Hammond-Kosack and Parker 2003). Si ritiene che i meccanismi che ne stanno alla base possano essere sfruttati per generare colture resistenti (Hammond-Kosack and Parker 2003). La resistenza non-ospite può essere sia di tipo pre-infezione che di tipo post-infezione (Mysore and Ryu 2004).

1.4.2 Meccanismi di resistenza pre-infezione

Le cosiddette difese preformate sono il primo ostacolo che i patogeni devono affrontare prima di poter invadere la pianta. I patogeni necessitano di segnali provenienti dalla pianta per indurre la differenziazione cellulare ed esprimere i geni essenziali alla manifestazione della loro patogenicità (Thordal-Christensen 2003, Mysore and Ryu 2004). Ad esempio, la composizione delle cere sulla superficie cellulare è importante nell'attivazione dello sviluppo di strutture infettive e può quindi permettere di riconoscere se la pianta con la quale è a contatto è un ospite oppure non-ospite (Tsuba et al. 2002). Anche il citoscheletro delle cellule vegetali fornisce una barriera fisica contro l'invasione di molti patogeni ed è stato dimostrato che i microfilamenti di actina forniscono una difesa contro la penetrazione da parte di funghi all'interno del tessuto vegetale; infatti una loro distruzione porta alla perdita della resistenza non-ospite contro diversi funghi (Yun et al. 2003). Inoltre, le piante producono una serie di metaboliti secondari, molti dei quali possono agire come composti antimicrobici (Mysore and Ryu 2004). Essi sono importanti nella difesa contro molti patogeni, sia ospiti che non-ospiti e il loro successo nel prevenire l'instaurarsi di un'infezione dipende probabilmente dal grado di coevoluzione tra pianta e patogeno (Thordal-Christensen 2003). Un esempio a tal proposito è quello del patogeno *Gaeumannomyces graminis* varietà *tritici*, in grado di infettare le radici di frumento, ma non di avena. Il patogeno correlato ad esso *G. graminis* varietà *avenae* riesce ad infettare avena grazie alla sua capacità di detossificare l'avenacina A-1, una saponina antifungina sostitutivamente prodotta. Una linea mutante di avena che non produce questa saponina è risultata infatti suscettibile a *G. graminis* varietà *tritici*, confermando la specificità di questa interazione pianta-patogeno (Papadopoulou et al. 1999).

1.4.3 Meccanismi di resistenza indotti

Il processo di riconoscimento pianta-patogeno avviene innanzitutto attraverso l'interazione tra gli elicitori prodotti dal patogeno ed i corrispondenti recettori presenti nella pianta. Il sistema di difesa della pianta può essere raffigurato con una struttura a *zig-zag* come proposto da Jones and Dangl (2006) (Figura 1.14).

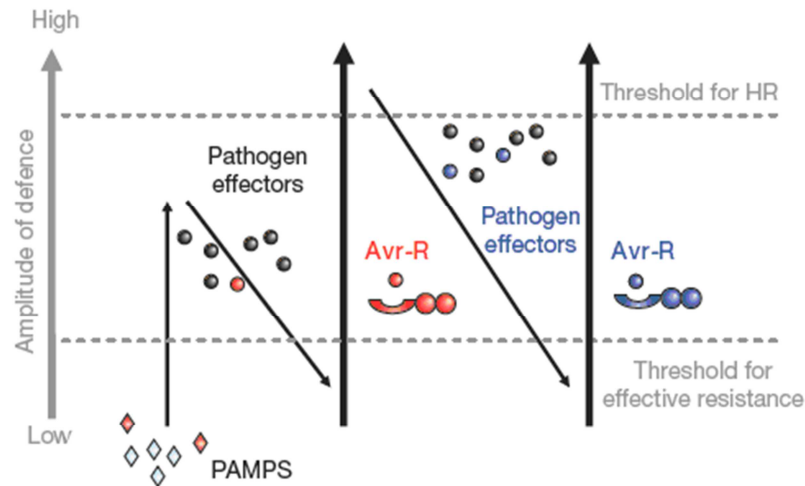


Figura 1.14: Modello a zig-zag dell'interazione pianta-patogeno.
(Jones and Dangl 2006)

Un primo livello, definito immunità innata o resistenza generale indotta, è caratterizzata dal riconoscimento di elicitori generici, come ad esempio la flagellina (la componente principale del flagello batterico) oppure molecole di superficie del patogeno, chiamate PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*), da parte di recettori transmembrana detti PRR (*pattern recognition receptor*) (Dodds and Rathjen 2010). Le piante rispondono anche a molecole rilasciate a causa dell'infezione del patogeno, come frammenti della parete cellulare vegetale, chiamate DAMP (*danger-associated molecular patterns*). Questo primo livello di difesa viene definito *PAMP-triggered immunity* (PTI). Se il patogeno evolve un meccanismo che blocca questa prima linea di difesa attraverso soppressori o fattori di virulenza, la pianta evolve un secondo livello di difesa con un elevato grado di specificità, definito come *effector-triggered immunity* (ETI). Questo secondo livello di resistenza è governato da singoli geni di resistenza (geni *R*) della pianta, il prodotto dei quali interagisce con elicitori specifici prodotti dai geni di avirulenza (*Avr*) dei patogeni. Questo tipo di interazione prende anche il nome di “resistenza gene-per-gene”. Questo modello venne proposto da Flor (1971) e sostiene che la resistenza della pianta si manifesta solo quando la pianta presenta un gene di resistenza in forma dominante (*R*) e il patogeno esprime il complementare gene dell'avirulenza anch'esso dominante (*Avr*). Inizialmente si riteneva che ci fosse un'interazione diretta tra le proteine *R* e *Avr*, secondo un modello recettore-ligando. Studi successivi hanno dimostrato che la maggior parte delle interazioni *R-Avr* non avviene in maniera diretta, ma piuttosto attraverso il cosiddetto “modello di guardia”, secondo il quale le proteine *R* fungono da antenne molecolari che registrano le interazioni tra i fattori di avirulenza e le loro molecole bersaglio dell'ospite (Jones and Dangl 2006).

In seguito a tale processo di riconoscimento avvengono una serie di eventi cellulari attivati dalla pianta (Figura 1.15). La natura di queste risposte di difesa sono molto simili tra PTI e ETI (Pieterse et al. 2009), anche se varia l'intensità della risposta di difesa (Dodds and Rathjen 2010). Il riconoscimento del patogeno da parte della pianta comporta numerosi eventi molecolari quali il flusso di ioni Ca^{2+} verso l'interno della cellula ed un rapido aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'attivazione delle chinasi *mitogen-activated protein* (MAPK). Le difese includono la fortificazione della parete cellulare attraverso la sintesi di callosio, la formazione della papilla e lignificazione. La lignina è un polimero idrorepellente molto robusto, la cui

produzione è stimolata dall'acqua ossigenata. La sua combinazione con il callosio, un polimero del β -1,3-glucano, forma papille a livello del sito di infezione (Thatcher et al. 2005).

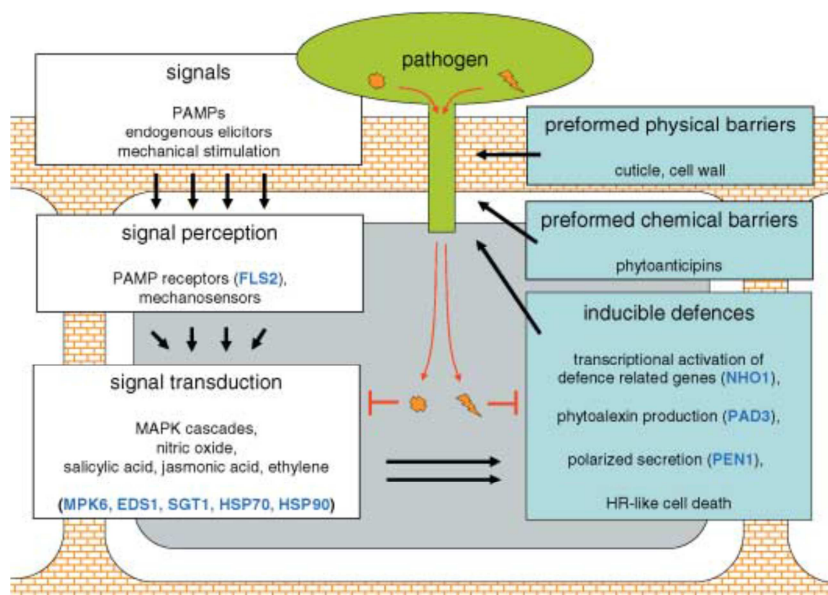


Figura 1.15: Rappresentazione schematica dei meccanismi di percezione, segnalazione e risposta alla base dell'interazione pianta-patogeno.

Il riconoscimento dei PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) mediante specifici recettori sulla superficie cellulare inducono delle risposte di difesa nella pianta. Nelle caselle bianche sono elencati le molecole percepite dall'ospite ed i meccanismi di percezione e trasduzione del segnale. Nelle caselle blu sono indicate le barriere fisiche, chimiche ed i meccanismi di difesa pre-esistenti e indotti (Nurnberger and Lipka 2005).

In seguito all'attacco del patogeno aumenta il livello di estensine e di proteine della parete ricche in idrossiprolina, con conseguente occlusione dei vasi attraverso la formazione di gomme per bloccare la diffusione del patogeno (Thatcher et al. 2005). Tra i composti di difesa che si accumulano vanno anche ricordate le fitoalessine, che includono composti fenolici, terpenoidi, poliacetileni e derivati degli acidi grassi (Thatcher et al. 2005). Viene anche indotta la sintesi di proteine *pathogenesis related* (PR). Queste proteine inducibili correlate alla difesa sono state osservate in molte specie vegetali in seguito all'infezione da parte di oomiceti, funghi, batteri, virus e viroidi, insetti e nematodi (van Loon et al. 2006) e sono state classificate in 17 famiglie in base alle loro proprietà biochimiche e biologiche (Tabella 1.1).

Tabella 1.1: Famiglie conosciute di proteine di difesa correlate alla patogenesi (PR).
(van Loon et al. 2006)

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

La resistenza gene-per-gene porta inoltre alla risposta ipersensibile (HR), che è caratterizzata da una rapida morte delle cellule dell'ospite, localizzata al sito di infezione del patogeno in seguito all'instaurarsi di un'interazione incompatibile (Thatcher et al. 2005). L'HR riesce a confinare la crescita dei patogeni biotrofi limitando l'assunzione di nutrienti da parte di essi. Durante l'HR avviene un flusso di ioni Ca^{2+} e H^+ verso l'interno della cellula, mentre si ha un flusso nella direzione opposta di ioni K^+ e Cl^- . Essi sono controllati da fosforilazione e defosforilazione di proteine specifiche e danno il segnale per la generazione di specie reattive come l'anione superossido (O_2^-), l'acqua ossigenata (H_2O_2) e l'ossido nitrico (NO) (Delledonne et al. 1998).

In seguito all'attacco del patogeno, i primi segnali di difesa sono spesso amplificati attraverso molecole che fungono da messaggeri secondari, come gli ormoni acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA) ed etilene (ET), che possono attivare risposte di difesa sia a livello locale che a livello sistemico in tessuti non infetti (Pieterse et al. 2009). I meccanismi di resistenza sistemica possono essere divisi in due principali categorie: la resistenza sistemica acquisita (SAR, *Systemic Acquired Resistance*) attivata da microorganismi patogeni biotrofi e dipendente dalla presenza dell'SA; e la resistenza sistemica indotta (ISR, *Induced Systemic Resistance*) attivata da microorganismi non patogeni e controllata da JA ed ET.

Le diverse vie di risposta ai patogeni attivate da SA, JA ed ET possono influenzarsi reciprocamente per antagonismo o sinergia per massimizzare e ottimizzare la difesa (Pieterse et al. 2009). Questo meccanismo di interazione è anche chiamato *cross-talk* ed aiuta la pianta a minimizzare il costo energetico ed a creare una flessibile rete di segnali che le permette di adattare la risposta di difesa al microorganismo incontrato (Koornneef and Pieterse 2008). Un esempio di questo meccanismo è stato dimostrato in *Arabidopsis thaliana* dove si è vista una relazione di antagonismo tra l'SA ed l'JA. Infatti, come risultato dell'interazione negativa tra le due molecole segnale, l'attivazione della risposta mediata dall'SA rende la pianta più suscettibile agli organismi che

sono combattuti tramite la difesa mediata dall'JA e viceversa (Koornneef and Pieterse 2008). Oltre al *cross-talk* tra l'SA e l'JA sono state dimostrate interazioni anche tra l'SA e l'ET, tra il JA e l'acido abscissico (ABA), tra il JA e l'ET, che aiutano la pianta a rispondere in modo adeguato all'attacco di insetti erbivori o patogeni biotrofi o necrotrofi (Koornneef and Pieterse 2008).

1.4.3.1 Resistenza sistemica acquisita

Una volta che la risposta di difesa della pianta è attivata localmente in tessuti infetti, spesso viene innescata una risposta di difesa a livello sistemico in parti distali dal sito di infezione (Figura 1.16). La SAR è associata all'accumulo di SA e coinvolge uno o più segnali a lunga distanza che attivano le difese nei tessuti non infetti della pianta. La natura della molecola segnale che viene traslocata per determinare la resistenza a livello sistemico non è ancora nota (Pieterse et al. 2009). Studi mostrano come tale ruolo possa essere rivestito da diversi candidati di molecole segnale, tra cui metil-salicilato, un glicolipide o un gruppo di peptidi coinvolti nel segnale di difesa cellula-cellula (Vlot et al. 2008). Questo mediatore induce l'espressione di geni di difesa conferendo alla pianta una resistenza duratura ed efficace contro molti patogeni, tra cui virus, batteri, funghi e oomiceti (Van der Ent et al. 2009). La SAR è caratterizzata dall'espressione di geni codificanti per proteine PR, alcune delle quali sono considerate marcatori di tale risposta di difesa, come la PR-1. La SAR viene inoltre indotta da vari composti di sintesi, quali acido β -aminobutirrico (BABA), acido 2,6-dicloro-isonitocinico (INA), acido benzo (1,2,3) tiazole-7-carbotioico S-metil estere (BTH), saccarina e fosfite (Walters et al. 2013).

1.4.3.2 Resistenza sistemica indotta

L'ISR può essere attivata da specifici microrganismi benefici, come ad esempio rizobatteri non patogeni promotori della crescita (PGPR- *plant growth-promoting rhizobacteria*) e micorrize, attraverso l'interazione con radici e foglie (Van der Ent et al. 2009) (Figura 1.16). Le MAMPs dei microrganismi benefici vengono riconosciute dalla pianta e questo comporta una debole attivazione delle risposte di difesa a livello sistemico (Pieterse et al. 2009, Van der Ent et al. 2009, Pieterse et al. 2014). A differenza della SAR, l'ISR è regolata da JA ed ET e comporta uno stato di allerta, denominato *priming* (Conrath et al. 2006). Il *priming* determina l'aumento della reattività della pianta che, in seguito al contatto con il patogeno, risponde con una più rapida ed intensa attivazione delle difese (Conrath et al. 2006). La condizione di *priming* è particolarmente interessante perché garantisce un'efficace reazione di difesa (Conrath et al. 2006) mantenendo elevata la produttività della pianta, poiché la ridotta induzione preventiva delle difese evita il consumo di energia cellulare (van Hulten et al. 2006). Studi recenti suggeriscono che alla base dello stato del *priming* ci siano dei meccanismi ereditabili che coinvolgono la modificazione della cromatina e la metilazione del DNA (Pastor et al. 2013).

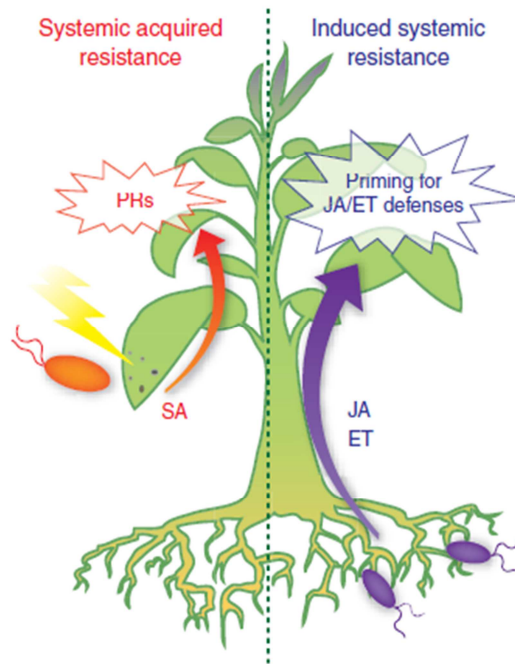


Figura 1.16: Rappresentazione schematica della resistenza sistemica acquisita (SAR) e della resistenza sistemica indotta (ISR).
(Pieterse et al. 2009)

1.4.4 Meccanismi di resistenza della vite a *Plasmopara viticola*

Le varietà di vite europea (*V. vinifera*) sono altamente suscettibili a *P. viticola*. Al contrario, le specie selvatiche di origine americana e asiatica (*V. riparia*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincedumii* and *Muscadinia rotundifolia*) esibiscono diversi livelli di resistenza al patogeno (Casagrande et al. 2011). Ad esempio, i loci *Rpv1*, *Rpv2* (*Rpv*=Resistance to *Plasmopara viticola*) (Merdinoglu et al. 2003) e *Rpv3* (Bellin et al. 2009) sono responsabili della resistenza in *M. rotundifolia* e nella varietà Bianca.

I meccanismi responsabili della resistenza della vite alla peronospora sono stati ampiamente caratterizzati in viti resistenti. La resistenza alla peronospora è principalmente basata su un meccanismo post-infezione (Díez-Navajas et al. 2008, Polesani et al. 2010). Osservazioni al microscopio dello sviluppo del patogeno all'interno dei tessuti della vite hanno infatti rivelato che i primi stadi di infezione del patogeno sono paragonabili nelle cultivar di vite suscettibili e in quelle resistenti. Nelle piante di vite resistenti, lo sviluppo del patogeno è bloccato quando si forma il primo austorio, che stabilisce il primo contatto tra la cellula vegetale e il patogeno circa un giorno dopo l'infezione (Unger et al. 2007, Díez-Navajas et al. 2008, Polesani et al. 2010, Liu et al. 2015). Gli austori favoriscono l'acquisizione di nutrienti dalla pianta e permettono scambi di segnali che hanno lo scopo di modificare il metabolismo della pianta e sopprimere la reazione di difesa (Voegelé and Mendgen 2003, Dodds et al. 2009). In particolare, il patogeno rilascia effettori di patogenicità in modo da manipolare le cellule dell'ospite e stabilire una relazione di parassitismo (Voegelé and Mendgen 2003, Kamoun 2006, Dodds et al. 2009). Recentemente sono stati identificati tre effettori in *P. viticola* (Mestre et al. 2012). Gli effettori di *P. viticola* agiscono come fattori di virulenza nella soppressione della difesa dell'ospite (Milli et al. 2012) e nella manipolazione del metabolismo della pianta per la produzione di precursori per la crescita e sviluppo del patogeno (Gamm et al. 2011). I meccanismi di resistenza post-infezione contro *P. viticola* includono la

deposizione di callosio negli stomi (Díez-Navajas et al. 2008, Jürges et al. 2009), l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'aumento dell'attività perossidasi e l'attivazione dell'HR in genotipi di vite resistenti (Kortekamp 2006, Díez-Navajas et al. 2008). Anche la vite suscettibile presenta una risposta di difesa ai primi stadi di sviluppo di *P. viticola*, anche se debole e insufficiente per limitare l'invasione del patogeno, ed in seguito si instaura una relazione di tipo compatibile tra la pianta e il patogeno con repressione dei geni di difesa (Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Gamm et al. 2011, Perazzolli et al. 2012). La risposta della vite a *P. viticola* è caratterizzata dall'induzione di geni coinvolti nella regolazione trascrizionale, come ad esempio il fattore di trascrizione NAC (Polesani et al. 2010). Le proteine NAC costituiscono una delle famiglie di fattori di trascrizione più numerose e sono coinvolte in varie funzioni tra cui nella risposta di difesa a patogeni (Wang et al. 2013). Il dominio NAC è responsabile del legame con il DNA, mentre il dominio al C-terminale, variabile in sequenza e lunghezza, conferisce la specificità dell'attività trascrizionale di NAC (Le Henanff et al. 2013). La risposta di difesa include anche la sintesi di proteine di patogenesi (PR) e la produzione di composti antimicrobici (Kortekamp 2006, Polesani et al. 2010, Wu et al. 2010, Malacarne et al. 2011, Figueiredo et al. 2012, He et al. 2013). In particolare, i geni codificanti per le proteine di patogenesi PR-2 e PR-4 sono indotti da *P. viticola* sia in specie resistenti che suscettibili (Kortekamp 2006, Perazzolli et al. 2011). In particolare PR-2 codifica per una β -glucanasi, mentre PR-4 per una chitinasi. Le osmotine (OSMs) e le proteine Thaumatin-like (TLPs) appartengono alla famiglia delle PR-5 (van Loon et al. 2006) e mostrano una forte attività di inibizione sulla crescita e sulla germinazione di molti funghi patogeni della vite (Monteiro et al. 2003). Alla famiglia delle PR-16 appartengono le proteine Germin-like (GLPs). In vite sono stati identificati 7 geni *GLP*, due dei quali, *GLP-2* e *GLP-7*, risultano indotti da *P. viticola* (Godfrey et al. 2007). Per alcuni membri della famiglia delle proteine GLP è stata dimostrata un'attività di ossalato ossidasi e superossido dismutasi, enzimi coinvolti nella produzione di H_2O_2 (Godfrey et al. 2007). L' H_2O_2 può essere tossica per il patogeno e può contribuire al rinforzamento strutturale della parete cellulare, sia connettendo le varie glicoproteine ricche di idrossiprolina e prolina con la matrice polisaccaridica, sia aumentando la formazione dei polimeri di lignina mediante l'attività dell'enzima perossidasi (Thatcher et al. 2005). Le fitoalessine e i derivati fenolici sono composti antimicrobici prodotti in seguito all'infezione con *P. viticola*, e sono considerati come marcatori della resistenza (Slaughter et al. 2008, Malacarne et al. 2011). Questi composti di difesa sono sintetizzati nella via dei fenilpropanoidi, che coinvolge diversi enzimi, tra cui la calcone isomerasi (CHI) (Legay et al. 2010). La risposta della vite alla peronospora include anche l'induzione dell'enzima cellulosa sintasi (CellS) che è coinvolta nella sintesi di precursori che favoriscono il metabolismo del patogeno (Polesani et al. 2008, Polesani et al. 2010).

L'interazione tra la vite e la peronospora è stata largamente studiata con analisi molecolari, sia in genotipi resistenti che suscettibili, analizzando l'intera foglia (Kortekamp 2006, Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Polesani et al. 2010, Wu et al. 2010, Gamm et al. 2011, Perazzolli et al. 2012, Li et al. 2015, Merz et al. 2015). Tuttavia, ai primi stadi di infezione del patogeno solo poche cellule sono realmente in contatto con il patogeno (Unger et al. 2007, Godard et al. 2009) e le restanti parti di tessuto fogliare non infette possono mascherare le risposte di difesa localizzate al sito di infezione (Coker et al. 2015). Lo studio dell'interazione tra vite e peronospora a livello sito-specifico nel sito di infezione è quindi estremamente importante per comprendere i meccanismi di risposta localizzati al sito di infezione e identificare nuovi marcatori per la selezione di *cultivar* resistenti a questa malattia.

1.4.5 Meccanismi di resistenza della vite a *Erysiphe necator*

Come per la peronospora, le *cultivar* di *V. vinifera* sono suscettibili all'oidio, al contrario le specie *Muscadinia* e numerose specie *Vitis* di origine americana e asiatica (ad esempio *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. riparia*), che si sono co-evolute con il patogeno, sono resistenti (Qiu et al. 2015). *Run1* (*Run=Resistance to Uncinula necator*) e *Ren 1* (*Ren=Resistance to Erysiphe necator*) sono un esempio di *loci* associati alla resistenza ad oidio presenti in *M. rotundifolia* (Feechan et al. 2013a) e in *Vitis vinifera* cv. "Kishmish vatkana" (Hoffmann et al. 2008). Similmente all'interazione della vite con *P. viticola*, la resistenza all'oidio è principalmente basata su un meccanismo post-infezione (Giannakis et al. 1998, Fung et al. 2008). Osservazioni microscopiche hanno infatti evidenziato che la germinazione dei conidi, la formazione del tubetto germinativo e lo sviluppo dell'appressorio sono del tutto simili nei genotipi resistenti e in quelli suscettibili (Giannakis et al. 1998, Fung et al. 2008). Negli stadi successivi dell'infezione, le piante resistenti differiscono invece da quelle suscettibili per la capacità di limitare la crescita delle ife del patogeno (Fung et al. 2008, Schnee et al. 2008). Nelle piante resistenti, lo sviluppo del patogeno è bloccato in seguito alla formazione dell'appressorio (Schnee et al. 2008, Feechan et al. 2011) o del primo austorio (Fung et al. 2008, Feechan et al. 2011). Le varietà resistenti mostrano inoltre degli imbrunimenti particolari a partire dalla parete cellulare che poi interessano l'intera cellula e talvolta quelle vicine (Fung et al. 2008, Hoffmann et al. 2008), indicando l'attivazione dell'HR per bloccare l'invasione del patogeno. La risposta della vite resistente all'oidio è associata a deboli cambiamenti trascrizionali (Fung et al. 2008), probabilmente per il limitato numero di cellule dell'epidermide realmente a contatto con *E. necator* (Fekete et al. 2009). Le varietà resistenti mostrano inoltre un accumulo costitutivo di proteine PR e di SA in assenza del patogeno, suggerendo una maggiore resistenza in seguito all'attacco di *E. necator* (Fung et al. 2008). Nei genotipi suscettibili, i geni di difesa sono indotti nelle prime fasi di sviluppo del patogeno (Fung et al. 2008). In seguito si instaura una relazione di tipo compatibile tra la vite e l'oidio con repressione dei geni di difesa e manipolazione del metabolismo della pianta per la produzione di precursori per la crescita e sviluppo del patogeno (Fung et al. 2008, Fekete et al. 2009). I meccanismi di resistenza post-infezione contro *E. necator* includono la formazione della papilla a livello del sito di penetrazione (Underwood and Somerville 2008) l'accumulo di ROS (Fung et al. 2008) e l'induzione di geni coinvolti nella regolazione trascrizionale, come ad esempio i fattori di trascrizione WRKY (Guo et al. 2014). La risposta all'oidio include inoltre l'induzione dei geni *EDS-1* e *PAD-4* e la sintesi di proteine PR. I geni *EDS-1* e *PAD-4* codificano per proteine lipasi-like e sono regolatori positivi sia della resistenza mediata da meccanismi pre-infezione che indotti (Gao et al. 2014). *EDS-1*, interagendo con *PAD-4*, è coinvolto nell'accumulo di SA e di ROS (Wiermer et al. 2005). L'espressione dei geni codificanti per proteine PR-1, PR-2, PR-3, PR-5 e PR-6 risulta modulata dall'oidio (Jacobs et al. 1999, Fung et al. 2008, Fekete et al. 2009, Dufour et al. 2013). In particolare, la proteina PR-1 è il marcatore della SAR e della via del SA (Jacobs et al. 1999, Fung et al. 2008). PR-2 codifica per una β -glucanasi e PR-3 codifica per una chitinasi che hanno attività litica nei confronti dei tubetti germinativi di *E. necator* (Giannakis et al. 1998). Mentre, PR-5 codifica per una proteina Thaumatin-like che mostra attività contro funghi e oomiceti (Monteiro et al. 2003) e PR-6 codifica per un inibitore delle proteinasi (van Loon et al. 2006). Inoltre, l'JA svolge un ruolo importante nella difesa della vite ad oidio (Fung et al. 2008). I geni *LOX-1* e *LOX-9* codificano per le lipossigenasi coinvolte nella sintesi di JA (Mueller 1997) e risultano modulati da oidio (Fung et al. 2008, Dufour et al. 2013). Geni codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo secondario, in particolare quelli coinvolti nella via dei fenilpropanoidi, sono attivati in seguito all'attacco di *E. necator* (Fung et al. 2008, Fekete et al.

2009). In particolare, l'enzima stilbene sintasi è il gene chiave nella sintesi di molecole di difesa, come ad esempio le fitoalessine (Schnee et al. 2008).

1.5 Metodi di difesa della vite contro peronospora ed oidio

1.5.1 Metodi di lotta convenzionale contro peronospora ed oidio

La lotta alla peronospora ha fin da subito potuto sfruttare l'efficacia del rame (Pertot et al. 2005, Gessler et al. 2011). *P. viticola* colonizza i tessuti internamente quindi il rame ha un'azione di copertura ed è efficace se utilizzato prima dell'infezione. Il rame agisce probabilmente a livello della membrana di cui modifica la permeabilità, si sostituisce agli ioni calcio e magnesio nella parete cellulare, ma soprattutto interferisce con i processi ossidoriduttivi e respiratori; la sua azione è dunque multisito ed è difficile per il patogeno sviluppare resistenze (Pertot et al. 2005). I principali composti a base di rame sono: solfato di rame, poltiglia bordolese, ossicloruro di rame, idrossido di rame, peptidato di rame e tallato di rame (Pertot et al. 2005). Il rame non è privo di effetti collaterali e può causare effetti di fitotossicità ed accumularsi nel suolo. Il limite di utilizzo del rame era stato fissato ad un massimo di 8 kg di rame per ettaro all'anno, ma, a partire dal 1° gennaio 2006, tale limite è stato ridotto a 6 kg di rame per ettaro per anno nella maggior parte dei paesi europei, tra cui Italia, Francia e Spagna (Regolamento CE n. 473/2002).

Negli ultimi decenni la chimica ha messo a disposizione dei viticoltori molte molecole di sintesi, tra cui ditiocarbammati, tioftalimmidi, tiocianochinoni, sulfamidici, fenilammidi e strobilurine. Alcune di queste molecole hanno azione preventiva (ad esempio ditiocarbammati, tioftalimmidi, tiocianochinoni), mentre altre (ad esempio strobilurine, sulfamidici, fenilammidi) sono efficaci nel combattere lo sviluppo del patogeno dopo la sua penetrazione nei tessuti della pianta perché hanno un'azione translaminare (applicati su un lato della foglia, possono attraversare i tessuti) o sistemica (sono traslocati seguendo i flussi della linfa nella pianta). Tuttavia, l'elevata specificità di molti principi attivi può causare l'insorgenza di resistenze del patogeno (Chen et al. 2007, Corio-Costet et al. 2011).

Le strategie contro l'oidio sono rese difficoltose dal complesso ciclo biologico ed epidemiologico del fungo (duplice modalità di conservazione durante l'inverno e ampi limiti climatici per lo sviluppo), unite all'azione delle infezioni ai grappoli ed alla difficoltà di individuare i primi sintomi (Angeli and Pertot 2007). Il punto di partenza nella pianificazione della difesa contro l'oidio è dato dall'attribuzione del livello di rischio a cui è soggetto il vigneto in questione, che dipende dalla stima del potenziale inoculo presente, in funzione dell'intensità delle infezioni verificatesi nelle annate precedenti (Angeli and Pertot 2007). Lo zolfo è largamente utilizzato contro questo patogeno. La sua azione danneggia diversi aspetti della biologia del fungo non permettendo, di conseguenza, l'insorgere di fenomeni di resistenza. Penetra nella cellula fungina grazie alla sua liposolubilità ed agisce danneggiando la membrana cellulare e determinando la fuoriuscita di acqua. La morte del fungo avviene quindi per disidratazione (Angeli and Pertot 2007). Attualmente, a differenza di quanto è avvenuto per il rame, non esiste una limitazione per l'impiego dello zolfo in viticoltura. Tuttavia, le discussioni sono frequenti a causa dei suoi effetti: irritanti a carico dell'apparato respiratorio dell'uomo, tossici nei confronti dell'entomofauna utile, fitotossici nei confronti dei tralci, soprattutto in presenza di temperature elevate, ed inibitori nei confronti dei processi di fermentazione del vino (Angeli and Pertot 2007). L'industria chimica ha messo a disposizione dei viticoltori prodotti endoterapici con attività curativa e/o eradicante, in grado di bloccare

le infezioni in atto. Questi possono avere azione transaminare o sistemica, come ad esempio, gli inibitori della biosintesi degli steroli, come le strobilurine, le pirimidine, le quinoline e le spiroketalamine. La maggior parte dei principi attivi però ha un meccanismo di azione specifico, che potrebbe essere facilmente superato dalla resistenza del fungo (Gadoury et al. 2012, Dufour et al. 2011).

In passato, rame e zolfo erano le principali molecole per il controllo di peronospora ed oidio e i trattamenti erano gestiti “a calendario”, cioè a cadenza regolare indipendentemente dal rischio di infezione. Attualmente i viticoltori fanno affidamento a bollettini tecnici che consigliano i metodi e i momenti esatti in cui effettuare i trattamenti. Previsioni meteo accurate e modelli matematici per il calcolo del rischio di infezione da peronospora ed oidio permettono di gestire al meglio la difesa ed intervenire con le molecole più adatte al momento necessario. L’alternanza di diverse sostanze, quali rame e zolfo con prodotti di sintesi, permette di evitare lo sviluppo di resistenze da parte del fungo. Inoltre, buone pratiche agronomiche, quali diradamento della massa vegetale troppo fitta e l’irrigazione a goccia per evitare di bagnare il fogliame, aiutano a ridurre la diffusione dei patogeni (Angeli and Pertot 2007).

I prodotti chimici per la protezione della piante (fitofarmaci) hanno un enorme impatto sia a livello ambientale che sulla popolazione e, in alcuni casi, i residui dei pesticidi sono stati trovati nel vino (Delaunoy et al. 2014). Per questo motivo, c’è un grande interesse nella ricerca e nello sviluppo di metodi alternativi al controllo chimico dei patogeni in viticoltura. In questo contesto, i nuovi approcci di difesa antiparassitaria integrata includono l’uso di microrganismi antagonisti come agenti di controllo per il controllo biologico (*biocontrol agents*, BCA), l’induzione della resistenza mediata da elicitori naturali e l’utilizzo di varietà tolleranti ad oidio e peronospora ottenute dai programmi di miglioramento genetico (Delaunoy et al. 2014).

1.5.2 Sistemi alternativi per il controllo della peronospora e dell’oidio

1.5.2.1 Agenti microbici e sostanze naturali per il controllo biologico

L’uso di microrganismi utili è una valida alternativa ai fitofarmaci per il controllo delle malattie della vite (Gessler et al. 2011) ed esistono numerosi studi relativi all’identificazione e caratterizzazione dei BCA. Ad esempio, il batterio *Lysobacter capsici* AZ78 riduce la severità della peronospora con un’efficacia paragonabile al rame (Puopolo et al. 2014). Allo stesso modo, un estratto acquoso di micelio di *Penicillium chrysogenum* limita lo sviluppo della peronospora, senza mostrare effetti tossici diretti sul patogeno (Thuerig et al. 2006). Inoltre, è stato dimostrato che il fungo endofita *Acremonium byssoides*, isolato dalle foglie di vite della cultivar Regina Bianca, inibisce, sia come estratto crudo che come filtrato culturale, lo sviluppo di *P. viticola* (Burruano et al. 2008). Un ceppo di *Ampelomyces quisqualis*, isolato in Israele, è stato formulato e commercializzato come AQ10 per il controllo dell’oidio. Questo prodotto rappresenta l’unico batterio fungicida attualmente disponibile sul mercato che può essere utilizzato contro l’oidio della vite in alternativa allo zolfo (Angeli and Pertot 2007). *A. quisqualis* agisce come iperparassita vivendo a spese del fungo patogeno, invadendo il citoplasma delle cellule dell’oidio causandone una rapida degenerazione. La parassitazione di *A. quisqualis* nei confronti dell’oidio causa una riduzione degli effetti negativi della malattia, ma il suo utilizzo esclusivo non è sufficiente per controllare in maniera soddisfacente l’oidio della vite. Sebbene i microrganismi abbiano una buona attività contro peronospora ed oidio in condizioni controllate, essi mostrano una parziale o totale riduzione dell’attività nel vigneto (Gessler et al. 2011). Pertanto sono necessari ulteriori studi per valutare il loro meccanismo di azione e il livello di persistenza per aumentarne la loro efficacia in campo.

L'induzione di resistenza nei confronti di patogeni mediante somministrazione di sostanze naturali o di sintesi è un'ulteriore strategia per il controllo delle malattie delle piante (Delaunoy et al. 2014). Alcune molecole sono in grado di indurre resistenza a peronospora. Tra queste ricordiamo: il chitosano, un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina (Aziz et al. 2006); la laminarina, un β -1,3-glucano derivante dall'alga bruna *Laminaria digitata* (Aziz et al. 2003); PS3, un composto ottenuto dalla reazione di solfatazione della laminarina (Trouvelot et al. 2008, Steimetz et al. 2012); l'acido beta-aminobutirrico (BABA) (Hamiduzzaman et al. 2005); gli oligogalatturonidi, frammenti di pectina (Allègre et al. 2007); la tiamina (vitamina B1) (Boubakri et al. 2012, Boubakri et al. 2013). Gli estratti da radici dal rabarbaro cinese (*Rheum palmatum*) e da corteccia di *Frangula alnus* sono in grado di ridurre l'infezione di *P. viticola*, causando l'accumulo di fitoalessine, l'aumento dell'attività perossidasi e la reazione ipersensibile (Godard et al. 2009). Perazzolli et al. (2011) hanno dimostrato che l'applicazione fogliare del microrganismo *Trichoderma harzianum* T39 incrementa la resistenza della vite alla peronospora per mezzo dell'attivazione delle difese della pianta. Recentemente, gli idrolizzati proteici da caseina e soia hanno mostrato capacità di indurre resistenza a peronospora, regolando i geni codificanti per proteine di patogenesi (PR), l'enzima stilbene sintasi coinvolto nella sintesi della fitoalessina resveratrolo, attivando le MAPK e determinando l'influsso di ioni Ca^{2+} (Lachhab et al. 2014). Similmente, una nuova formulazione a base di chitosano (Iriti et al. 2011) e un composto costituito da frammenti di chitosano associati a frammenti di pectina (COS-OGA) sono in grado di ridurre la severità dell'oidio (van Aubel et al. 2014). Inoltre, un estratto dall'alga verde *Ulva armonicana* limita lo sviluppo dell'oidio (Jaulneau et al. 2010) attraverso l'induzione della difesa della pianta mediata da JA (Jaulneau et al. 2011). Un estratto da *Reynoutria sachalinensis* (Milsana) è stato riportato come induttore di resistenza con una moderata efficacia contro *E. necator* (Delaunoy et al. 2014). L'applicazione di latte, siero e bicarbonato di potassio ha mostrato riduzione della severità dell'oidio (Crisp et al. 2006), così come l'estratto proteico derivato da brodo nutritivo (*nutrient broth*, NB) (Nesler et al. 2015).

Gli ormoni della pianta e molecole analoghe sono in grado di stimolare la difesa contro *P. viticola* ed *E. necator*. È stato dimostrato che trattamenti con etanolo e analoghi di SA attivano l'induzione delle risposte di difesa contro l'oidio della vite (Belhadj et al. 2008, Dufour et al. 2013). In particolare, l'ethephon, un composto che rilascia ET quando si trova a contatto con i tessuti vegetali, induce geni di difesa e protegge le foglie di vite contro *E. necator* (Belhadj et al. 2008). L'applicazione di BTH, analogo di SA, attiva la resistenza della vite contro l'oidio, inducendo geni di difesa come *PR-1*, *PR-3* e *PR-10* contro *E. necator* (Dufour et al. 2013) e *P. viticola* (Perazzolli et al. 2008).

L'induzione di resistenza è un metodo di controllo della malattia basato sulla stimolazione delle difese della pianta ed è un promettente approccio a basso impatto. Tuttavia, la completa induzione di resistenza è difficile da raggiungere (Walters et al. 2013). Alcuni fattori, come il ciclo vegetativo, le condizioni climatiche, gli stress abiotici e la pressione dell'infezione possono alterare l'induzione della resistenza nella pianta riducendo quindi l'efficacia degli induttori di resistenza (Delaunoy et al. 2014). Questo implica la necessità di ulteriori studi sul meccanismo di attivazione della resistenza.

1.5.2.2 Miglioramento genetico della vite

L'applicazione dei metodi tradizionali di miglioramento genetico, basati su programmi d'incrocio e selezione, ha generato ibridi resistenti a peronospora ed oidio che potrebbero rappresentare un'alternativa promettente per limitare l'uso di pesticidi. Sono stati infatti recentemente registrate 6 nuove varietà di vite tolleranti a oidio e peronospora per la produzione di vino in Italia (<http://www.fmach.it/Comunicazione/Ufficio-stampa/Comunicati-Stampa/Viti-resistenti-iscritte-nel-Registro-nazionale-al-via-la-coltivazione>). L'accettazione da parte dei produttori e consumatori è spesso limitata a causa del consumo di vini tradizionali con determinate caratteristiche organolettiche associabili alla *cultivar*. Il miglioramento genetico classico ha avuto una bassa efficienza per alcune caratteristiche biologiche della vite, comuni a molte specie arboree, il lungo ciclo di generazione e l'elevata eterozigosi rendono infatti difficile il raggiungimento degli obiettivi. Le viti di origine americana, utilizzate negli incroci come fonte di resistenza, trasmettono inoltre aromi indesiderati, dando origine a vini dal gusto non gradevole (Alleweldt and Possingham 1988). 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, il sequenziamento del genoma della vite (Jaillon et al. 2007, Velasco et al. 2007) e lo sviluppo di marcatori molecolari si sono dimostrati molto utili nel programma di miglioramento genetico assistito (*Marker Assisted Selection*, MAS). I marcatori molecolari facilitano le indagini sull'origine delle *cultivar* resistenti e forniscono validi strumenti per la creazione di nuove varietà. L'uso dei marcatori molecolari consente inoltre di ridurre i tempi necessari ad evidenziare la presenza di caratteri di interesse, senza dover attendere la loro espressione fenotipica nell'individuo adulto. Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi marcatori molecolari associati a *loci* di resistenza a *P. viticola* e ad *E. necator* in vite (Welter et al. 2007, Hoffmann et al. 2008, Bellin et al. 2009, Casagrande et al. 2011).

Le fonti di resistenza a peronospora ed oidio 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*, che ha un assetto cromosomico leggermente diverso ($2n = 40$ cromosomi) dal resto del genere *Vitis* e quindi poco sfruttata negli incroci a causa della parziale incompatibilità. Le resistenze a peronospora ed oidio si trovano anche in altre specie appartenenti al sottogenere *Euvitis* ($2n = 38$ cromosomi), tra cui *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. lincecumii*, *V. labrusca*, *V. amurensis*, *V. rotundifolia*, *V. aestivalis*, *V. cinerea* e *V. berlandieri* (Casagrande et al. 2011, Qiu et al. 2015), che sono compatibili nell'incrocio con *V. vinifera*. L'attività di miglioramento genetico per le resistenze alle malattie ha per lungo tempo focalizzato la propria attenzione sullo sviluppo di *cultivar* in cui fossero presenti i geni di resistenza (geni R). I geni di suscettibilità (geni S) potrebbero offrire un'utile alternativa per l'ottenimento di *cultivar* resistenti.

1.5.2.2.1 Geni di resistenza

I geni di resistenza R sono raggruppati in otto classi (Gururani et al. 2012). La prima classe, quella più abbondante, include i geni R codificanti per proteine con un dominio N-terminale di legame per i nucleotidi (*Nucleotide binding site*, NBS) e un dominio C-terminale con sequenze ripetute ricche di leucina (*Leucine Rich Repeat*, LRR). La seconda classe di geni di resistenza raggruppa proteine con domini NBS e LRR e un motivo all'N-terminale omologo al recettore Toll e al recettore per l'interleukina-1 (TIR-NBS-LRR) dei mammiferi. La terza classe di geni di resistenza contiene proteine prive del motivo NBS, ma con un dominio citoplasmatico LRR, legato ad un dominio transmembrana (TRD); mentre i geni R del quarto gruppo codificano per proteine

che presentano, oltre ai motivi LRR e TRD, un dominio serina/treonina chinasi. La quinta classe include i geni R codificanti per proteine con il motivo extracellulare LRR, un dominio PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) per la degradazione della proteina e un dominio corto ECS coinvolto nella mediazione della proteina per escitosi. Il sesto gruppo di geni di resistenza raggruppa le proteine che presentano un dominio transmembrana, fuso ad un dominio *coiled coil*; mentre il settimo gruppo presenta i geni R codificanti per proteine con motivi TIR-NBS-LRR e un dominio implicato nella localizzazione al nucleo (NLS) e un WRKY al C-terminale. L'ultima classe raggruppa i geni R enzimatici che non presentano i motivi NBS e LRR (Gururani et al. 2012) (Figura 1.17).

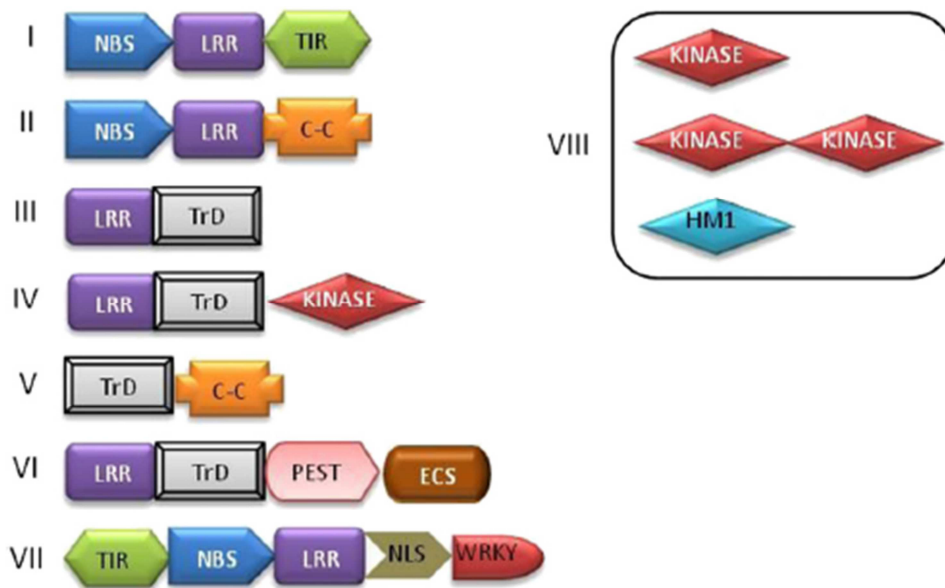


Figura 1.17: Le otto classi dei geni di resistenza (geni R).

LRR - *Leucine rich repeats*; NBS - *Nucleotide-binding site*; TIR - *Toll/Interleukin-1- receptors*; C-C - *Coiled coil*; TrD - *Transmembrane domain*; PEST - *Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine)*; ECS - *Endocytosis cell signaling domain*; NLS - *Nuclear localization signal*; WRKY - *Amino acid domain*; HM1 - *Helminthosporium carbonum toxin reductase enzyme* (Gururani et al. 2012).

Il genoma di vite presenta un'ampia famiglia di geni R con dominio NBS-LRR (Qiu et al. 2015). Le basi genetiche della resistenza a peronospora derivano da due QTL, *Rpv1* e *Rpv2* (*Rpv*=*Resistance to Plasmopara viticola*), sul cromosoma 12 e 18 in *M. rotundifolia* (Merdinoglu et al. 2003), da due QTL sui cromosomi 9 e 12 in *V. riparia* (Marino et al. 2003, Marguerit et al. 2009) e da due QTL sul cromosoma 4 e 18 nella varietà Regent (Welter et al. 2007). Il QTL principale, *Rpv3*, localizzato sul cromosoma 18, è responsabile della resistenza nella varietà Bianca (Bellin et al. 2009).

Nove loci legati alla resistenza ad oidio sono stati identificati in specie di vite americane, cinesi e centroasiatiche (Gadoury et al. 2012, Qiu et al. 2015). In particolare, *Run1*, *Run2* (*Run*=*Resistance to Uncinula necator*) e *Ren5* (*Ren*=*Resistance to Erysiphe necator*) sono responsabili della resistenza ad oidio in *M. rotundifolia* (Blanc et al. 2012, Feechan et al. 2013a, Feechan et al. 2015). Il locus *Ren1* è presente nella *Vitis vinifera* cv. "Kishmish vatkana" (Hoffmann et al. 2008), mentre *Ren3* nell'ibrido interspecifico Regent (Welter et al. 2007). Infine, *Ren4*, *Ren6* e *Ren7* sono responsabili della resistenza all'oidio nelle viti di origine asiatica (Ramming et al. 2011, Qiu et al. 2015).

Le resistenze mediate dai geni R sono generalmente non durevoli, in quanto possono essere superate dalla comparsa di varianti genetiche del patogeno (Peressotti et al. 2010). I programmi di miglioramento genetico devono dare una resistenza non solo efficiente ma anche duratura nel tempo, malgrado la continua evoluzione del patogeno. Quindi una priorità fondamentale per il miglioramento genetico per la resistenza alle malattie deve essere l'unione di più geni R in un singolo genotipo mediante miglioramento genetico e l'elaborazione di alternative all'uso dei geni R, basate sull'identificazione e sulla valorizzazione di fonti di resistenza per quanto possibili durature.

1.5.2.2.2 Geni di suscettibilità

I geni S codificano per proteine bersaglio di fattori di virulenza del patogeno, che funzionano come regolatori negativi della difesa o fattori di suscettibilità (Pavan et al. 2010). L'inattivazione di questi geni impedisce agli effettori di alterare la biologia cellulare a favore del patogeno, portando ad un'immunità stabile verso i patogeni (Pavan et al. 2010).

Nonostante siano necessari per la proliferazione dei patogeni e l'insorgere della malattia, i geni S non sono mai stati esclusi nel corso dell'evoluzione (Pavan et al. 2010). Evidenze suggeriscono che alcuni geni S, pur essendo coinvolti nell'interazione pianta-patogeno, sono richiesti per il funzionamento di altri importanti aspetti della fisiologia della pianta (Pavan et al. 2010). Geni della pianta che regolano negativamente i processi di difesa contro i patogeni conferiscono presumibilmente un vantaggio selettivo, ottimizzando la distribuzione delle risorse energetiche necessarie per altri processi fisiologici. Mutazioni dei geni S sono spesso accompagnate da effetti pleiotropici per gli individui quali crescita stentata e/o formazione di lesioni più o meno estese delle foglie (Pavan et al. 2010).

1.5.2.2.1 Geni di suscettibilità MLO

I geni *MLO* (*Mildew locus O*) appartengono ad una famiglia genica e codificano per proteine transmembrana di circa 530 aminoacidi (Lyngkjær et al. 2000). Essi sono presenti anche nelle alghe (Elliott et al. 2005), suggerendo un'origine antica di questa famiglia genica (Devoto et al. 2003). In *A. thaliana* sono presenti 15 geni *MLO* (Chen et al. 2009), 17 in vite (Feechan et al. 2008), 12 in riso (Liu and Zhu 2008), 14 in cetriolo (Zhou et al. 2013), 39 nella soia (Deshmukh et al. 2014), 16 in pesco (Jiwan et al. 2013), 17 in pomodoro (Chen et al. 2014), 8 in frumento (Konishi et al. 2010), 17 in fragola e 21 in melo (Pessina et al. 2014).

Alcuni membri della famiglia dei geni *MLO* hanno un ruolo nell'interazione della pianta con l'oidio. Il silenziamento di un gene *MLO* in orzo determina resistenza verso l'agente causale dell'oidio (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*), mentre l'over espressione di questo gene causa un aumento della suscettibilità (Jørgensen 1992, Büschges et al. 1997). Studi successivi hanno evidenziato che il silenziamento dei geni *MLO* conferisce resistenza ad oidio anche in pomodoro (Bai et al. 2008), in pisello (Pavan et al. 2011), in *A. thaliana* (Consonni et al. 2006), in frumento (Wang et al. 2014), in peperone (Zheng et al. 2013) e in cetriolo (Nie et al. 2015). Ciò che varia tra le specie è il numero di geni silenziati necessari per dare resistenza: il silenziamento di un solo gene è sufficiente per la resistenza all'oidio in pisello e pomodoro (Bai et al. 2008, Pavan et al. 2011), mentre il silenziamento di tre geni *MLO* è richiesto per avere la completa resistenza all'oidio in *A. thaliana* (Consonni et al. 2006).

Struttura delle proteine MLO e analisi filogenetica

Le proteine MLO presentano 7 domini transmembrana, con l'N-terminale extracellulare e il C-terminale citoplasmatico (Devoto et al. 1999) (Figura 1.18). Al C-terminale è presente un sito di legame della calmodulina (CaMBD) necessario per l'attività della proteina MLO nell'interazione con oidio (Kim et al. 2002). Per la loro localizzazione cellulare e la diversità delle sequenze all'interno della famiglia, si è pensato potessero essere associate ai recettori accoppiati alle proteine G (GPCR), similmente a quanto avviene in *Caenorhabditis elegans* e *Homo sapiens*. Tuttavia, le proteine MLO sembrano funzionare indipendentemente alle proteine eterodimeriche G (Kim et al. 2002).

Le proteine MLO presentano residui conservati in ciascuno dei 7 segmenti transmembrana e nei *loops* citoplasmatici 1, 2 e 3, al contrario i *loops* extracellulari 1 e 3, l'N-terminale e il C-terminale presentano delle sequenze altamente variabili (Devoto et al. 1999). In totale, 30 aminoacidi (meno del 10% della proteina totale) risultano invariati, mentre 17 sono altamente conservati (Elliott et al. 2005). Dei 30 aminoacidi, quattro cisteine nei *loops* extracellulari e due proline nel motivo transmembrana sono conservate in tutte le sequenze aminoacidiche della famiglia MLO (Devoto et al. 1999, Elliott et al. 2005). Le cisteine potrebbero avere ruolo nella formazione di ponti disolfuro intramolecolari tra *loop* 1 e 3 per il corretto *folding* o, in alternativa, contribuire alla formazione di dimeri/oligomeri di proteine MLO mediante ponti disolfuro. I residui di prolina, invece, potrebbero essere coinvolti nell'interazione elica-elica per la conformazione strutturale della proteina (Elliott et al. 2005).

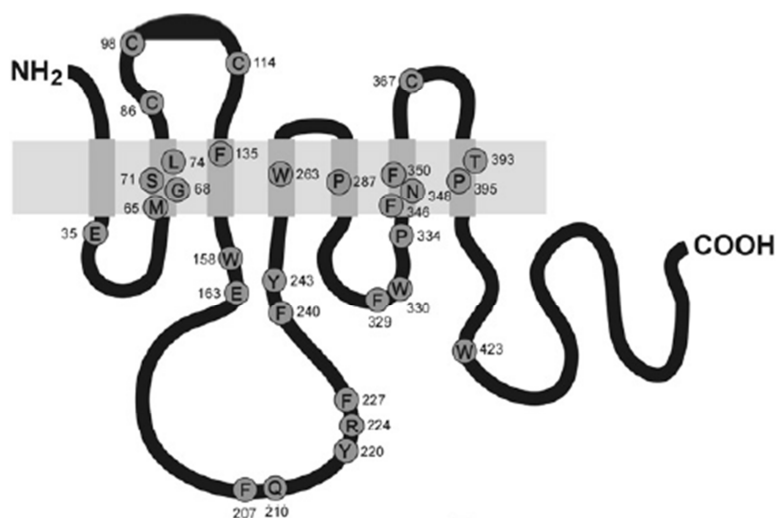


Figura 1.18: Rappresentazione schematica delle proteine MLO.

La barra di colore grigio-chiaro indica il doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica, mentre le caselle di colore grigio-scuro mostrano i domini transmembrana. I cerchi riportanti la lettera relativa all'aminoacido indicano gli aminoacidi conservati (Elliott et al. 2005).

Le 15 proteine MLO di *Arabidopsis* erano state inizialmente suddivise in quattro gruppi filogenetici (Chen et al. 2009). In seguito agli studi sulle proteine MLO in altre specie vegetali, quali vite, orzo, frumento e riso, sono stati definiti 6 distinti gruppi (Feechan et al. 2008). I gruppi IV e V sono di particolare interesse, in quanto raggruppano le proteine MLO da specie monocotiledoni (gruppo IV) e da specie dicotiledoni (gruppo V) con un ruolo nel determinare la suscettibilità della pianta ad oidio, mentre nessuna proteina MLO coinvolta nella suscettibilità all'oidio è presente in altri gruppi filogenetici (Acevedo-Garcia et al. 2014). Le sequenze presenti in

questi due gruppi sono caratterizzate dalla presenza di residui di serina, treonina e di un tetra-peptide D/E-F-S/T-F al C-terminale (Panstruga 2005a). Recentemente, è stato proposto un settimo gruppo che include il gene *MLO-11* di cetriolo (Zhou et al. 2013) e *MLO-2* di pomodoro (Chen et al. 2014).

Meccanismo d'azione delle proteine MLO

Il meccanismo con il quale le proteine MLO facilitano la penetrazione del fungo all'interno della pianta è ancora oggetto di studio. È stato suggerito che un possibile meccanismo di resistenza nelle piante di orzo silenziate nell'espressione dei geni *MLO* sia la formazione della papilla (Consonni et al. 2006). La papilla è costituita da callosio, proteine, composti fenolici (lignina e derivati fenolici), arabinoglicani e composti antimicrobici (Chowdhury et al. 2014) e agisce come barriera fisica per bloccare la penetrazione del fungo. La formazione della papilla, non è comunque ristretta al silenziamento dei geni *MLO*, ma fa parte della risposta della pianta all'infezione di oidio (Lyngkjær et al. 2000). Ciò che differenzia le papille nelle piante resistenti è il tempo necessario per la loro formazione, la composizione e le dimensioni (Lyngkjær et al. 2000, Chowdhury et al. 2014, Hueckelhoven 2014). È stato dimostrato che, in piante di orzo silenziate per i geni *MLO*, la papilla si forma più velocemente e presenta dimensioni maggiori rispetto alle piante controllo (Lyngkjær et al. 2000). Inoltre, recentemente è stato evidenziato che la composizione delle papille svolge un ruolo importante: le papille in piante di orzo resistenti (papilla effettiva) contengono una maggiore concentrazione di callosio, cellulosa ed arabinoxilani rispetto alle papille delle piante suscettibili (papilla non-effettiva) (Chowdhury et al. 2014).

La formazione della papille nel sito di penetrazione del patogeno è legata al trasporto mediato da vescicole. In *A. thaliana* sono presenti due meccanismi responsabili della formazione della papilla (Underwood and Somerville 2008). Il primo coinvolge il gene *PEN-1* (*Penetration-1*) che codifica per una syntaxina (Collins et al. 2003). In *A. thaliana*, *PEN-1* forma un complesso SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*) assieme a SNAP-33 (*Synaptosomal-associated protein 33*), a VAMP7-22 e VAMP7-21 (*Vesicle associated membrane proteins*). È stato dimostrato che la proteina PEN-1 di *A. thaliana* (e ROR-2 di orzo) è localizzata nella membrana plasmatica e si accumula nel sito di penetrazione del patogeno in caso di infezione con il fungo. I mutanti *pen-1* mostrano una papilla di ridotte dimensioni, suggerendo un ruolo di questa proteina nel traffico di vescicole verso il sito di penetrazione del fungo per sintetizzare la papilla (Underwood and Somerville 2008). Il secondo meccanismo coinvolge i geni *PEN-2* e *PEN-3*: *PEN-2* codifica per l'enzima glicosil idrolasi localizzata nei perossisomi, *PEN-3* codifica invece un trasportatore ABC (*ATP-binding cassette (ABC) transporter*) coinvolto nel trasporto dei composti antimicrobici prodotti da *PEN-2* dai perossisomi verso il sito di infezione dell'oidio (Lipka et al. 2005, Stein et al. 2006). L'attività enzimatica e la localizzazione fanno pensare che *PEN-2* possa partecipare alla formazione di composti implicati nella resistenza probabilmente attraverso un'attività antifungina (Lipka et al. 2005). I doppi mutanti *pen1pen2* mostrano una frequenza di penetrazione maggiore rispetto ai mutanti singoli, suggerendo che *PEN-1* e *PEN-2* funzionano in due processi indipendenti coinvolti nella resistenza al patogeno (Lipka et al. 2005).

Le proteine MLO sono localizzate nella membrana plasmatica e in seguito all'attacco di oidio si accumulano nel sito di penetrazione del fungo (Bhat et al. 2005), dove si pensa regolino negativamente i due meccanismi di penetrazione mediati da *PEN-1* e *PEN-2/PEN-3* attraverso meccanismi actina-dipendente e actina-indipendente (Miklis et al. 2007).

Altre funzioni delle proteine MLO

I geni *MLO* sono espressi in diversi tessuti della pianta (Feechan et al. 2008), suggerendo il loro coinvolgimento in altri processi fisiologici oltre all'interazione con oidio. Ad esempio in *A. thaliana*, la proteina MLO-7 è richiesta per la percezione del tubetto pollinico nel sacco embrionale (Kessler et al. 2010), mentre MLO-4 e MLO-11 sono coinvolte nello sviluppo delle radici (Chen et al. 2009). Al contrario, i geni *MLO-2*, *MLO-6* e *MLO-12* di *A. thaliana* sono responsabili della suscettibilità all'oidio (Consonni et al. 2006). L'espressione dei geni *MLO* può essere influenzata anche da diversi stimoli biotici ed abiotici (Piffanelli et al. 2002, Chen et al. 2006). L'espressione del gene *MLO-2* di *Capsicum annum* è indotta nelle foglie di peperone in seguito al trattamento con l'ormone ABA e in condizioni di stress idrico, suggerendo un ruolo di questa proteina nella regolazione della risposta a stress idrico (Lim and Lee 2014). Inoltre MLO-2 di *C. annum* modula la risposta a batteri ed oomiceti e la morte cellulare associata all'infezione batterica (Kim and Hwang 2012). Il silenziamento di alcuni geni *MLO* aumenta inoltre la suscettibilità a *Magnaporthe grisea* e *Bipolaris sorokiniana* in orzo (Jarosch et al. 1999, Kumar et al. 2001) ed *Alternaria alternata*, *A. brassicicola* and *Phytophthora infestans* in *A. thaliana* (Consonni et al. 2006), suggerendo un ruolo dei geni *MLO* nella resistenza ad altri patogeni.

Geni MLO in vite

In vite sono stati individuati 17 geni *MLO* (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008). L'analisi dell'espressione in diversi tessuti della vite ha evidenziato che i geni *MLO* non mostrano un'espressione tessuto-specifica, ma sono espressi in tutti i tessuti analizzati, come foglia, radice, fiore, grappoli (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008). Sei di essi (*MLO-3*, *MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-8*, *MLO-11* e *MLO-13*) appartengono al gruppo V, suggerendo quindi un possibile ruolo nella suscettibilità della pianta all'oidio. In particolare, le proteine MLO-6, MLO-7, MLO-11 e MLO-13 sono filogeneticamente correlate a MLO-2, MLO-6 e MLO-12 di *A. thaliana* e a MLO-1 di pomodoro (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008), per le quali è noto il coinvolgimento nei processi della suscettibilità all'oidio (Consonni et al. 2006, Bai et al. 2008). L'analisi di espressione dei geni *MLO* del gruppo V in seguito all'infezione di *E. necator* ha infatti mostrato che l'espressione di tre geni *MLO* del gruppo V è indotta dal fungo. In particolare, *MLO-13* è indotto nelle foglie di vite a 8 ore e a 10 giorni dall'inoculo con il fungo. Il gene *MLO-7* è indotto precocemente a 4 ore e a 10 giorni. L'espressione del gene *MLO-11* risulta indotta a 8 ore dall'inoculo e viene mantenuta anche a 20 ore dall'inoculo (Winterhagen et al. 2008). Il gene *MLO-6*, pur appartenendo allo stesso gruppo, non risulta invece modulato dall'infezione di *E. necator*. Mediante test di complementazione nel triplo mutante *mlo2-mlo6-mlo12* di *A. thaliana* è stato inoltre osservato che i geni *MLO-11* e *MLO-13* di vite, ma non *MLO-7* e *MLO-6*, aumentano la penetrazione di *E. cichoracearum* (agente causale dell'oidio di *Arabidopsis*), suggerendo un possibile ruolo di *MLO-11* e *MLO-13* nella suscettibilità all'oidio (Feechan et al. 2013b). Inoltre è stato recentemente dimostrato che le proteine MLO-11 e MLO-13 sono localizzate nel sito di penetrazione dell'oidio assieme a PEN-1 (Feechan et al. 2013b). Per valutare il coinvolgimento dei geni *MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13* nella suscettibilità della vite all'oidio sono però necessari studi funzionali mediante silenziamento genico di questi quattro geni *MLO*.

1.6 Metodi per lo studio funzionale dei meccanismi di difesa della vite

1.6.1 Trasformazione genetica ed applicazioni pratiche

L'ottenimento di varietà di piante coltivate più produttive e resistenti alle malattie è uno degli obiettivi principali del miglioramento genetico dei vegetali. Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante ha permesso di trasformare geneticamente le *cultivar* di vite al fine di inserirvi specifici geni e studiarne la funzione. L'applicazione della trasformazione genetica volta all'ottenimento e all'utilizzazione di organismi migliorati suscita però dubbi e perplessità per l'applicazione in settori produttivi (Mezzetti and Gentile 2005). Il trasferimento di un gene all'interno della pianta mediante trasformazione genetica rimane comunque una metodica importante per lo studio funzionale di un gene *in vivo* e permette di ottenere, in tempi relativamente brevi, piante con aumentati o ridotti livelli di espressione di uno specifico gene. In questo modo è quindi possibile verificare la funzione di un gene e validare il suo coinvolgimento in un processo di interesse agronomico, come ad esempio la resistenza contro le malattie o la qualità dei frutti, per poter in seguito usare tale gene come marcatore specifico in programmi di miglioramento genetico classico finalizzati all'ottenimento di nuove varietà non transgeniche con migliori caratteristiche agronomiche.

In vite, si possono ottenere mutanti funzionali mediante over-espressione o silenziamento genico con la tecnica del trasformazione genetica (Kikkert et al. 2005, Zottini et al. 2008). I metodi di trasferimento genico più utilizzati per questa pianta sono: il metodo biolistico (*particle bombardment delivery system*) e la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. Il metodo biolistico prevede l'introduzione del DNA esogeno direttamente nel genoma delle cellule vegetali usando come vettore di trasporto delle particelle di metallo inerte come l'oro o il tungsteno. Queste particelle sono ricoperte dal costrutto genico contenente il gene di interesse, corredato di promotore e terminatore (Kikkert et al. 2005). Le particelle così rivestite vengono letteralmente sparate contro le cellule ad una velocità tale da far passare le particelle attraverso le pareti cellulari e rilasciare il DNA all'interno della cellula. Alcune cellule incorporeranno il DNA esogeno risultando così trasformate (Kikkert et al. 2005).

La tecnica con *A. tumefaciens* è tra i metodi più usati per la trasformazione di numerose specie vegetali (Lessard et al. 2002). *A. tumefaciens* è un batterio gram-negativo responsabile del tumore del colletto delle piante. Durante l'infezione, l'*A. tumefaciens* trasferisce una regione del proprio DNA all'interno del genoma nucleare della pianta. Questa porzione di DNA, denominata T-DNA, fa parte del plasmide Ti (*Tumor inducing*) ed è fiancheggiata da due sequenze di circa 25 paia di basi, *right border* (RB) e *left border* (LB), oltre che da geni codificanti per enzimi coinvolti nella divisione delle cellule vegetali e nella produzione delle opine, aminoacidi usati dal batterio come fonte primaria di azoto e carbonio. Il T-DNA inoltre contiene geni coinvolti nella produzione di ormoni (come citochinine) da parte della pianta per la divisione cellulare e la formazione del tumore (Lessard et al. 2002). La capacità di *A. tumefaciens* di trasferire all'interno del genoma vegetale una specifica porzione del suo genoma, ha spinto i ricercatori ad ingegnerizzare il T-DNA disarmandolo, cioè sostituendo i geni coinvolti nell'infezione con un sito multiplo di clonaggio, in modo da potervi inserire geni esogeni o costrutti di interesse. Le notevoli dimensioni del plasmide Ti (200 Kb) ne impediscono un'agevole manipolazione ed è stato quindi creato un sistema di vettori binari (Lessard et al. 2002). Questa tecnica prevede la presenza nel batterio di due vettori: uno contenente il T-DNA disarmato e i geni *vir*, responsabili dell'infezione e necessari per il trasferimento, l'altro contenente le sequenze LB ed RB, il gene di interesse e un'origine di replicazione riconosciuta sia in *E. coli* che in *A. tumefaciens*. Per eseguire la trasformazione

occorre creare un costrutto contenente una regione promotrice, il gene di interesse e una regione terminatrice. All'interno del costrutto si inserisce normalmente anche un gene di resistenza ad un antibiotico, per la successiva selezione della progenie trasformata, su terreno contenente antibiotico.

1.6.1.1 Silenziamento genico mediante *RNA interference*

Il silenziamento genico è un processo di controllo post-trascrizionale dell'espressione genica conservato in animali, funghi e piante. Le piante hanno sviluppato il silenziamento come sistema di difesa contro virus (Vance and Vaucheret 2001). Nel 1990, il gruppo di ricerca di Jorgensen, nel tentativo di aumentare l'attività del gene della calcione sintasi (un enzima coinvolto nella produzione di specifici pigmenti), introdusse dei transgeni in petunia. Inaspettatamente la pigmentazione non aumentò, anzi si ebbe una variazione del colore e, in alcuni casi, la totale perdita di colore (Napoli et al. 1990). Questo fenomeno fu definito "co-soppressione", intendendo la soppressione sia del gene introdotto sia di quello endogeno. In seguito, la "co-soppressione" venne ricondotta al PTGS (*post transcriptional gene silencing*) poiché il risultato era la degradazione dell'RNA trascritto. Un fenomeno molto simile, denominato *quelling* (repressione), è stato osservato anche nei funghi (Romano and Macino, 1992). Nel 1998, Fire et al. catalogarono questi fenomeni sotto un principio comune: *RNA interference* (RNAi).

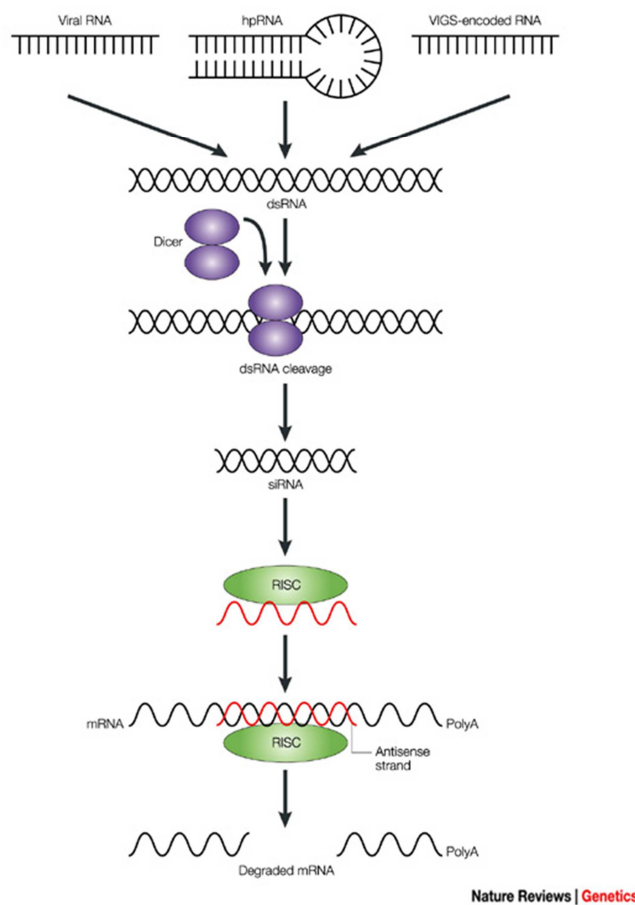


Figura 1.19: Modello del silenziamento genico in pianta mediante RNAi. (Waterhouse and Helliwell 2003)

L'intero processo dell'RNAi può essere diviso in tre fasi (Figura 1.19):

1) FASE INIZIALE: le regioni di RNA doppio filamento (*double strand RNA*, dsRNA) immessi nella cellula (in maniera diretta, attraverso transgene o virus) vengono digeriti in piccoli frammenti di dsRNA, chiamati siRNA (*small interfering RNAs*), lunghi da 21 a 23 paia di basi attraverso l'enzima Dicer (una ribonucleasi). Questo enzima fa parte della famiglia delle RNasi III (specifiche ribonucleasi-dsRNA) e taglia i dsRNA attraverso una reazione ATP-dipendente. Dicer presenta un dominio di legame dell'RNA denominato PAZ ad un'estremità e due domini RNasi III all'estremità opposta. Dicer riconosce le estremità del dsRNA con il suo dominio PAZ e successivamente procede al taglio con i suoi domini nucleasici.

2) FASE EFFETTRICE: i duplex siRNA si legano ad un complesso multiproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*). Dopo tale legame, i siRNA vanno incontro ad una denaturazione a singolo filamento, necessaria per l'attivazione del complesso RISC. Il complesso così attivato, usando come stampo il singolo filamento incorporato, riconosce e taglia filamenti di mRNA complementari allo stesso.

3) FASE DI AMPLIFICAZIONE: l'elevata efficacia di silenziamento è stata attribuita ad un processo di amplificazione del segnale di silenziamento. I siRNA complementari possono funzionare da *primer* per una RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRp) che trasforma l'mRNA in dsRNA che viene processato da Dicer in siRNA secondari. Un siRNA secondario viene incorporato in RISC che, dopo aver trovato un mRNA omologo, procede con il taglio causando la degradazione del messaggero. Questo meccanismo prende il nome di *Transitive RNA silencing* (Horiguchi 2004, Sato 2005).

Il silenziamento è un fenomeno sistemico. In molti organismi (piante e nematodi) si è osservata la capacità di diffusione del segnale di silenziamento genico dalle cellule da cui è scaturito ad altre cellule più distanti (Kalantidis et al. 2008).

Strategie per indurre il silenziamento

Il meccanismo dell'RNAi è oggi usato in molte applicazioni al fine di ottenere il silenziamento di specifici geni per studi di genomica funzionale. Prima della messa a punto di tecniche in grado di sfruttare il fenomeno dell'RNAi mediato da dsRNA, il sistema più frequentemente usato per generare PTGS in piante era la produzione di RNA antisense tramite l'espressione di un transgene. I costrutti antisense consistono di una sequenza complementare all'mRNA bersaglio, sotto il controllo di un promotore forte e costitutivo. L'appaiamento del filamento antisense con l'mRNA endogeno ne blocca la traduzione e lo rende bersaglio di RNasi specifiche. Negli esperimenti con RNA antisense, in genere, si ha però una bassa efficienza di silenziamento (Smith et al. 2000).

Un ulteriore miglioramento della tecnologia di silenziamento, mediante siRNA, fu apportato dall'utilizzo degli ihpRNAs (*intron-containing hairpin RNAs*). Si tratta di un costrutto contenente entrambe le sequenze ripetute e invertite a formare una struttura a forcina, ma la differenza sta nella presenza di uno spaziatore (un introne). A questo proposito sono stati creati vettori plasmidici per il clonaggio di ihpRNA in batteri già ingegnerizzati e contenenti una regione intronica. Ai lati di questo introne sono presenti i siti di restrizione specifici e diversificati che permettono l'inserimento di prodotti di amplificazione, quali il filamento senso e quello antisense che appaiandosi genereranno il dsRNA funzionale all'RNAi (Figura 1.20). I più noti plasmidi ingegnerizzati con ihpRNA sono pK7GWIWG2(II), pK7GWIWG2D(II) (www.psb.ugent.be; Karimi et al.2002).

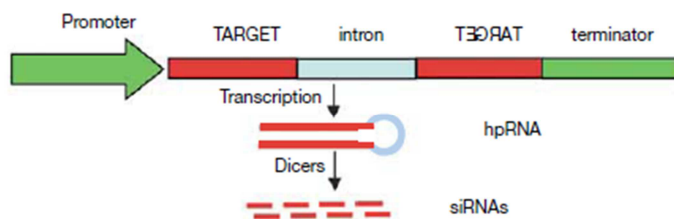


Figura 1.20: Struttura del costrutto per RNAi.
(Fusaro et al. 2006)

Anche i virus hanno un'elevata capacità di indurre il silenziamento. La maggior parte dei virus delle piante possiedono un genoma a ssRNA il quale viene rilasciato all'esterno del rivestimento proteico delle particelle virali per andare ad insediarsi all'interno della cellula ospite e replicarsi attraverso una RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRP) codificata dal virus stesso. Tale replicazione genera filamenti senso ed antisenso dello stesso template i quali hanno la potenzialità di ibridarsi a formare dsRNA. Questa loro caratteristica naturale è stata sfruttata dai biologi molecolari per silenziare geni nelle piante mediante la VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*). Diversi vettori sono stati impiegati in VIGS e tra i più frequentemente utilizzati ci sono *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Potato virus X* (PVX). La metodica VIGS presenta dei vantaggi rispetto agli altri metodi di silenziamento genico per lo studio funzionale del gene, tra cui la rapidità, la facilità e il basso costo nell'ottenere piante silenziate (Unver and Budak 2009, Senthil-Kumar and Mysore 2011). La trasformazione è transiente quindi non è necessario la trasformazione stabile della pianta. Tuttavia, la perdita di funzione del gene mediante VIGS non è mai completa, generalmente la riduzione di espressione del gene è intorno al 75-90% (Unver and Budak 2009). Sfortunatamente, anche un basso livello di espressione genica può essere sufficiente per produrre una proteina funzionale. La tecnica VIGS non può essere usata in alcune specie vegetali per la mancanza di vettori virali appropriati (Senthil-Kumar and Mysore 2011). Inoltre, la presenza del vettore virale può interferire con il metabolismo della pianta determinando sintomi che rendono difficoltosa l'interpretazione dei risultati (Senthil-Kumar and Mysore 2011).

1.6.2 Meccanismi cellulari e microdissezione laser

Gli organi delle piante sono strutture costituite da diversi tessuti con distinti tipi di cellule. Ciascuna cellula ha una funzione precisa definita dal proprio trascrittoma, metaboloma e proteoma (Day et al. 2005). Gli approcci di analisi tradizionali, che utilizzano gli organi interi, possono mascherare le differenze cellule-specifiche nell'espressione genica, nel livello di proteine e metaboliti. Per questo motivo, per comprendere al meglio il contributo di cellule individuali nella biologia dell'organismo, sono state sviluppate diverse tecniche per l'isolamento di specifiche cellule da piante. Queste includono l'uso di microcapillari, *fluorescence-activated sorting* (FACS) e la microdissezione laser (*laser microdissection*, LMD). L'uso di microcapillari ha permesso di isolare cellule superficiali, come per esempio cellule dell'epidermide o cellule di guardia (Karrer et al. 1995), oppure cellule del mesofillo (Brandt et al. 1999) e cellule del floema (Raps et al. 2001) grazie all'espressione di un marcatore come la *green fluorescent protein* (GFP) sotto il controllo di un promotore tessuto-specifico. Tuttavia, lo svantaggio di questa tecnica consiste nella scarsa quantità di materiale raccolto e nella limitata disponibilità di promotori tessuto-specifici (Schnable et al. 2004, Galbraith and Birnbaum 2006). La metodologia FACS si basa sulla separazione dei protoplasti, ossia cellule vegetali prive della parete cellulare, mediante l'uso

di un citofluorimetro (Galbraith and Birnbaum 2006). Le cellule possono essere separate in base alle dimensioni, al contenuto di clorofilla oppure per la presenza di un marcatore, come la GFP (Schnable et al. 2004). Tuttavia, i protoplasti possono avere caratteristiche e processi cellulari ben diversi da quelli attivati nelle cellule di un tessuto intatto e possono avere un'espressione genica alterata dalla manipolazione richiesta per la preparazione degli stessi (Galbraith and Birnbaum 2006). Recentemente la tecnica FACS è stata applicata in *A. thaliana* per studiare la risposta nelle cellule infettate dal patogeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Coker et al. 2015).

La microdissezione laser permette di isolare in maniera precisa cellule singole o gruppi di cellule da un tessuto eterogeneo in modo da poter essere utilizzati per l'estrazione di RNA, DNA e proteine (Emmert-Buck et al. 1996) senza la necessità di usare dei marcatori. Lo strumento per la microdissezione laser è costituito da un microscopio che permette la visualizzazione del campione accoppiato ad un laser che permette il taglio della porzione di tessuto di interesse (Balestrini et al. 2009). Il laser ad UV ha una lunghezza d'onda (337-340 nm) leggermente più alta del picco di assorbimento delle proteine e degli acidi nucleici, evitandone il danneggiamento. I campioni sono adagiati su vetrini che presentano una speciale membrana di *polyphenylene sulfide* (PPS) o di *polyethylene naphthalate* (PEN) e, in seguito al taglio, le sezioni cadono per gravità all'interno dei tubi posti in un apposito alloggiamento posizionato sotto il vetrino (Day et al. 2005) (Figura 1.21).

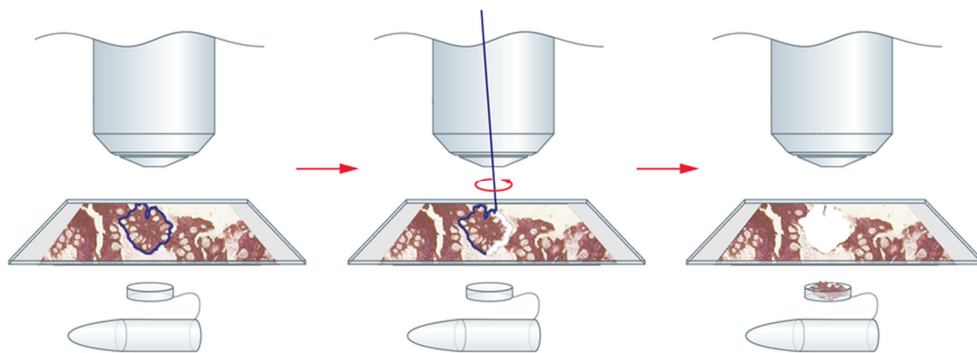


Figura 1.21: Schema rappresentativo del processo di microdissezione laser.

La selezione della regione di interesse avviene mediante l'ausilio di un software (immagine a sinistra). Il laser ad UV viene usato per tagliare la regione di interesse (immagine al centro). La sezione cade per gravità all'interno di un tubino posto sotto il vetrino (immagine a destra) (<http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/life-science-research/laser-microdissection/>).

Un importante prerequisito per la maggior parte delle applicazioni della microdissezione laser è la capacità di ottenere buoni preparati istologici dei tessuti, che consentono l'identificazione della regione di interesse mantenendo acidi nucleici e proteine in buono stato per la successiva estrazione. La preparazione del campione per la microdissezione laser è quindi la fase più importante del processo di microdissezione (Day et al. 2005). Occorre dunque un bilanciamento tra la preservazione della morfologia del campione e il massimo recupero degli acidi nucleici o proteine dalle cellule isolate. Non esiste un protocollo utilizzabile per tutti i tessuti vegetali ed è quindi necessaria l'ottimizzazione del protocollo in base al tessuto di partenza (Nelson et al. 2006). Generalmente la preparazione richiede la fissazione del campione e l'inclusione in paraffina (Balestrini and Bonfante 2008). La fissazione ha lo scopo di bloccare il campione in un momento preciso e preservare l'integrità del campione. I metodi di fissazione possono essere chimici o fisici. Esistono diversi tipi di fissativi chimici, che possono essere divisi in due categorie: fissativi *cross-linking* (glutaraldeide, formaldeide) che danno dettagli istologici superiori ma comportano una scarsa resa di acidi nucleici e proteine; e fissativi precipitanti (etanolo,

metanolo, acido acetico, acetone) che permettono dettagli istologici buoni mantenendo un recupero delle macromolecole discreto (Kerk et al. 2003). I metodi fisici includono il congelamento rapido (criofissazione). Sfortunatamente, se si usano campioni vegetali il congelamento porta svantaggi a livello dell'aspetto istologico del campione a causa della formazione di cristalli di ghiaccio nei vacuoli e negli spazi tra le cellule che possono modificare la morfologia (Nelson et al. 2006). L'inclusione in paraffina è un'alternativa al congelamento che permette di mantenere una buona istologia del campione, ma il processo è molto laborioso e lungo (Day et al. 2006, Balestrini and Bonfante 2008).

La tecnica della microdissezione laser è stata usata ampiamente in campo medico. Tuttavia, negli ultimi anni numerosi studi hanno impiegato la microdissezione laser anche ai tessuti vegetali. La microdissezione laser è stata usata con successo per studiare la regolazione trascrizionale della cellula della pianta durante l'interazione con microrganismi, quali, ad esempio, batteri azoto-fissatori (Damiani et al. 2012, Roux et al. 2014), funghi patogeni (Tang et al. 2006, Hacquard et al. 2010, Klug et al. 2015), tra cui l'oidio (Chandran et al. 2010), micorrize arbuscolari (Balestrini et al. 2007, Fiorilli et al. 2009, Gaude et al. 2012) ed ectomicorrize (Hacquard et al. 2013).

2 SCOPO

L'obiettivo generale di questo progetto di dottorato è stato quello di comprendere i meccanismi cellulari della vite attivati in risposta all'infezione di due importanti malattie, quali la peronospora e l'oidio. Queste malattie sono controllate dall'uso frequente di fungicidi chimici che, oltre ad avere un elevato costo economico per il produttore, possono avere effetti nocivi sull'uomo e sull'ambiente. L'obiettivo finale è stato quello di identificare i processi cellulari e i geni chiave coinvolti nei meccanismi di difesa e suscettibilità della vite per in seguito sviluppare metodi sostenibili per il controllo di queste due gravi malattie, come l'ottenimento di varietà resistenti attraverso programmi mirati di miglioramento genetico.

Gli obiettivi specifici del progetto di dottorato hanno riguardato:

- l'ottimizzazione del protocollo per la microdissezione laser di foglie di vite per l'analisi dell'espressione genica nel sito di infezione della peronospora (gli stomi), nelle regioni circostanti gli stomi e nei tessuti distali non infetti dal patogeno;
- l'analisi dell'espressione dei geni legati alla risposta della vite all'infezione della peronospora per identificare le diverse regolazioni trascrizionali attivate localmente nei siti di infezione e nell'intera foglia;
- lo sviluppo di piante con una ridotta suscettibilità ad oidio mediante il silenziamento di geni putativamente coinvolti nella suscettibilità della vite (geni *MLO*);
- l'identificazione delle isoforme di *MLO* responsabili dei processi di suscettibilità della vite all'oidio e la comprensione del meccanismo di resistenza mediante analisi molecolari e istologiche.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita

Gli esperimenti di questo progetto di tesi sono stati realizzati in collaborazione con il Dott. Michele Perazzolli presso il Dipartimento Agroecosistemi Sostenibili e Biorisorse della Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (Trento). Per gli esperimenti di inoculo con *Plasmopara viticola* per le analisi mediante microdissezione laser sono state usate piante di *Vitis vinifera cultivar* Pinot Noir clone ENTAV115 (Figura 3.1). Le piante sono state fatte crescere *in vitro* in tubi da 75 mL (SciLabware Limited) contenenti 20 mL di terreno Murashige and Skoog (MS) (metà dose) a pH $5,5 \pm 0,1$ con $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ (w/v) tiamina, 100 mg L^{-1} (w/v) mioinositolo, 30 g L^{-1} (w/v) saccarosio e 6 g L^{-1} (w/v) agar. Le piante sono state incubate in cella climatica a $23 \pm 0,1$ °C e 16 ore di luce per 2 mesi per favorirne la crescita.



Figura 3.1: Piante di vite *cultivar* Pinot Noir ENTAV115 cresciute *in vitro* per 2 mesi.

Per la trasformazione genetica della vite per il silenziamento dei geni *MLO* sono stati usati calli embriogenici di *Vitis vinifera cultivar* Brachetto a Grappolo lungo (Figura 3.2). I calli sono stati precedentemente generati per embriogenesi somatica da colture di antere immature come descritto in Martinelli et al. (2001) e mantenuti a 26°C al buio fino al loro utilizzo. La *cultivar* Brachetto a Grappolo lungo è stata scelta in quanto possiede una buona efficienza di induzione dell'embriogenesi somatica ed una maggiore capacità di rigenerazione delle piante trasformate rispetto ad altre *cultivar* di vite (Martinelli et al. 2001).



Figura 3.2: Calli embriogenetici di *Vitis vinifera cultivar* Brachetto a Grappolo lungo.

3.2 Trasformazione genetica della vite

3.2.1 Clonaggio e preparazione dei costrutti

Il clonaggio e la preparazione dei costrutti per la trasformazione genetica della vite per silenziare i geni *MLO* è stata effettuata in collaborazione con la Dott.ssa Simona Urso e il Dott. Giampiero Valè del Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'Economia agraria (CRAE) di Fiorenzuola d'Arda (Piacenza), seguendo il protocollo descritto in Urso et al. (2013). In particolare, sono stati amplificati frammenti di 300-600 paia di basi (bp) dei geni *MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13* di vite tramite PCR utilizzando i primer riportati in Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Primer usati per il clonaggio dei geni *MLO*.

Le basi sottolineate nel primer *forward* sono necessarie per l'inserimento del frammento nel vettore pENTR/SD/D-TOPO.

Gene	Genoscope ID	Primer Forward	Primer Reverse	Lunghezza dell'amplicone (bp)
<i>MLO-6</i>	GSVIVT00024506001	<u>CAC</u> CTGCTTACAGTATTACAAACTCCC	TTTCCTTGCATACCTAAAC	327
<i>MLO-7</i>	GSVIVT00018219001	<u>CACCGACA</u> ATTTTAAACGAGAGAGT	ATCTCATGTTGGGTTCGGATT	369
<i>MLO-11</i>	GSVIVT00023170001	<u>CACCTCACTT</u> ATGCTACTGGGGTT	ATCAACTTTGGGAAGTATCTGAC	504
<i>MLO-13</i>	GSVIVT00024507001	<u>CACCGAGCTA</u> ATGTTGCTAGGGTT	AAATTTGCATGGCTTGTAG	627

Il prodotto di PCR una volta purificato è stato inserito all'interno del vettore pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen) (Figura 3.3). I frammenti genici inseriti nel vettore pENTR/SD/D-TOPO sono stati sequenziati per verificarne la corretta sequenza. Il frammento genico clonato è stato quindi inserito mediante ricombinazione nel vettore pK7GWIWG2D (II) (<http://www.psb.ugent.be/>) (Figura 3.4 B). Questo vettore binario è basato sul sistema Gateway che permette con un unico processo di ricombinazione l'inserimento del frammento in orientamento senso ed antisense sotto il promotore costitutivo del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV) 35S e un terminatore (Karimi et al. 2002). Il vettore "vuoto" pK2GW7 (Figura 3.4 A) è stato usato come controllo nel processo di trasformazione (Tabella 3.2).

Il costrutto finale è stato ulteriormente verificato tramite sequenziamento in entrambe le direzioni. I vettori di trasformazione pK7GWIWG2D (II) e pK2GW7 sono stati introdotti per elettroporazione in cellule competenti di *Agrobacterium tumefaciens* ceppo GV3101 come descritto in Zottini et al. (2008).

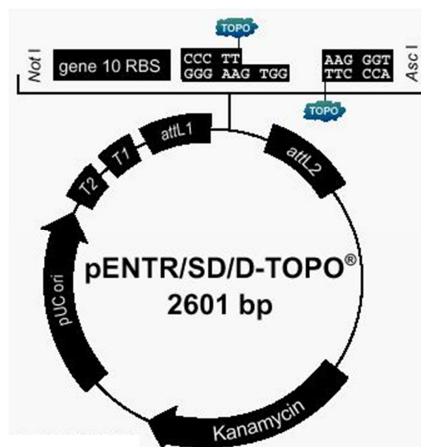


Figura 3.3: Vettore pENTR/SD/D-TOPO.

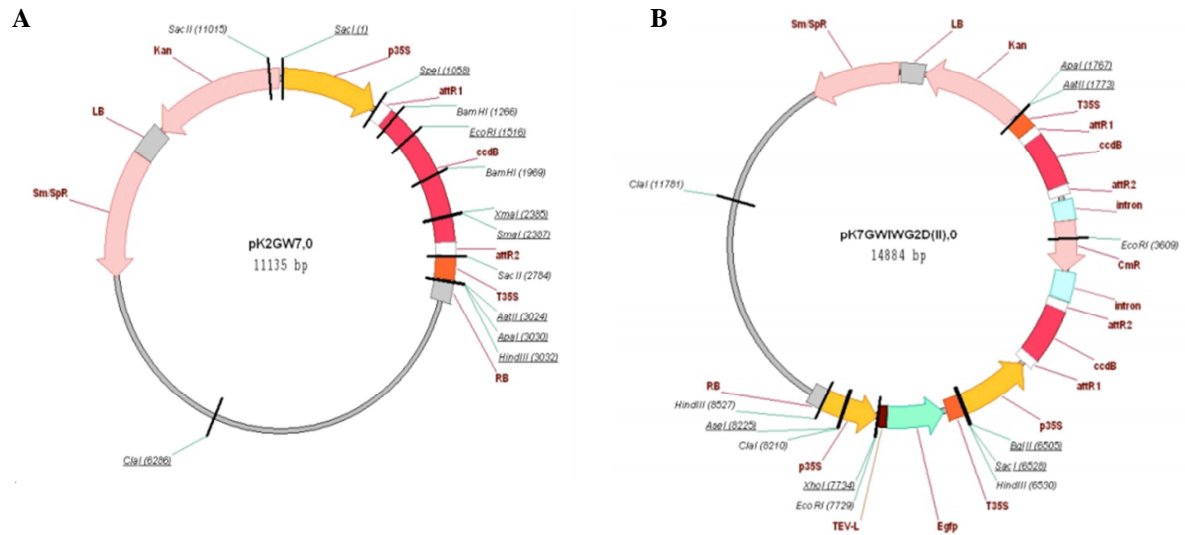


Figura 3.4: Vettore usato (A) per la trasformazione di piante controllo e (B) per il silenziamento dei geni *MLO* di vite. (Karimi et al. 2002)

Tabella 3.2: Costrutti usati per la trasformazione genetica della vite.

Costrutto	Vettore	Inserto	Funzione attesa
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-6</i>	pK7GWIWG2D(II)	<i>MLO-6</i>	Silenziamento di <i>MLO-6</i>
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-7</i>	pK7GWIWG2D(II)	<i>MLO-7</i>	Silenziamento di <i>MLO-7</i>
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-11</i>	pK7GWIWG2D(II)	<i>MLO-11</i>	Silenziamento di <i>MLO-11</i>
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-13</i>	pK7GWIWG2D(II)	<i>MLO-13</i>	Silenziamento di <i>MLO-13</i>
pK2WG7	pK2WG7	/	Controllo

3.2.2 Trasformazione genetica della vite ed acclimatazione delle piante trasformate

La trasformazione delle piante di vite è stata condotta seguendo il protocollo descritto in Dalla Costa et al. (2014) in collaborazione con Dott.ssa Lorenza Dalla Costa e Dott. Mickael Malnoy (presso l'Unità Genomica e Biologia Avanzata della Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige, Trento). Brevemente, i calli embrionici sono stati messi in contatto per 48 ore con *A. tumefaciens* contenente i costrutti di trasformazione. Trascorso questo tempo è stato eliminato *A. tumefaciens* mediante lavaggio con terreno GS1CA liquido (Tabella 3.3) addizionato di 100 mg L⁻¹ di timentina. Il callo è stato mantenuto il primo mese su terreno GS1CA solido con 100 mg L⁻¹ di timentina a 25°C al buio. Nei mesi successivi il callo è stato trasferito periodicamente su terreno GS1CA fresco in presenza di 100 mg L⁻¹ kanamicina, 1000 mg L⁻¹ timentina per la selezione degli embrioni trasformati. Gli embrioni rigeneranti a stadio di torpedo sono stati trasferiti su terreno NN (Nitsch and Nitsch 1969) (Tabella 3.3) contenente 1 mg L⁻¹ di 6-benzilaminopurina, 0,1 mg L⁻¹ acido 3-indol butirrico e 25 mg L⁻¹ di kanamicina alla luce (fotoperiodo di 16 ore) per indurre la differenziazione e la germinazione. I nuovi germogli sono stati trasferiti su terreno WP (Woody Plant Medium; Tabella 3.3) e incubati nella camera di crescita a 22 ± 2°C con un fotoperiodo di 16 ore e con un'umidità relativa del 70 ± 5%. Le piante sviluppate *in vitro* con almeno 2 radici di circa 3 cm di lunghezza sono state trasferite in un contenitore di plastica di 250 mL contenente torba autoclavata (Tercomposti Spa, Brescia, Italia) e coperto con Parafilm per preservare l'umidità.

Ogni 7 giorni, sono state create piccole aperture sul parafilm per ridurre l'umidità e promuovere la formazione della cuticola fogliare. Dopo 3 settimane, il parafilm è stato rimosso. Trascorsa un'ulteriore settimana, le piante sono state trapiantate in vasi da 1 L contenente torba (Tercomposti Spa, Brescia, Italia) e poste ad acclimatare in serra a 25°C, con un fotoperiodo di 16 ore e un'umidità del $70 \pm 5\%$.

Tabella 3.3: Composizione dei terreni usati per la trasformazione e rigenerazione delle piante.

Terreno	Composizione	Utilizzo
GS1CA	NN macroelementi; MS microelementi; vitamine Gamborg; NN ferro; 6% saccarosio; 2 mg L ⁻¹ NOA; 2 mg L ⁻¹ IAA; 0,2 mg L ⁻¹ IBA; pH 6,2; 0,4% Phytigel; 0,25% carbone attivo.	Formazione degli embrioni
NN	NN microelementi; NN macroelementi; NN vitamine; NN ferro; 1,5% saccarosio; pH 6,2; 0,9% agar	Differenziazione degli embrioni e rigenerazione
WP	20 g L ⁻¹ saccarosio; pH 5,8; 2,5 g L ⁻¹ phytigel.	Micropropagazione delle piante

NN: Nitsch and Nitsch (1969); MS: Murashige and Skoog (1962); Gamborg: Gamborg et al. (1968); NOA: acido β -naftossiacetico; IAA: Acido indol-3-acetico; IBA: Acido indol-3-butirrico.

3.2.3 Selezione delle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*

3.2.3.1 Estrazione del DNA genomico

I campioni fogliari sono stati polverizzati con mortaio e pestello in azoto liquido. Per l'estrazione del DNA genomico è stato impiegato il kit Illustra Nucleon Phytopure kit (GE Healthcare, Life Science). Ad 1 g di tessuto macinato sono stati aggiunti 4,6 mL di Reagent 1 (GE Healthcare, Life Science). Il campione è stato leggermente agitato ed in seguito sono stati aggiunti 1,5 mL di Reagent 2 (GE Healthcare, Life Science). I tubi sono stati invertiti alcune volte e incubati a 65°C per 10 minuti. Successivamente i campioni sono stati incubati in ghiaccio per 20 minuti. Dopodiché, sono stati aggiunti 2 mL di cloroformio (a -20°C) e in seguito 200 μ L di Nucleon phytopure DNA extraction resin suspension (GE Healthcare, Life Science). I campioni sono stati posti in agitazione per 10 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a $1300 \times g$ per 10 minuti. La fase superiore contenente il DNA è stata trasferita in un tubo da 1,5 mL pulito, a cui è stato aggiunto un uguale volume di isopropanolo. Il campione è stato miscelato, centrifugato a $4000 \times g$ per 5 minuti e il surnatante è stato rimosso. Il *pellet* contenente il DNA è stato lavato con etanolo 70% freddo, centrifugato a $4000 \times g$ per 5 minuti. Dopo aver rimosso il surnatante, il DNA è stato lasciato asciugare per 10 minuti per rimuovere le tracce di etanolo. Il DNA è stato quindi risospeso in 50 μ L di acqua sterile.

3.2.3.2 Conferma dell'inserimento del costrutto tramite PCR

La presenza del costrutto nelle linee trasformate è stata verificata mediante amplificazione usando GoTaq Green MasterMix (Promega) utilizzando il primer *forward* disegnato sul promotore 35S (5'-CGACAATCCCCTATCCTT-3') e il primer *reverse* disegnato su ciascun gene *MLO* usato per il clonaggio (Tabella 3.1). Le reazioni di amplificazione sono state realizzate assemblando la miscela di reazione in 25 μ L finali come riportato in Tabella 3.4, utilizzando il termociclatore T-gradient (Biometra) secondo i cicli di amplificazione descritti nella Tabella 3.5.

Tabella 3.4: Miscela per la reazione di PCR.

Componente	Quantità da aggiungere
GoTaq Green Master Mix, 2×	12,5 μ L
Primer <i>Forward</i> (10 mM)	1 μ L
Primer <i>Reverse</i> (10 mM)	1 μ L
DNA	1 μ L
H ₂ O	9,5 μ L

Tabella 3.5: Schema dei cicli di amplificazione.

N° cicli	Temperatura	Tempo
1	95°C	2 minuti
35	95°C	30 secondi
	58°C	30 secondi
	72°C	45 secondi
1	72°C	5 minuti
	15°C	∞

3.3 Inoculo con *Plasmopara viticola*

3.3.1 Isolamento e propagazione dell'inoculo di *Plasmopara viticola*

L'inoculo di *P. viticola* utilizzato è stato isolato da piante infette nei vigneti nell'area di San Michele all'Adige (Trento). Gli sporangi di *P. viticola* sono stati raccolti mediante aspirazione utilizzando una pompa a vuoto con annesso un filtro, e sono stati conservati alla temperatura di -20°C. L'inoculo di *P. viticola* è stato propagato su piante suscettibili di *V. vinifera* cv. Pinot nero cresciute in serra a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo di 16 ore di luce e un'umidità relativa di $70 \pm 10\%$ come riportato da Perazzolli et al. (2011).

3.3.2 Inoculo con *Plasmopara viticola* di foglie di piante di vite cresciute *in vitro*

Le foglie di piante di vite cresciute *in vitro* sono state inoculate con una sospensione sterile di *P. viticola*. Per ottenere l'inoculo sterile, le foglie che mostravano i sintomi della peronospora ("macchie d'olio") in piante inoculate in serra sono state raccolte e sterilizzate mediante incubazione in una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% per 10 minuti mediante agitazione a 80 rivoluzioni per minuto (rpm) (Márquez et al. 2007). In seguito, sono stati effettuati 3 lavaggi con acqua sterile da 5 minuti ciascuno mediante leggera agitazione (80 rpm) per rimuovere l'ipoclorito. Le foglie così sterilizzate sono state trasferite con la pagina inferiore rivolta verso l'alto in piastre Petri (175 mm) sterili contenenti 3 fogli di carta assorbente sterile inumidita con 5 mL di H₂O sterile. Le piastre sono state incubate *overnight* al buio a temperatura ambiente per favorire la sporulazione della peronospora (Algarra Alarcon et al. 2015) (Figura 3.5). Il giorno seguente, le foglie che mostravano la sporulazione sono state trasferite in tubi sterili da 50 mL e sono stati aggiunti 5 mL di acqua distillata sterile (a 4°C). I tubi sono stati gentilmente agitati per permettere il distacco degli sporangi dalle foglie e ottenere quindi una soluzione di sporangi di *P. viticola*. La sospensione di sporangi di *P. viticola* è stata filtrata e la

concentrazione è stata aggiustata a 4×10^4 sporangi mL^{-1} dopo la conta al microscopio ottico mediante vetrino Thoma.



Figura 3.5: Foglie di vite sterilizzate che mostrano la sporulazione di *Plasmopara viticola*.

Le foglie di 12 piante cresciute *in vitro* sono state staccate e posizionate su piastre Petri sterili (92 mm) contenenti 25 mL di 0,7% agar in acqua (MicroAgar; Duchefa Biochemie). Le foglie sono state posizionate con la pagina inferiore verso l'alto, disponendo 2 o 3 foglie per ciascuna piastra. Cinque foglie sono state inoculate posizionando 6-8 gocce (di 2 μL ciascuna) della sospensione sterile di sporangi di *P. viticola* in condizioni sterili (inoculato-locale). Altre 3 foglie sono state inoculate esclusivamente nella metà sinistra della foglia rispetto alla nervatura principale, applicando 3-4 gocce della sospensione di sporangi in condizioni sterili. La metà della foglia non inoculata (inoculato-distale) è stata campionata allo scopo di studiare la risposta della vite in parti distali rispetto al sito di infezione del patogeno. Come controllo, la pagina inferiore di altre 6 foglie è stata trattata con 6-8 gocce di acqua sterile in condizioni sterili (controllo) (Figura 3.6). Le foglie sono state incubate *overnight* al buio a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ per permettere la penetrazione di *P. viticola* all'interno dei tessuti fogliari, in seguito sono state asciugate con carta sterile in condizioni sterili.

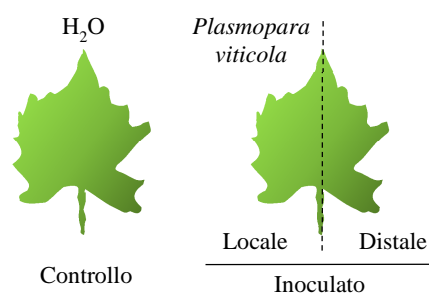


Figura 3.6: Immagine schematica dell'inoculo con *Plasmopara viticola* sulle foglie di piante di vite cresciute *in vitro*.

I campioni sono stati raccolti un giorno dopo (1 dpi, *day post inoculation*) l'inoculo con il patogeno. Ad 1 dpi si ha la formazione dell'ifa primaria e della vescicola sottostomatica del patogeno che indicano lo stabilirsi delle prime fasi dell'interazione ospite-patogeno (Unger et al. 2007, Godard et al. 2009). A questo stadio viene infatti

attivata la risposta della pianta con modulazione dei geni di difesa sia nei genotipi resistenti che suscettibili (Hamiduzzaman et al. 2005, Polesani et al. 2008, Trouvelot et al. 2008, Perazzolli et al. 2011, Perazzolli et al. 2012). Per ciascuna analisi sono state usate 5 repliche (ognuna composta da 6-8 foglie) e l'esperimento è stato ripetuto 2 volte. Per ciascuna replica sono state effettuate 4 diverse analisi (Tabella 3.6):

- (i) tre mezze foglie sono state campionate dal campione controllo e inoculato-locale, immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C per l'analisi dell'espressione genica sulla foglia intera. In questo lavoro questi campioni sono definiti come foglia intera fresca;
- (ii) tre mezze foglie sono state campionate dal campione controllo, inoculato-locale e inoculato-distale, sono state fissate (foglia intera fissata) e sottoposte a microdissezione laser;
- (iii) due mezze foglie sono state campionate dal campione controllo e inoculato-locale e sono state colorate con blu di anilina per valutare la percentuale di stomi infetti;
- (iv) due foglie sono state campionate dal campione controllo e inoculato-locale e sono state incubate per 7 giorni in cella climatica a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo di 16 ore per valutare lo sviluppo dei sintomi della peronospora.

Tabella 3.6: Schema riassuntivo del campionamento delle foglie *in vitro*.

Campione	Campionamento	Analisi
Controllo Inoculato-locale	1 dpi	Analisi dell'espressione genica su foglia intera fresca
Controllo Inoculato-locale Inoculato-distale	1 dpi	Fissazione e selezione di stomi e regioni circostanti Analisi dell'espressione genica su foglia intera fissata e microdissezioni di stomi e regioni circostanti .
Controllo Inoculato-locale	1 dpi	Analisi istologica e valutazione della percentuale di stomi infetti
Controllo Inoculato-locale	7 dpi	Valutazione dello sviluppo dei sintomi della peronospora

3.3.3 Inoculo con *Plasmopara viticola* di piante di vite cresciute in serra

La soluzione di inoculo è stata ottenuta da piante precedentemente inoculate e mantenute per una notte nella cella di inoculo a 25°C con $99 \pm 1\%$ di umidità relativa per permettere la produzione degli sporangi (Perazzolli et al. 2011). Le foglie che mostravano la sporulazione di *P. viticola* sulla pagina inferiore (Figura 3.7) sono state spennellate in acqua distillata a 4°C per permettere il distacco degli sporangi dalla foglia. La sospensione di sporangi è stata poi portata alla concentrazione di 1×10^5 sporangi mL^{-1} utilizzando il vetrino per il conteggio delle cellule (vetrino Thoma) per determinare la concentrazione degli sporangi. L'inoculo su piante cresciute in serra è stato eseguito con uno spruzzatore manuale a pressione, applicando la sospensione di inoculo in modo uniforme sulla pagine inferiori delle foglie (circa 20-30 mL per pianta). Le piante inoculate sono state incubate una notte in camera umida a $99 \pm 1\%$ di umidità relativa a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Le piante sono state poi mantenute in serra per 6 giorni, dopodiché sono state trasferite in cella di inoculo per una notte (99% umidità a 25°C) per favorire la sporulazione e valutare la severità della malattia.



Figura 3.7: Foglie di vite che mostrano la sporulazione di *Plasmopara viticola* sulla pagina inferiore.

3.3.4 Valutazione della severità della peronospora della vite

3.3.4.1 Valutazione viva della severità della peronospora della vite

I sintomi dell'infezione sono stati valutati osservando visivamente la sporulazione di *P. viticola*. Per ogni foglia è stato calcolato un valore di severità (da 0% a 100%) espresso come percentuale di superficie fogliare colpita dalla malattia rispetto alla superficie fogliare totale, in accordo con le guide *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO 2001).

3.3.4.2 Quantificazione della sporulazione di *Plasmopara viticola*

La severità della malattia di foglie inoculate *in vitro* è stata analizzata calcolando il numero di sporangi di *P. viticola* per grammo di peso fresco della foglia. I campioni fogliari per ciascuna replica sono stati pesati e trasferiti in tubi sterili da 50 mL ai quali è stato aggiunto 1 mL di acqua distillata sterile. I tubi sono stati agitati a 70 rpm per 2 minuti per favorire il distacco degli sporangi. La concentrazione di sporangi per mL è stata determinata tramite conta al microscopio con vetrino Thoma. La concentrazione di sporangi per mL di sospensione è stata successivamente convertita a numero di sporangi per grammo di peso fresco delle foglie.

3.4 Inoculo con *Erysiphe necator*

3.4.1 Preparazione dell'inoculo di *Erysiphe necator*

Il ceppo di *Erysiphe necator* utilizzato negli esperimenti è stato isolato nei vigneti di San Michele all'Adige (Trentino). L'inoculo di *E. necator* è stato poi propagato su piante suscettibili di *V. vinifera* cv. Pinot nero cresciute in serra e mantenute a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo di 16 ore di luce e un'umidità relativa di $70 \pm 10\%$ come descritto da Nesler et al. (2015).

3.4.2 Inoculo con *Erysiphe necator* di piante di vite cresciute in serra

Per l'inoculo dell'oidio, la pagina superiore delle foglie (la terza e la quarta partendo dall'apice della pianta) che presentavano una fresca sporulazione (Figura 3.8) è stata strofinata sulle foglie delle piante da inoculare come descritto da Hoffmann et al. (2008). Le piante inoculate sono state incubate per 6 ore a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e con umidità relativa di 100% per favorire la penetrazione del fungo, e poi sono state mantenute a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con umidità relativa di $70 \pm 10\%$ fino alla valutazione dei sintomi. I campioni fogliari delle piante inoculate sono stati raccolti prima (0 dpi), a un giorno (1 dpi) e dieci giorni (10 dpi) dopo l'inoculo con il patogeno. A ciascun tempo sono state campionate 5 piante (repliche biologiche) e ciascun campione è stato ottenuto raccogliendo tre mezzefoglie (a partire dal quarto nodo dall'apice del germoglio) da ciascuna pianta. Per ciascun esperimento sono state usate dalle 5 alle 9 piante e l'esperimento è stato ripetuto 2 volte. Le foglie campionate sono state immediatamente congelate in azoto liquido e poi conservate a -80°C .



Figura 3.8: Foglie di vite che mostrano sporulazione di *Erysiphe necator* sulla pagina superiore.

3.4.3 Valutazione della severità dell'oidio della vite

3.4.3.1 Valutazione visiva della severità dell'oidio della vite

La severità della malattia è stata valutata osservando visivamente la sporulazione del fungo *E. necator* a 14, 22 e 30 dpi. Per ogni foglia è stato calcolato un valore di severità (da 0% a 100%) espresso come percentuale di superficie fogliare colpita dalla malattia rispetto alla superficie fogliare totale in accordo con le guide *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO 1988). La severità della malattia è stata riportata anche come AUDPC (*Area under disease progress curve*) che permette di dare una rappresentazione quantitativa

del grado di infezione della malattia considerando i tre tempi di analisi in modo unificato. La formula per l'AUDPC è stata calcolata con la formula riportata da Jeger and Viljanen-Rollinson (2001):

$$\text{AUDPC} = \sum[(X_i + X_{i+1})/2] \times (t_{i+1} - t_i)$$

X_i : severità della malattia al momento della valutazione i ;

X_{i+1} : severità della malattia al momento della valutazione $i+1$ (cioè il successivo rispetto ad i);

$t_{i+1} - t_i$: periodo che intercorre tra le due valutazioni

La riduzione della malattia è stata calcolata come: (severità della malattia nella linea controllo EVB - severità della malattia nella linea trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*) / severità della malattia nella linea controllo EVB, ed espressa come percentuale.

3.4.3.2 Quantificazione dei conidi di *Erysiphe necator*

La severità della malattia è stata valutata calcolando il numero di conidi di *E. necator* prodotti sulle foglie infettate per cm² di superficie fogliare. Per questa misurazione, sono state raccolte 3 foglie da ciascuna pianta a 30 dpi e da ciascuna foglia sono stati preparati 4 dischi di diametro 0,8 cm con un punteruolo cavo, per un totale di 12 dischetti per replica, come descritto in Angeli et al. (2012). I dischi fogliari sono stati trasferiti in un tubo da 50 mL contenente 5 mL di acqua distillata sterile addizionata di 0,01% di Tween80 (Sigma-Aldrich). I tubi sono stati agitati gentilmente (70 rpm) per 1 minuto ed è stata determinata la concentrazione di conidi per mL di sospensione tramite conta al microscopio con vetrino Thoma. Il valore è stato successivamente convertito in conidi per cm quadrato (cm²) di foglia.

3.5 Microdissezione laser di foglie di piante vite cresciute *in vitro*

3.5.1 Fissazione del campione fogliare

Tre mezze foglie del campione trattato con acqua (controllo), dell'area inocolata (inoculato-locale) e dall'area non inocolata (inoculato-distale) di foglie inoculate con *P. viticola* (Paragrafo 3.3.2) sono stati tagliati in piccoli pezzi di circa 0,5 cm² mediante un bisturi sterile aggiungendo 5 mL di soluzione di fissazione fredda (0°C). Sono stati analizzati 2 tipi di fissativi: etanolo-acido acetico (3:1) e acetone 100%. I campioni sono stati trasferiti immediatamente in una siringa di plastica da 20 mL (Artsana S.p.a) contenente 3 mL di soluzione di fissazione preraffreddata (0°C). Per favorire la penetrazione del fissativo all'interno del tessuto è stato applicato il vuoto per 3 volte e immediatamente rilasciato come descritto in Vitha and Osteryoung (2011). I campioni sono stati in seguito trasferiti in un tubo da 50 mL contenente 20 mL di soluzione di fissazione, incubati in ghiaccio per 10 minuti e posti in agitazione (20 rpm) a 4°C *overnight*. I campioni fissati sono stati conservati nella soluzione di fissazione a -20°C per un massimo di 14 giorni prima della microdissezione laser.

3.5.2 Selezione delle regioni di interesse mediante microdissezione laser

La soluzione di fissazione è stata rimossa per decantazione e i campioni fissati sono stati lavati in 10 mL di tampone PBS (*Phosphate Buffered Saline*: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3 in acqua *RNase-free*). I campioni lavati sono stati posizionati su vetrini PEN (Leica Microsystems) con la pagina inferiore verso l'alto e asciugati a temperatura ambiente. La microdissezione laser degli stomi e delle regioni circostanti agli stomi (Figura 4.8) è stata effettuata con il microscopio LMD7000 (Leica Microsystems) usando l'obiettivo 40× e settando i parametri del laser come segue: potenza di 48 mW, apertura 1 e velocità 5 ms. Con la microdissezione laser sono stati raccolti gli stomi e le regioni circostanti dal campione controllo e inoculato-locale, mentre dal campione inoculato-distale sono stati isolati esclusivamente gli stomi. Le microdissezioni sono state raccolte in tappini di tubi *RNase free* da 0,5 mL contenenti 30 µL di soluzione di estrazione (PicoPure RNA Isolation kit; Arcturus) posizionati nell'apposito contenitore posizionato sotto il vetrino. In esperimenti preliminari, è stato raccolto un numero crescente di stomi (1, 10, 50, 100, 300 e 500) e campioni con almeno 300 stomi, corrispondente ad un'area maggiore di 0,7 mm², hanno mostrato una buona qualità e quantità di RNA estratto. Ciascuna replica è stata raccolta in due tubi da PCR (con 150 microdissezioni ciascuno) entro un'ora e mezza dall'inizio del taglio con il laser, per evitare la degradazione dell'RNA e il riscaldamento del campione dovuto alla lampada del microscopio.

Dopo la microdissezione laser, i tubi sono stati chiusi e centrifugati a 3000 × g per 1 minuto per raccogliere le cellule. Per trasferire tutto il materiale all'interno del tubo, sono stati aggiunti 20 µL di soluzione di lisi nel tappo e si è centrifugato a 3000 × g per un altro minuto. I campioni sono stati incubati per 30 minuti a 42°C per favorire la lisi delle cellule e successivamente centrifugati per 2 minuti a 800 × g. In seguito sono stati conservati a -80°C per poi procedere con l'estrazione dell'RNA.

I campioni fogliari rimasti sul vetrino sono stati raschiati con una spatola e raccolti in un tubo *RNase-free* da 2 mL (foglia intera fissata). I campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino all'estrazione dell'RNA.

3.6 Estrazione dell'RNA totale e sintesi del cDNA

3.6.1 Estrazione dell'RNA totale da foglie intere fresche di vite e trattamento con DNasi

I campioni fogliari degli esperimenti in serra sono stati polverizzati con mortaio e pestello in azoto liquido. I campioni di foglie di piante cresciute *in vitro* sono stati invece omogeneizzati con un vibromulino (Retsh Technology GmbH) per 30 secondi con frequenza di 25Hz, aggiungendo una biglia di vetro per ciascun tubo da 2 mL, e l'operazione è stata ripetuta 2 volte.

Per l'estrazione dell'RNA dalle foglie intere fresche è stato impiegato il kit Spectrum Plant total RNA (Sigma-Aldrich). Dai 50 mg agli 80 mg di polvere di tessuto macinato sono stati trasferiti in un tubo da 2 mL mantenendo il campione congelato, sono stati quindi aggiunti 550 µL di soluzione di lisi (Lysis Solution) contenente 1% di β-mercaptoetanololo. Il campione è stato agitato vigorosamente per 30 secondi e incubato a 56°C per 5 minuti. In questa fase il β-mercaptoetanololo riduce i ponti disolfuro presenti nelle proteine e l'alta temperatura favorisce la rottura delle membrane e l'estrazione dell'RNA. I campioni sono stati successivamente centrifugati alla massima velocità a temperatura ambiente per permettere la formazione del *pellet* costituito dalle

parti grossolane delle cellule delle foglie. Dopodiché 700 µL di surnatante di ogni campione sono stati trasferiti nella colonna di filtrazione (Sigma-Aldrich) posizionata in un tubo da 2 mL. Dopo centrifugazione a $12000 \times g$ per 1 minuto a 4°C, sono stati aggiunti 600 µL di soluzione di legame (Binding Solution, Sigma-Aldrich). Dopo delicata agitazione, 650 µL della miscela è stata trasferita nella colonna di legame (Sigma-Aldrich) e dopo centrifugazione per 1 minuto a $12000 \times g$ a 4°C il filtrato è stato eliminato. La colonna contenente l'RNA è stata lavata una volta con 700 µL di soluzione di lavaggio 1 (Wash Solution 1, Sigma-Aldrich) e 2 volte utilizzando la soluzione di lavaggio 2 (Wash Solution 2 Sigma, contenente 70% etanolo) centrifugando ad ogni passaggio a $12000 \times g$ per 1 minuto a 4°C. La seconda soluzione di lavaggio ha un maggior contenuto di etanolo e permette di rimuovere le impurità e i sali rimasti sulla colonna di legame nei precedenti lavaggi, di mantenere l'RNA legato alla membrana e facilitare la successiva fase di asciugatura. Il campione è stato centrifugato per 2 minuti alla massima velocità per asciugare la membrana. La colonna è stata quindi trasferita in un tubo da 1,5 mL pulito e sono stati aggiunti 50 µL di acqua DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma-Adrich). L'acqua DEPC è stata preparata aggiungendo 0,1% (w/v) DEPC ad acqua bidistillata e mantenendo in incubazione per una notte. La soluzione è stata in seguito autoclavata per eliminare il DEPC. Questo procedimento permette di inattivare le RNasi presenti nell'acqua. La colonna a cui è legato l'RNA è stata incubata in ghiaccio per 5 minuti per favorire l'eluizione dell'RNA e poi centrifugata alla massima velocità per 1 minuto per recuperare l'RNA che è stato conservato a -80°C.

La quantità e la qualità dell'RNA estratto è stata analizzato mediante lo spettrofotometro ND-8000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Lo strumento è connesso ad un computer e permette di analizzare:

- La concentrazione ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) dell'RNA misurata con l'assorbanza a 260 nm (A_{260}) e calcolata sulla base della legge di Lambert-Beer: $\text{concentrazione RNA (ng } \mu\text{L}^{-1}) = A_{260} / (\epsilon_{260} \cdot \text{lunghezza del cammino ottico})$.
- Il rapporto 260/280 per valutare la purezza dell'RNA da contaminazione di proteine.
- Il rapporto 260/230 per valutare la purezza dell'RNA da contaminazione di composti organici (fenoli, carboidrati).

Un RNA di buona qualità deve presentare i rapporti 260/280 e 260/230 rispettivamente superiori a 1,8 e 2,0.

L'integrità dell'RNA estratto è stata valutata anche mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Paragrafo 3.8) caricando 1 µL di ogni campione di RNA, diluito con 4 µL di acqua e 1 µL di loading buffer 6× (blu di bromofenolo 0,25% w/v, glicerolo 30% w/v). La separazione di bande di RNA ribosomiale nette e ben distinte indica che l'RNA è integro.

Prima di essere retroscritto, l'RNA ha subito un trattamento enzimatico per eliminare eventuali tracce di DNA genomico contaminante che possono interferire nelle successive analisi di espressione genica mediante real time PCR. A tale scopo, 1 µg di RNA di ogni campione sono stati trattati con 1 µL di DNase I Amp Grade (1 U/µL, Invitrogen), 1 µL di 10× DNase Reaction Buffer (Invitrogen) in un volume finale di 10 µL di acqua DEPC. I campioni sono stati incubati per 15 minuti a 20°C. L'inattivazione della DNasi è avvenuta aggiungendo 1 µL di EDTA (25 mM), chelante del Mg^{++} , il cofattore indispensabile per il funzionamento della DNasi, e riscaldando a 65°C per 10 minuti per denaturare l'enzima. Per verificare l'assenza di degradazione dell'RNA trattato con DNasi è stata effettuata una corsa elettroforetica in gel di agarosio.

3.6.2 Sintesi del cDNA di foglie intere fresche di vite

La retrotrascrizione dell'RNA messaggero in cDNA è stata effettuata seguendo il protocollo che si basa sull'utilizzo dell'enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), che permette la sintesi del cDNA a 50°C. La trascrittasi inversa sintetizza il filamento di cDNA usando come stampo l'RNA a partire dal primer oligo d(T) che si appaia alla coda di poli(A) dell'mRNA. Per la retrotrascrizione, a 0,5 µg di RNA trattato con DNasi sono stati aggiunti 1 µL di primer oligo(dT)₂₀ (50 µM), 1 µL di dNTPs (10 mM) e acqua DEPC per raggiungere il volume finale di 13 µL. La miscela è stata quindi incubata a 65°C per 5 minuti e trasferita subito in ghiaccio per 1 minuto. Successivamente sono stati aggiunti 4 µL di First-Strand Buffer 5×, 1 µL di DTT (0,1 M), 1 µL di RNase OUT (Recombinant RNase Inhibitor 40 U µL⁻¹, Invitrogen) ed 1 µL di SuperScript III RT (200 U µL⁻¹, Invitrogen). La miscela è stata incubata a 50°C per 60 minuti. Successivamente i campioni sono stati trasferiti a 70°C per 15 minuti per inattivare l'enzima. Per rimuovere i filamenti di RNA negli ibridi DNA-RNA, è stato effettuato un trattamento con 1 µL di RNasi H (2 U µL⁻¹, Invitrogen) a 37°C per 20 minuti. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C fino al suo utilizzo, e diluito di 10 volte per l'analisi dell'espressione del gene specifico di *P. viticola* o di 20 volte per l'analisi dell'espressione dei geni di vite legati alla risposta a peronospora ed oidio.

3.6.3 Estrazione dell'RNA totale dai tessuti fogliari fissati e sottoposti a microdissezione

Per l'estrazione dell'RNA dai tessuti della microdissezione è stato utilizzato il protocollo PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus) con alcune modifiche. Ai campioni precedentemente lisati e conservati a -80°C (vedi Paragrafo 3.5.2) sono stati aggiunti 50 µL di etanolo 70%. La miscela è stata trasferita su colonnine precedentemente trattate con 250 µL di Conditioning buffer per 5 minuti. I campioni sono stati centrifugati per 2 minuti a 100 × g, e successivamente a 16000 × g per 30 secondi per favorire il legame dell'RNA alla colonna. A questo punto è stato effettuato il trattamento con la DNasi (RNase-free Dnase Set, Qiagen) per rimuovere eventuali tracce di DNA, aggiungendo direttamente alla colonna 35 µL di soluzione RDD e 5 µL di DNase I Stock Solution. I campioni sono stati lasciati ad incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. In seguito, 40 µL di soluzione di lavaggio 1 (Wash Buffer 1; PicoPure RNA kit) sono stati aggiunti alla colonna e i campioni sono stati centrifugati a 8000 × g per 15 minuti. Successivamente la colonna contenente l'RNA è stata lavata con 100 µL di soluzione di lavaggio 1 (Wash Buffer 1) centrifugando per 1 minuto a 8000 × g, e successivamente con 200 µL di soluzione di lavaggio 2 (Wash Buffer 2) centrifugando per 2 minuti a 16000 × g. Le soluzioni di lavaggio contengono etanolo che permette di rimuovere le impurità rimaste sulla colonna, mantenendo l'RNA legato alla membrana. I campioni sono stati centrifugati per un altro minuto a 16000 × g per rimuovere eventuali tracce di etanolo. La colonna è stata in seguito trasferita su un tubo da 0,5 mL e sono stati aggiunti 14 µL di soluzione di eluizione. La colonna è stata incubata a temperatura ambiente per 1 minuto, in seguito centrifugata a 1000 × g per 1 minuto per distribuire la soluzione di eluizione, poi a 16000 × g per 1 minuto per eluire l'RNA. I campioni sono stati conservati a -80°C.

Per l'estrazione dell'RNA dalle foglie intere fissate dopo microdissezione laser (Paragrafo 3.5.2) sono state effettuate delle modifiche al protocollo descritto precedentemente. Ai campioni fogliari sono stati aggiunti 200 µL di soluzione di estrazione e 200 µL di etanolo 70%. Per il trattamento con la DNasi sono stati aggiunti 30 µL

di Buffer RDD e 10 μL di DNase I Stock Solution. In seguito si è proseguito con i lavaggi allo stesso modo descritto precedentemente. L'RNA è stato eluito in 25 μL di soluzione di eluizione.

L'integrità dell'RNA estratto è stata valutata mediante elettroforesi capillare con lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies) usando il kit RNA 6000 Pico Assay (Agilent Technologies) per i campioni derivanti da microdissezioni e RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) per le foglie intere fissate. Lo strumento restituisce un profilo di separazione dell'RNA totale, in cui sono visibili soprattutto le componenti più abbondanti, ovvero gli RNA ribosomiali, e da cui è possibile valutare lo stato di integrità dell'acido nucleico. Lo strumento restituisce inoltre un valore di integrità (RIN, ovvero RNA *Integrity Number*) che permette di attribuire un indice qualitativo all'RNA totale.

3.6.4 Amplificazione dell'RNA e sintesi del cDNA dei campioni fogliari fissati e sottoposti a microdissezione

La retrotrascrizione dell'RNA estratto da stomi e regioni circostanti e dalle foglie intere fissate in cDNA è stata effettuata seguendo il protocollo che si basa sull'utilizzo del kit MessageAmp II aRNA Amplification (Ambion, Life Technologies). Per ciascun campione, si è partiti da 10 μL (corrispondenti a 3-25 ng) di RNA estratto da microdissezioni e 400 ng dell'RNA totale estratto dalla foglia intera fissata a cui sono stati aggiunti 10 μL di Reverse Transcription Master Mix composta da 1 μL di acqua *Nuclease-free*, 1 μL di primer T7 Oligo(dT), 2 μL 10 \times First Strand Buffer, 4 μL di dNTPs, 1 μL RNase Inhibitor e 1 μL di Array Script. I campioni sono stati miscelati gentilmente e incubati a 42°C per 2 ore in modo da favorire la sintesi del primo filamento di cDNA. Successivamente, la sintesi del secondo filamento di cDNA è stata effettuata aggiungendo a ciascun campione 80 μL di Second Strand Master Mix composta da 63 μL di acqua *Nuclease-free*, 10 μL di 10 \times Second Strand Buffer, 4 μL di dNTPs, 2 μL di DNA Polymerase e 1 μL di RNase H. I tubi sono stati incubati a 16°C per 2 ore. Il cDNA così ottenuto è stato purificato aggiungendo 250 μL di cDNA Binding Buffer. La miscela è stata trasferita all'interno di una colonna cDNA Filter Cartridge. Dopo centrifugazione per 1 minuto a 10000 \times g, il filtrato è stato eliminato. Successivamente la colonna è stata lavata con 500 μL di soluzione di lavaggio (Wash Buffer) centrifugando per 1 minuto a 10000 \times g. Dopo aver eliminato il filtrato, la colonna è stata trasferita su un tubo pulito e sono stati aggiunti 18 μL di acqua *Nuclease-free* riscaldata a 55°C. La colonna è stata incubata per 2 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugata per 1 minuto a 10000 \times g. All'eluato ottenuto sono stati aggiunti 24 μL di IVT Master Mix composta da 4 μL di T7 ATP, 4 μL di T7 CTP, 4 μL di T7 GTP, 4 μL di T7 UTP, 4 μL di T7 10 \times Reaction Buffer e 4 μL di T7 Enzyme Mix per sintetizzare l'aRNA ("*amplified RNA*"). La miscela è stata incubata a 37°C per 14 ore nel caso dei campioni delle microdissezioni o per 8 ore nel caso delle foglie intere fissate.

L'aRNA ottenuto è stato purificato per rimuovere enzimi, sali e nucleotidi non incorporati, aggiungendo 350 μL di aRNA Binding Buffer e 250 μL di etanolo 100%. La miscela è stata trasferita su una colonna aRNA Filter Cartridge e centrifugata per 1 minuto a 10000 \times g. Dopo l'eliminazione dell'eluato, la colonna è stata lavata con 650 μL di soluzione di lavaggio (Wash Buffer) centrifugando per 1 minuto a 10000 \times g. La colonna è stata in seguito trasferita su un tubo pulito e sono stati aggiunti 100 μL di acqua *Nuclease-free* (preriscaldata a 55°C). I campioni sono stati incubati prima a 55°C per 10 minuti, poi a temperatura ambiente per altri 2 minuti e in seguito centrifugati per 1,5 minuti a 10000 \times g. L'aRNA così ottenuto è stato controllato per valutarne la purezza

e quantificato con NanoDrop ND-8000 (Thermo Fisher Scientific) e in seguito concentrato con centrifuga a vuoto (Eppendorf) fino al raggiungimento del volume finale di 30 μ L.

La retrotrascrizione è stata effettuata seguendo il protocollo che si basa sull'utilizzo dell'enzima con Superscript VILO (Invitrogen). Si è partiti da 14 μ L (corrispondenti a 210-630 ng) di aRNA da microdissezioni e foglia intera fissata a cui sono stati aggiunti 4 μ L di 5 \times VILO Reaction Mix e 2 μ L di Superscript Enzyme Mix 10 \times . Il tutto è stato incubato 25°C per 10 minuti, poi a 42°C per 60 minuti per la reazione di retrotrascrizione ed infine a 85°C per inattivare l'enzima. Il cDNA è stato conservato a -20°C fino al suo utilizzo, e diluito rispettivamente di 10 volte per l'analisi dell'espressione del gene specifico di *P. viticola* e di 20 volte per l'analisi dell'espressione dei geni di risposta della vite a peronospora.

3.7 Verifica del cDNA tramite PCR

Il corretto funzionamento della reazione di retrotrascrizione e l'assenza di contaminazione da DNA sono stati verificati mediante amplificazione del gene *Actina* (VIT_204s0044g00580), utilizzando una coppia di primer disegnata su due esoni del gene (*Act_PCR_For*: 5'-TGACAATGGAAGCTGGAATGGT-3'; *Act_PCR_Rev*: 5'-ATCAGGCAGCTCTATAGTTCTTC-3') (Figura 3.9).

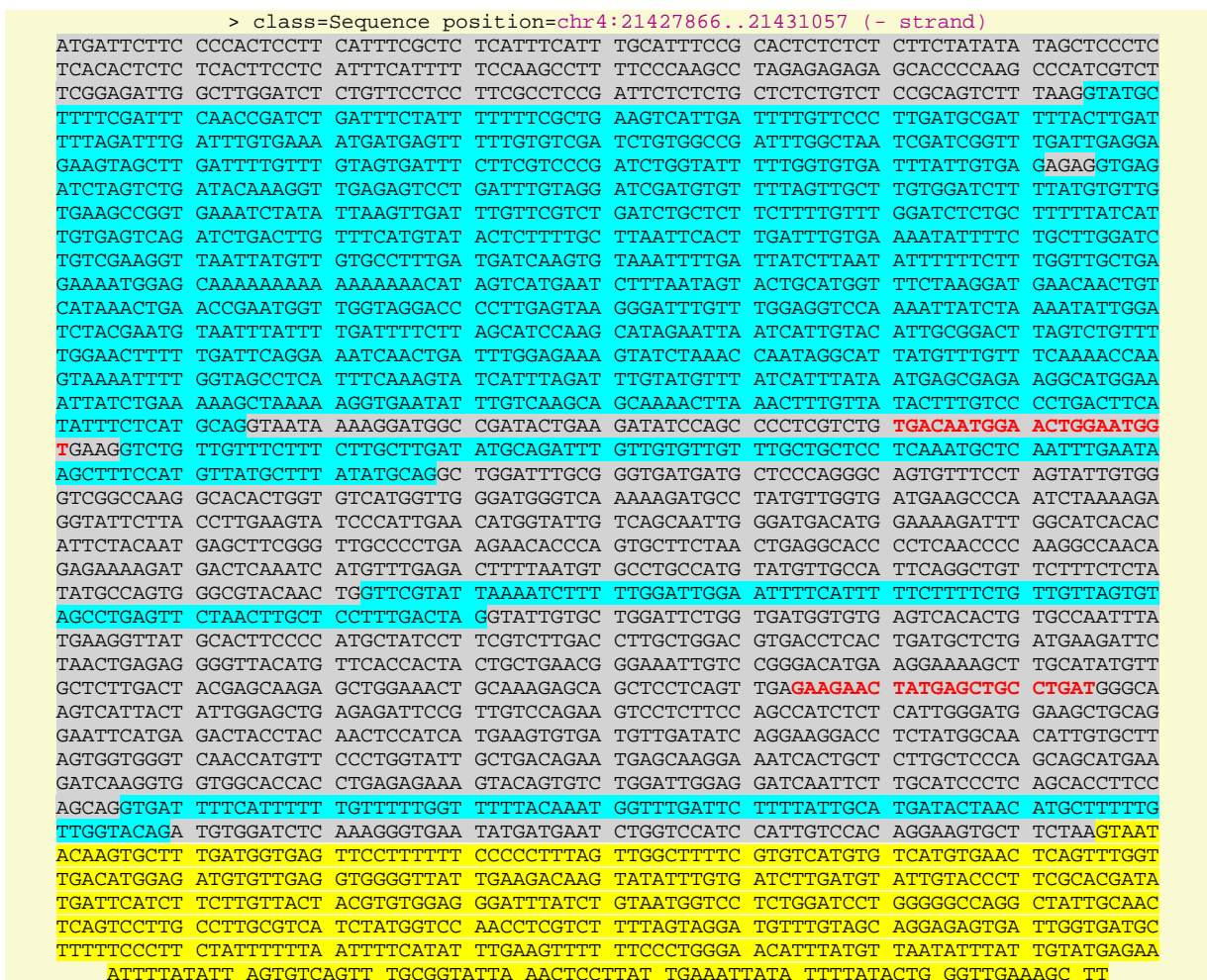


Figura 3.9: Sequenza del gene *Actina* con gli esoni evidenziati in grigio, gli introni in azzurro e le UTR in giallo. I primer *Act_PCR_For* e *Act_PCR_Rev* usati per verificare l'assenza di DNA nel cDNA sono indicati in rosso.

Le reazioni di amplificazione sono state realizzate assemblando la miscela di reazione in 25 μL finali come riportato in Tabella 3.7, utilizzando il termociclatore T-gradient (Biometra) secondo i cicli di amplificazione descritti nella Tabella 3.8.

Tabella 3.7: Miscela per la reazione di PCR.

Componente	Quantità da aggiungere
10 \times DreamTaq Buffer	2,5 μL
dNTPs (2mM ciascuno)	2,5 μL
Primer <i>Forward</i> (10 mM)	1 μL
Primer <i>Reverse</i> (10 mM)	1 μL
DreamTaq DNA Polymerase (5U μL^{-1})	0,125 μL
cDNA (1/10)	1 μL
H ₂ O	16,875 μL

Tabella 3.8: Schema dei cicli di amplificazione.

N° cicli	Temperatura	Tempo
1	95°C	2 minuti
40	95°C	30 secondi
	58°C	30 secondi
	72°C	45 secondi
1	72°C	15 minuti
	15°C	∞

3.8 Elettroforesi in gel di agarosio

L'RNA estratto e i prodotti di PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio in tampone TAE 1 \times (0,04 M Tris-acetato, 0,0001 EDTA pH 8.0). Il gel è stato ottenuto sciogliendo l'agarosio in tampone TAE 1 \times , processo ottenuto attraverso il riscaldamento con forno al microonde della miscela fino ad ebollizione. La soluzione è stata in seguito raffreddata a circa 60°C e addizionata di bromuro di etidio (stock 10 mg mL⁻¹) per avere una concentrazione finale di 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ di bromuro di etidio nel gel. In seguito la soluzione è stata versata in uno stampo su cui è adagiato un pettine che permette la formazione dei pozzetti per il caricamento dei campioni. I campioni, cui sono stati aggiunti 1/6 di volume di soluzione di loading buffer 6 \times , sono stati caricati nei pozzetti e successivamente è stata applicata una differenza di potenziale agli elettrodi pari a 5 Volt cm⁻¹ che spinge gli acidi nucleici a migrare verso il polo positivo.

A fine corsa il gel è stato esposto a raggi UV mediante transilluminatore Gel Doc (Bio-Rad) per l'osservazione delle bande di DNA o RNA: il bromuro di etidio, eccitato dalla radiazione ultravioletta, emette radiazione fluorescente, cosicché il DNA o RNA diventa visibile al transilluminatore per la presenza di molecole di bromuro di etidio intercalate.

3.9 Analisi dell'espressione genica mediante real time PCR

3.9.1 Preparazione delle reazioni per l'analisi real time PCR

Per lo studio dei profili di espressione dei geni di difesa della vite a peronospora ed oidio e dei geni *MLO* sono state effettuate delle reazioni di real time PCR che permettono di ottenere una quantificazione di tipo relativo dell'espressione genica. La real time PCR è una tecnica altamente sensibile che consente la quantificazione di trascritti scarsamente rappresentati e di piccole variazioni nell'espressione di un gene. La tecnica consiste nel sintetizzare prodotti di PCR in presenza del colorante fluorescente SYBR Green che si lega al DNA a doppio filamento generando un segnale di fluorescenza proporzionale al numero di molecole sintetizzate.

Le reazioni di amplificazione a partire dal cDNA diluito sono state effettuate utilizzando i primer specifici per l'amplificazione dei geni di interesse e dei geni di riferimento riportati in Tabella 3.9 e 3.10. I primer per la real time PCR sono stati disegnati con l'ausilio del programma *Primer3* (<http://primer3.sourceforge.net>) indicando un amplicone di dimensioni ottimali pari a 80-150 bp e una temperatura di *melting* di 55°C o 60°C. I primer sono stati controllati con l'applicazione *Oligo Analyzer V.1.0.2* (www.bio.net/bionet/mm/bio-soft/2001-September/023431.html).

Le reazioni di amplificazione sono state preparate utilizzando la miscela Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen), che contiene l'enzima Platinum Taq DNA Polymerase, la molecola fluorescente SYBR Green I, MgCl₂ e dNTPs. È stato inoltre aggiunto il ROX Reference Dye (Invitrogen) per normalizzare il segnale di fluorescenza tra le reazioni. Ciascuna reazione di amplificazione di ogni campione di cDNA con ogni coppia di primer è stata condotta in triplicato (repliche tecniche). Tutte le reazioni sono state realizzate in un volume finale di 10 µL nello strumento Light Cycler 480 (Roche) impostando il seguente programma: 50°C per 2 minuti, 95°C per 2 minuti, 50 cicli di 95°C per 15 secondi, 60°C per 30 secondi. Al termine dei 50 cicli avviene il protocollo di dissociazione che consiste nell'aumento graduale della temperatura da 60°C a 95°C.

La quantificazione del prodotto di amplificazione ottenuto mediante real time PCR si basa sul fatto che nella fase esponenziale l'efficienza di amplificazione è massima ed in condizioni ottimali la quantità di amplificato raddoppia ad ogni ciclo. Due campioni possono essere quindi confrontati rispetto al numero di ciclo di PCR (C_t) in corrispondenza del quale il valore della loro fluorescenza supera il valore soglia (Figura 3.10). I campioni che raggiungono prima il valore soglia hanno un C_t inferiore e sono quelli che contengono più template di partenza.

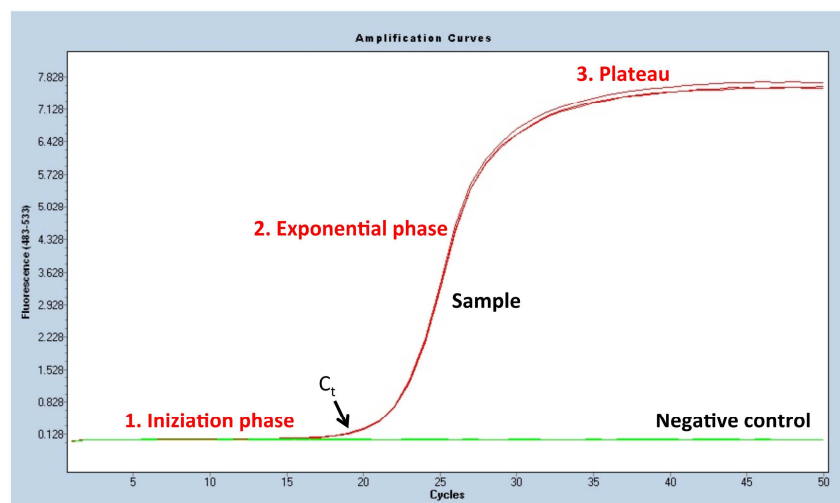


Figura 3.10: Esempio di curva di amplificazione nella real time PCR.

Il graduale incremento della temperatura durante il protocollo di dissociazione finale provoca la dissociazione delle molecole di amplificato al raggiungimento della loro temperatura di *melting*. L'apertura della doppia elica degli amplificati provoca la liberazione della molecola di SYBR Green con conseguente riduzione della fluorescenza.

La derivata negativa della curva di abbassamento della fluorescenza in funzione della temperatura presenta un picco in corrispondenza della temperatura di dissociazione del prodotto amplificato. La presenza di un unico picco corrispondente alla temperatura di *melting* dell'amplicone previsto conferma la specificità dell'amplicato. Mentre la presenza di picchi multipli a temperature diverse può indicare la presenza di amplificati aspecifici oppure di dimeri dei primer che influenzano la corretta stima della quantità dell'amplicato, e quindi la quantificazione relativa dell'espressione genica del gene di interesse.

3.9.2 Analisi dei dati di real time PCR

Per l'elaborazione dei dati di real time PCR, il valore di efficienza di amplificazione per ciascuna reazione è stato calcolato utilizzando il programma LinReg PCR 11.1 (Ruijter et al. 2009), in base alla seguente equazione:

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

In cui, R_0 e C sono rispettivamente i dati delle misure di fluorescenza ed il numero dei cicli, mentre $\text{Log}(N_0)$ e $\text{Log}(Eff)$ sono rispettivamente l'intercetta e la pendenza della curva di amplificazione. Per evitare un'ambigua selezione dei punti all'interno della fase esponenziale, l'algoritmo LinReg PCR identifica la migliore linea di tendenza per ciascuna curva di amplificazione, utilizzando da 4 a 6 punti e selezionando il massimo valore di pendenza (valore dell'efficienza di ciascuna reazione).

Utilizzando il *software* Light Cycler 480 1.5.1.62 SP2 (Roche) è stato determinato il valore di ciclo soglia C_t (*cycle threshold*), che corrisponde al punto in cui la fluorescenza supera il valore utilizzato come soglia (cioè il rumore di fluorescenza di base).

Analisi dell'espressione dei geni di risposta della vite a *P. viticola* in foglie intere e in campioni sottoposti a microdissezione

La quantificazione relativa è stata calcolata con l'equazione di Pfaffl (Pfaffl 2001):

$$\text{espressione relativa} = (Eff_{\text{gene}})^{\Delta C_{t\text{gene}}(\text{controllo-inoculato})} / (Eff_{\text{rif}})^{\Delta C_{t\text{rif}}(\text{controllo-inoculato})}$$

Eff_{gene} : efficienza di amplificazione del gene di interesse;

Eff_{rif} : efficienza di amplificazione del gene di riferimento (*Actina_1*);

$\Delta C_{t\text{gene}}$: differenza tra il valore di C_t del campione controllo e quello del campione inoculato per il gene di interesse;

$\Delta C_{t\text{rif}}$: differenza tra il valore di C_t del campione controllo e di quello del campione inoculato per il gene di riferimento.

L'equazione di Pfaffl combina la quantificazione e la normalizzazione in un unico calcolo e permette di esprimere il livello di espressione relativo di un gene come numero di volte (*fold change*) con cui cambia

l'espressione del gene nel campione inoculato rispetto al livello di espressione nel campione di riferimento (controllo), normalizzando in base al livello di espressione del gene di riferimento.

Come riferimento è stato utilizzato il gene *Actina_1* (*Act_1*, VIT_212s0178g00200) che è risultato costitutivo durante l'infezione di *P. viticola* (Polesani et al. 2010, Perazzolli et al. 2011). La foglia intera fresca del campione controllo è stata inoltre utilizzata come riferimento per il calcolo del livello di espressione relativo nelle foglie intere fresche. La foglia intera fissata del campione controllo è stata invece utilizzata come riferimento per il calcolo del livello di espressione negli stomi e nelle regioni circostanti del campione controllo, inoculato-locale e inoculato-distale e nelle foglie intere fissate del campione inoculato-locale e inoculato-distale.

Analisi dell'espressione dei geni *MLO* e dei geni di risposta della vite ad oidio in piante trasformate

La quantificazione relativa è stata calcolata con la formula riportata in Hellemans et al. (2007):

$$\text{Normalized Relative Quantity (NRQ)} = \text{RQ/NF}$$

$$\text{Relative Quantification (RQ)} = \text{Eff}(\text{Ct}-\text{Ct}')$$

Normalization Factor (NF) = media geometrica delle RQ dei geni di riferimento considerati.

Eff: efficienza di amplificazione, calcolata dal programma LinReg PCR 11.1 (Paragrafo 3.9.2);

Ct: il ciclo soglia dell'amplificazione di un gene in uno specifico campione;

Ct': corrisponde alla media dei Ct tra tutti i campioni analizzati per lo stesso gene nel calcolo del livello di espressione dei geni *MLO* nel controllo EVB e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*. Mentre, per il calcolo del livello di espressione dei geni di risposta della vite ad oidio nel controllo EVB e nella linea TLB4, Ct' corrisponde alla media dei Ct nel controllo EVB a 0 dpi.

Come geni di riferimento sono stati usati: *Actina_2* (*Act_2*), *Glutaraldeide-3-fosfato deidrogenasi* (*GADPH*) e il *Fattore di elongazione 1 α* (*EF-1 α*) (Reid et al. 2006). La stabilità dei geni di riferimento è stata valutata tramite il software GeNorm (medgen.ugent.be/~jndesomp/genorm/) (Vandesompele et al. 2002) a partire dalle loro RQ. Per ogni gene di riferimento, il programma GeNorm fornisce un valore di stabilità (M), definito come la variazione media a coppie di un particolare gene di riferimento con gli altri geni oggetto di studio. I tre geni hanno presentato un valore di stabilità M, pari a 0,5. Come riportato in letteratura (Strube et al. 2008, Van Hiel et al. 2009, Ling and Salvaterra 2011), i geni di riferimento con valori di M al di sotto di 1,5 sono considerati stabili.

L'espressione relativa percentuale (RE %) è stata calcolata come il rapporto tra la media del livello di espressione relativa del gene *MLO* a 0, 1 e 10 dpi nella linea trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* e la media dell'espressione relativa del gene *MLO* a 0, 1 e 10 dpi nel controllo EVB, ed espressa come percentuale.

3.10 Analisi istologica

3.10.1 Analisi istologica delle foglie inoculate con *Plasmopara viticola*

Per verificare l'avvenuta infezione di *P. viticola* nelle foglie e per osservare le strutture del patogeno all'interno dei tessuti, due mezze foglie dal campione controllo o dal campione inoculato-locale per ciascuna replica sono state trattate seguendo il protocollo descritto da Díez-Navajas et al. (2007) con piccole modifiche. I campioni fogliari sono stati decolorati in una soluzione di idrossido di potassio (1M KOH) a 95°C per 15 minuti e in seguito trasferiti in una soluzione fresca di KOH per 15 minuti a temperatura ambiente. In seguito, i campioni sono stati sottoposti a 3 lavaggi con acqua distillata di 15 minuti ciascuno e incubati nel colorante blu di anilina (0,05% in 0,067 M K_2HPO_4 pH 8). I campioni sono stati in seguito trasferiti sul vetrino con la pagina inferiore rivolta verso l'alto ed è stata verificata la presenza del patogeno all'interno della foglia utilizzando un microscopio a fluorescenza (Leica LMD 7000) con filtro LMD (filtro eccitazione BP 380-420nm, 415 dichroic mirror, e emissione BP 445-485). Il colorante interagisce con i β -1,3 glucani della parete del patogeno permettendone la visualizzazione in fluorescenza (Hood and Shew 1996).

Per determinare il numero di stomi infetti, 10 aree da 1 mm² ciascuna sono state selezionate in maniera *random* sulle metà foglie dal campione controllo e inoculato-locale. Gli stomi che presentavano la zoospora incistata, l'ifa primaria formata e l'austorio sono stati contati e la percentuale degli stomi infetti è stata calcolata rispetto al numero di stomi totali.

3.10.2 Analisi istologica delle foglie inoculate con *Erysiphe necator*

Per visualizzare lo sviluppo di *E. necator* all'interno dei tessuti e per osservare i possibili meccanismi di resistenza sono state raccolte 2 foglie per 3 repliche biologiche da ciascuna linea trasformata a 3, 10 e 21 dpi. Le foglie sono state trattate come descritto in Vanacker et al. (2000) con alcune modifiche. Le foglie sono state tagliate in piccoli pezzi che sono stati adagiati su carta Whatman bagnata con etanolo:acido acetico (3:1, v/v) in piastre Petri (92 mm) fino alla completa rimozione della clorofilla. I campioni fogliari sono stati successivamente incubati su carta impregnata di acqua in piastre Petri (92 mm) per 2 ore e sono stati quindi incubati su carta bagnata con lactoglicerolo (glicerolo:acido lattico:acqua, 1:1:1, v/v) in piastre Petri (92 mm) per 12 ore e conservati in questa soluzione fino all'osservazione al microscopio.

Per l'osservazione al microscopio i tessuti fogliari conservati in lactoglicerolo sono stati posti su un vetrino posizionando una goccia di blu di anilina (0,1% [w/v] in lactoglicerolo). Il colorante in lactoglicerolo non fluoresce, e le strutture del patogeno (ife, conidi e appressori) sono state visualizzate in campo chiaro mediante il microscopio Leica LMD7000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Una volta localizzate le spore, è stata usata la fluorescenza con un filtro LMD (filtro eccitazione BP 380-420nm, 415 dichroic mirror, e emissione BP 445-485) per visualizzare l'autofluorescenza con una colorazione blu-verde associata alle cellule infette e alla formazione della papilla (Vanacker et al. 2000). La papilla è prodotta dalla pianta per prevenire la penetrazione dei patogeni ed è composta da callosio e da composti fenolici che sono autofluorescenti (Vanacker et al. 2000).

3.11 Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati ripetuti 2 volte e i dati sono stati analizzati con il programma Statistica9 (StatSoft). L'F-test è stato applicato per dimostrare l'assenza di differenze significative tra 2 esperimenti ($\alpha > 0,05$) e i dati di 2 esperimenti sono stati raggruppati. I valori dell'espressione relativa sono stati trasformati usando la formula $y = \log_{10}(1+x)$ (Casagrande et al. 2011). Dopo validazione della distribuzione normale (test di Kolmogorov-Smirnov o di Shapiro-Wilk, $\alpha > 0,05$) e dell'omogeneità della varianza dei dati (Levene's test, $\alpha > 0,05$), è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il test di Tukey o di Fisher per determinare differenze significative ($\alpha < 0,05$). Per l'analisi dell'espressione dei geni *MLO* nel controllo EVB e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* a 0, 1 e 10 dpi è stata applicata l'ANOVA a due vie considerando allo stesso tempo sia l'effetto della linea sia del tempo scelto per il campionamento. Nel caso in cui le assunzioni per l'applicazione dell'ANOVA non erano rispettate, è stato applicato il test non-parametrico di Krustal-Wallis.

Tabella 3.9: Sequenze dei primer dei geni di risposta della vite a *Plasmopara viticola* per l'analisi dell'espressione mediante real time PCR.

Abbreviazione del gene	Nome del gene	Accession number ^a	Codice del gene di vite ^b	Sequenza dei primer ^c	Referenza ^d
<i>PR-2</i>	Proteina di patogenesi 2	AJ277900	VIT_208s0007g06060	For: GTTATTTTCAGAGAGTGGTTGGC Rev: AACATGGCAAACACGTAAGTCT	Perazzolli et al. 2011
<i>PR-4</i>	Proteina di patogenesi 4	CF074510	VIT_214s0081g00030	For: CAGGCAACGGTGAGAATAGT Rev: ACCACAGTCCACAACTCGTA	Perazzolli et al. 2011
<i>OSM-1</i>	Osmotina 1	XM_002282928	VIT_202s0025g04310	For: CGCTGCGCTAAAGACTACC Rev: AAAAAACCTTGAGTAATCTGTAGCA	Perazzolli et al. 2012
<i>TLP-4</i>	Proteina Thaumatin-like 4	XM_002282957	VIT_202s0025g04290	For: CACTGTTTTTCAGGACCGATG Rev: GGGCATGTAAAGGTGCTTGT	Santi et al. 2013
<i>TLP-5</i>	Protein Thaumatin-like 5	XM_002283046	VIT_202s0025g04270	For: CTAGGGTGCTTTTGAGTCCA Rev: CGTAGAAAAGTTGTTGCATGAG	Santi et al. 2013
<i>GLP-7</i>	Proteina Germin-like 7	NM_001281015	VIT_214s0128g00570	For: GGGTGTTCAGTGGCTCGTATC Rev: CGGTGTTTCAGGGTTGGATGT	Godfrey et al. 2007
<i>GLP-2</i>	Proteina Germin-like 2	NM_001280985	VIT_214s0060g00120	For: CGAGTTGGATGTGGGGTTCA Rev: GACTTCGCCGTGTTCTTCT	Godfrey et al. 2007
<i>NAC</i>	Fattore di trascrizione <i>NAC</i>	Q52QR5	VIT_201s0026g02710	For: AACTGCCATGCCAATACAAC Rev: AACCAAGCCTAATCACTGAA	Polesani et al. 2008
<i>CHI</i>	Calcone isomerasi	NM_001281104	VIT_213s0067g03820	For: AACTTCTGGTAGGGACCCATCT Rev: GAAGGATGAAAACCTTCCCACCA	Legay et al. 2010
<i>CellS</i>	Cellulosa sintasi D3	XM_010664727	VIT_202s0012g02190	For: CAGACGAAGACTTCGCTGAT Rev: GGAGTCCATGAGTTGCTGTA	Polesani et al. 2008
<i>Act_1</i>	Actina_1	XM_010659103	VIT_212s0178g00200	For: ATTCCTACCATCATCAGCA Rev: GACCCCTCTACTAAAAC	Polesani et al. 2010
<i>LSU</i>	<i>Large ribosomal subunit</i> ^e	KM279688	-	For: GTGGTCAGTATGGGCACCTTG Rev: GCGACTCAAAGAAAACGGGT	Gindro et al. 2014

^a Accession number del database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

^b Codice del gene di vite della versione V2 del genoma (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>).

^c Sequenze dei primers *forward* (For) e *reverse* (Rev). Le referenze delle coppie di primer sono le seguenti: *PR-2* e *PR-4* (Perazzolli et al. 2011); *TLP-4* e *TLP-5* (Santi et al. 2013); *OSM-1* (Perazzolli et al. 2012); *NAC* e *CellS* (Polesani et al. 2008); *CHI* (Legay et al. 2010); *Act_1* (Polesani et al. 2010).

^e Il gene *large ribosomal subunit* (*LSU*) di *P. viticola* è stato usato per identificare la presenza del patogeno all'interno dei tessuti fogliari.

^d Referenza dei geni di vite.

Tabella 3.10: Sequenze dei primer dei geni di risposta della vite a *Erysiphe necator* per l'analisi dell'espressione mediante real time PCR.

Abbreviazione del gene	Nome del gene	Accession number ^a	Codice del gene di vite ^b	Sequenza dei primer ^c	Referenza ^d
<i>EF-1a</i>	Fattore di elongazione 1 α	EC959059	VIT_206s0004g03220	For: GAACGGGGTGGCTTGATAGGC Rev: AACCAAAAATATCCGGAGTAAAAGA	Reid et al. (2006)
<i>GADPH</i>	Glutaraldeide 3-fosfato deidrogenasi	CB973647	VIT_217s0000g10430	For: TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA Rev: CCACAGACTTCATCGGTGACA	Reid et al. (2006)
<i>Act_2</i>	Actina_2	EC969944	VIT_204s0044g00580	For: TCCTTGCCCTTGCCTCATCTAT Rev: CACCAATCACTCTCCTGGTACAA	Reid et al. (2006)
<i>MLO-6</i>	Gene <i>MLO-6</i>	NM_001281076	VIT_213s0019g04070	For: GTGCAGTTATGTGACTCC Rev: ACACACCATCCGAGTGC	Winterhagen et al. (2008)
<i>MLO-7</i>	Gene <i>MLO-7</i>	NM_001281079	VIT_213s0019g04060	For: CTTTCTTCGCATGGAGCAG Rev: GAGCCCATCTGTGCACCAA	Winterhagen et al. (2008)
<i>MLO-11</i>	Gene <i>MLO-11</i>	NM_001281084	VIT_208s0040g02170	For: GCACCCCTTACATGGC Rev: TCTGGACCAGGATTTCTATGATG	Winterhagen et al. (2008)
<i>MLO-13</i>	Gene <i>MLO-13</i>	KR362917	VIT_206s0004g03100	For: CTGGTGACACAGATGGGTTC Rev: CTACTTGACATGGGTGTGGC	Winterhagen et al. (2008)
<i>WRKY-19</i>	Fattore di trascrizione WRKY-19	NM_002282222	VIT_207s0141g00680	For: GGGGAGGCTGTGGTTAGGTT Rev: GTTTGGCATTGGCTGTCT	Guo et al. (2014)
<i>WRKY-27</i>	Fattore di trascrizione WRKY-27	NM_002272468	VIT_208s0058g01390	For: CTTGGATCAGAATCACCCTAA Rev: GCCGTGGTATGTGGTTTTGTA	Guo et al. (2014)
<i>WRKY-48</i>	Fattore di trascrizione WRKY-48	NM_002280995	VIT_215s0046g01140	For: CAAGATTTCAAGGACCAAGCAG Rev: AGTATGCCTTCCTCGGTATGT	Guo et al. (2014)
<i>WRKY-52</i>	Fattore di trascrizione WRKY-52	NM_002267757	VIT_214s0050g02510	For: CCTCTTGATGATGGGTTTAGTT Rev: GTCTTCCACGGTAGGTGATTT	Guo et al. (2014)
<i>ASL-1</i>	Acetolattato sintasi	NM_002274037	VIT_214s0068g01960	For: CCGTGCATACCGAGCATTTG Rev: AGGCCGGTTCTGTATGTTGG	Questo studio
<i>EDS-1</i>	Proteina Lipase-like	NM_010664719	VIT_217s0000g07560	For: AGGGTTTTATATTGTATCTCAAGGC Rev: GAAGAAAATATCTTATTACTACATAATGTTTCA	Gao et al. (2014)
<i>LOX-9</i>	Lipossigenasi 9	AY159556	VIT_214s0128g00780	For: GACAAGAAGGACGAGCCTTG Rev: CATAAGGGTACTGCCGAAA	Dufour et al. (2013)
<i>LOX-1</i>	Lipossigenasi 1	XM_002263818	VIT_213s0064g01480	For: ATCAATGCTCTTGCTCGGGA Rev: CCAGAGCTGGTCATAGGCAG	Questo studio
<i>PAD-4</i>	Proteina Lipase-like	NM_002280750	VIT_217s0000g07420	For: ACGATTGCATGGTAAGCCA Rev: CGACTCCGTCATCGCCTAAA	Questo studio
<i>PEN-1</i>	Sintaxina	NM_002263950	VIT_208s0032g01150	For: CTTCCGAAGAAGCTCAGGGA Rev: TGCTCTTGGATCGCCTTCTG	Questo studio
<i>PR-1</i>	Proteina di patogenesi 1	AJ536326	VIT_203s0088g00690	For: CCCAGAACTCTCCACAGGAC Rev: GCAGTACAGTGTCTGTTCCA	Dufour et al. (2013)
<i>PR-6</i>	Proteina di patogenesi 6	AY156047	VIT_205s0020g05020	For: ACGAAAACGGCATCGTAATC Rev: TCTTACTGGGGCACCATTTC	Dufour et al. (2013)
<i>NPF-3.2</i>	Transportatore NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	NM_002277950	VIT_208s0040g00830	For: TCGTCACATCAGCACAGCTT Rev: ATCTGCGAGCCAATGGAACA	Questo studio

^a Accession number del database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). ^b Codice del gene di vite della versione V2 del genoma (<http://genomes.cripi.unipd.it/grape/>). ^c Sequenze dei primers *forward* (For) e *reverse* (Rev). Le referenze della coppia di primer sono le seguenti: *EF-1a*, *GADPH* e *Act_2* (Reid et al. 2006); *MLO-6*, *MLO-11* e *MLO-13* (Winterhagen et al. 2008); *WRKY-19*, *WRKY-27*, *WRKY-48*, *WRKY-52* (Guo et al. 2014); *EDS-1* (Gao et al. 2014); *LOX-9*, *PR-1* e *PR-6* (Dufour et al. 2013).

^d Referenza dei geni di vite.

4 RISULTATI

4.1 Ottimizzazione del protocollo di microdissezione laser per lo studio della risposta sito-specifica della vite a peronospora

4.1.1 Inoculo con *Plasmopara viticola* di foglie di piante cresciute *in vitro*

Le foglie di piante cresciute *in vitro* sono state inoculate con una sospensione sterile di *P. viticola*. I campioni sono stati prelevati da foglie trattate con acqua (controllo), dall'area inoculata (inoculato-locale) e dall'area non inoculata (inoculato-distale) di foglie inoculate con il patogeno ad 1 dpi (Figura 3.6, Paragrafo 3.3.2). Mediante colorazione con blu di anilina è stato osservato lo sviluppo di *P. viticola* all'interno dei tessuti fogliari. In particolare è stato possibile osservare le strutture tipiche del patogeno nel campione inoculato-locale ad 1 dpi, ossia le zoospore incistate in prossimità dello stoma, la formazione della vescicola nella camera sottostomatica, con la presenza dell'ifa primaria e dell'austorio primario (Figure 4.1 A-B). Come atteso, nei campioni controllo non è stata osservata la presenza del patogeno (Figura 4.1 C).

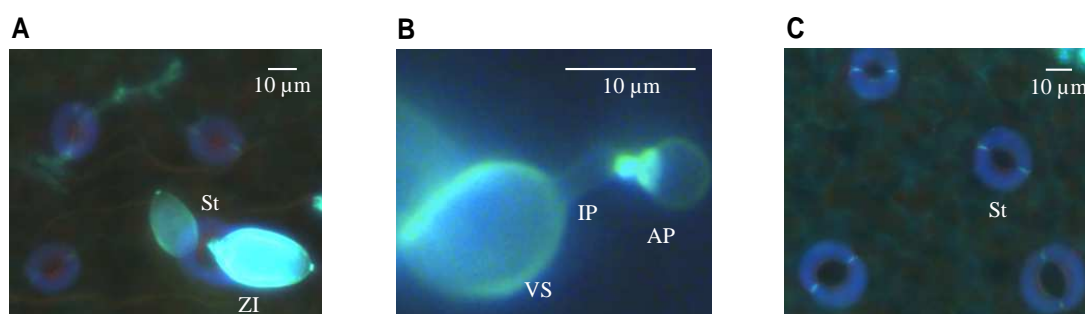


Figura 4.1: Analisi istologica dello sviluppo di *Plasmopara viticola* nelle foglie di piante cresciute *in vitro* ad 1 dpi.

Le foglie sono state inoculate con *P. viticola* (inoculato-locale) o trattate con acqua (controllo) in condizioni sterili. L'infezione di *P. viticola* è stata analizzata (A, B) nel campione inoculato-locale e (C) nel campione controllo a un giorno dall'inoculo mediante microscopio a fluorescenza in seguito a colorazione con blu di anilina. Nelle figure sono indicati esempi di: zoospore incistata (ZI), vescicola sottostomatica (SV), ifa primaria (IP) e austorio primario (AP) in prossimità dello stoma (St).

La percentuale degli stomi infetti, ossia degli stomi che presentano zoospore incistate o vescicole sottostomatiche, è risultata pari al 18% degli stomi totali (Figura 4.2 A). A sette giorni dall'inoculo, l'infezione con *P. viticola* è stata confermata dallo sviluppo dei sintomi della peronospora con un'intensa sporulazione (Figura 4.2 B) e produzione di sporangi (Figura 4.2 C) sulla pagina inferiore del campione inoculato-locale. In particolare, le foglie inoculate presentano in media 67 ± 3 % della loro superficie coperta dalla sporulazione e $6,6 \pm 0,07 \times 10^6$ sporangi g^{-1} di peso fresco della foglia.

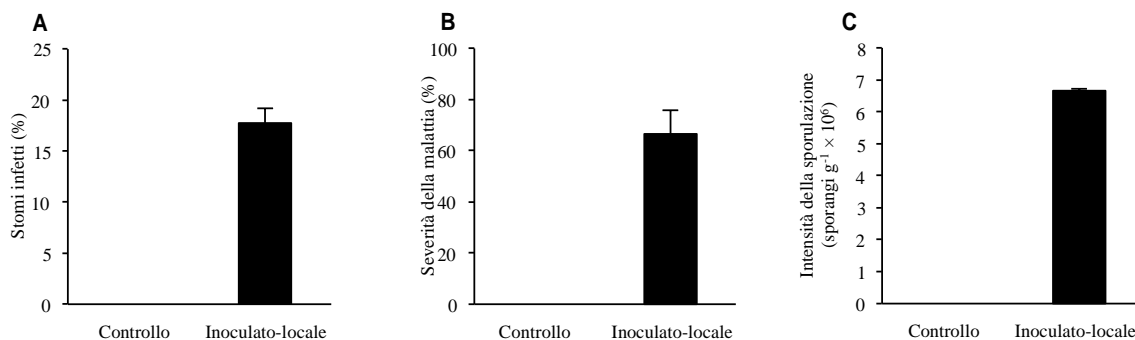


Figura 4.2: Infezione di *Plasmopara viticola* nelle foglie di piante cresciute *in vitro*.

(A) La percentuale di stomi infetti è stata valutata a un giorno dall'inoculo contando il numero di stomi con zoospore incistate o vescicole sottostomatiche con ifa primaria e austorio primario. La severità della malattia è stata valutata a sette giorni dall'inoculo ed espressa come (B) percentuale di area fogliare coperta da sporulazione e come (C) numero di sporangi di *P. viticola* per grammo di peso fresco della foglia. L'F-test non ha rivelato differenze significative tra due esperimenti indipendenti ($P = 0,2$) e i dati dei due esperimenti sono stati quindi raggruppati. Gli istogrammi rappresentano i valori percentuali medi e gli errori standard di 10 repliche di due esperimenti indipendenti.

4.1.2 Analisi dell'espressione genica in foglie intere fresche

4.1.2.1 Estrazione dell'RNA da foglie intere fresche e valutazione della qualità

L'RNA estratto da foglie intere fresche di piante cresciute *in vitro* (foglie intere fresche; Paragrafo 3.3.2) trattate con acqua o inoculate con *P. viticola* è stato controllato mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio, dimostrando la presenza di RNA di buona qualità (Figura 4.3). Sono infatti visibili bande nette e di dimensione attesa corrispondenti all'RNA ribosomiale, mentre non sono presenti bande a basso peso molecolare, indice di degradazione dell'RNA. L'assenza di bande ad alto peso molecolare al di sopra dell'RNA ribosomiale indica inoltre che non è visibile la presenza di DNA genomico nei campioni estratti.

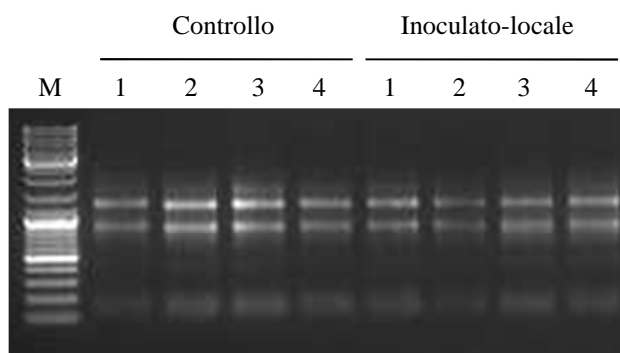


Figura 4.3: Corsa elettroforetica in gel di agarosio dell'RNA estratto da foglie di piante cresciute *in vitro*.

Come esempio è riportata la corsa elettroforetica dell'RNA estratto da quattro repliche (1, 2, 3, 4) delle foglie trattate con acqua (controllo) e delle foglie inoculate con *P. viticola* (inoculato-locale) a un giorno dall'inoculo. M: marcatore di peso molecolare (*GeneRuler DNA Ladder mix*, ThermoFisher Scientific).

La qualità e la resa del processo di estrazione sono state anche valutate tramite misure spettrofotometriche, ottenendo dei rapporti A260/A280 e A260/A230 maggiori di 1,8, che indicano rispettivamente una ridotta quantità di proteine e una bassa concentrazione di polisaccaridi, con una resa maggiore di 5,2 µg.

L'RNA di ciascun campione è stato quindi trattato con l'enzima DNasi allo scopo di eliminare le eventuali tracce di DNA genomico, la cui presenza causerebbe una sovrastima dell'espressione del gene di interesse nell'analisi real time PCR. I campioni di RNA sono stati quindi analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio, per verificare l'assenza di degradazione e il corretto bilanciamento in termini di concentrazione (dato non mostrato).

4.1.2.2 Valutazione del cDNA ottenuto da foglie intere fresche

Il successo della reazione di retrotrascrizione è stato verificato mediante l'amplificazione del gene costitutivo *Actina* attraverso l'uso di primer disegnati tra due esoni, dimostrando l'assenza di DNA genomico nei campioni di cDNA ottenuti da foglie intere fresche del campione controllo e inoculato-locale (Figura 4.4).

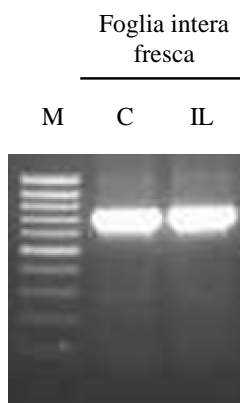


Figura 4.4: Controllo della qualità del cDNA ottenuto da foglie intere fresche.

Come esempio è riportata la corsa elettroforetica del prodotto di PCR ottenuto con primer disegnati su due esoni del gene *Actina* di vite di campioni controllo (C) e dall'area inoculata (inoculato-locale, IL) di foglie inoculate con *P. viticola* raccolti a un giorno dall'inoculo. La banda attesa dall'amplificazione del cDNA (709 bp) è stata ottenuta in tutti i campioni. M: marcatore di peso molecolare (*Low-Range DNA Ladder*, ThermoFisher Scientific).

4.1.2.3 Quantificazione di *Plasmopara viticola* nelle foglie intere fresche

Per confermare la presenza di *P. viticola* nei campioni inoculati e l'assenza nei campioni controllo, è stata allestita una reazione di PCR con primer specifici per l'amplificazione della subunità ribosomiale (*LSU*) di *P. viticola*. L'analisi real time PCR ha confermato l'assenza di amplificazione nelle foglie intere fresche dei campioni trattati con acqua (controllo). Come atteso, il gene di *P. viticola* è risultato invece espresso nel campione inoculato con il patogeno (inoculato-locale; Figura 4.5).

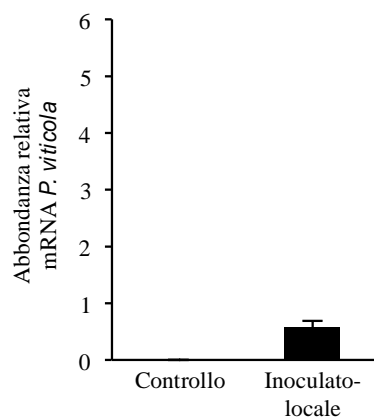


Figura 4.5: Quantificazione di *Plasmopara viticola* in foglie intere fresche.

Lo sviluppo di *P. viticola* è stato valutato tramite amplificazione del gene della subunità ribosomiale (*LSU*) di *P. viticola* nelle foglie intere fresche dei campioni trattati con acqua (controllo) e inoculati con il patogeno (inoculato-locale).

L'espressione è stata normalizzata rispetto al gene di vite *Actina_1*. L'F-test non ha rilevato differenze significative tra gli esperimenti ($P = 0,3$), e i dati di due esperimenti indipendenti sono stati raggruppati. Gli istogrammi indicano i valori medi di abbondanza relativa e gli errori standard di sette-nove repliche ottenute da due esperimenti. L'asse delle ordinate è riportato come in Figura 4.11 per una più facile comparazione.

4.1.2.4 Analisi dell'espressione genica in foglie intere fresche inoculate con *Plasmopara viticola*

La risposta della vite all'infezione è stata valutata attraverso l'analisi dell'espressione di dieci geni di difesa noti come marcatori della risposta a *P. viticola* (Tabella 3.9) mediante real time PCR nei campioni di foglie intere fresche trattate con acqua (controllo) o inoculate con *P. viticola* (inoculato-locale) raccolte a 1 dpi. Il livello di espressione relativo (*fold change*) dei geni di interesse è stato calcolato rispetto al campione controllo, utilizzando il gene costitutivo *Actina_1* per la normalizzazione (Figura 4.6). I geni che codificano per la proteina Thaumatin-like 5 (*TLP-5*) (Figura 4.6 A), per la proteina di patogenesi 2 (*PR-2*) (Figura 4.6 B) e per la proteina di patogenesi 4 (*PR-4*) (Figura 4.6 C) sono risultati rispettivamente indotti da *P. viticola* di 3,1, 3,8 e 2,9 volte. Anche l'espressione dei geni codificanti per la proteina Germin-like 7 (*GLP-7*), per Osmotina 1 (*OSM-1*) e per la proteina Thaumatin-like 4 (*TLP-4*) sono risultati rispettivamente indotti di 6,6, 3,8 e 2,9 volte (Figura 4.6 D-F). Nelle analisi sono stati inoltre valutati i geni codificanti per la proteina Germin-like 2 (*GLP-2*), per il fattore di trascrizione *NAC*, per una calcione isomerasi (*CHI*) e per una cellulosa sintasi (*CellS*) per i quali non è stata osservata una significativa differenza tra campioni inoculati con *P. viticola* e campioni controllo (Figura 4.6 G-L).

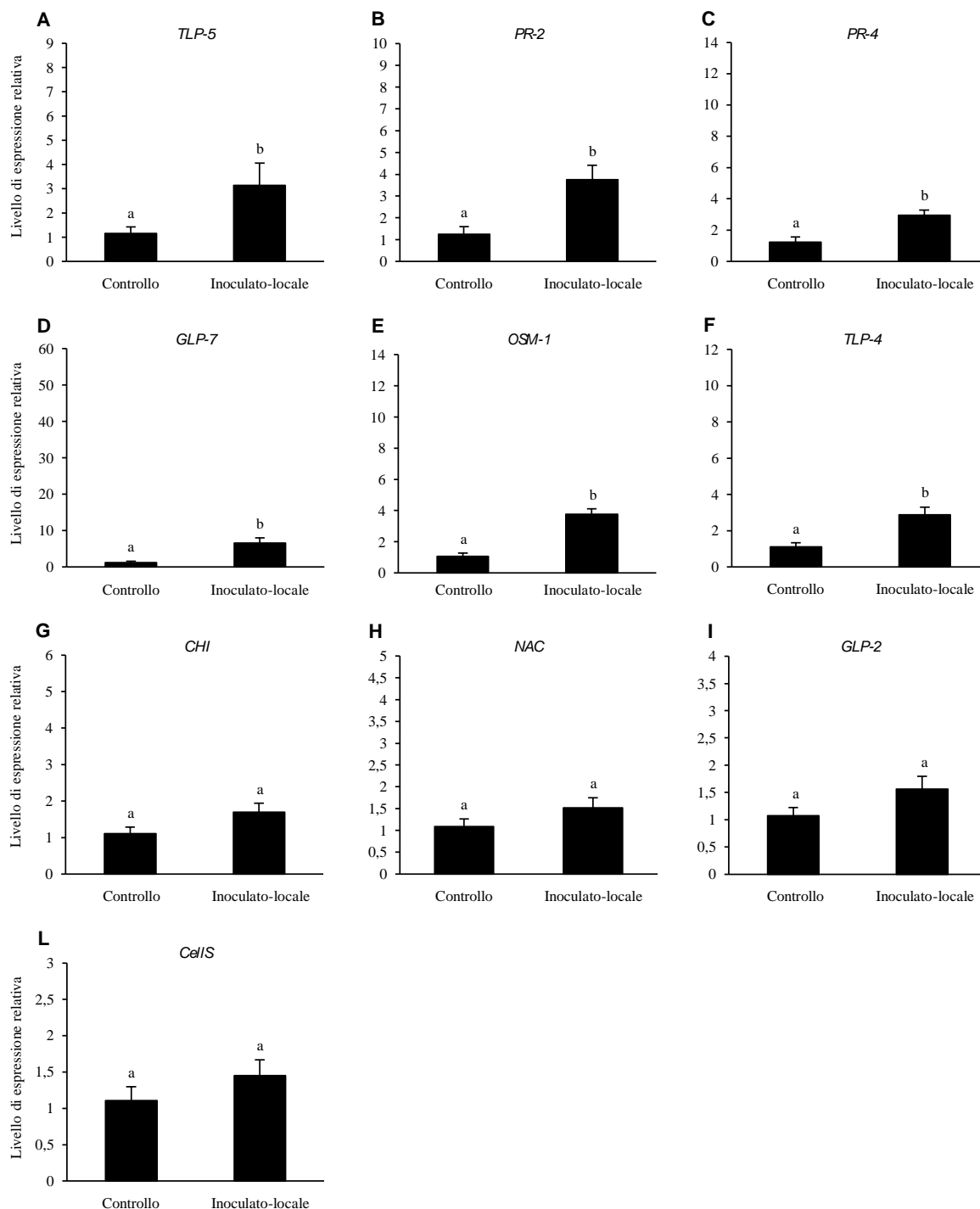


Figura 4.6: Analisi dell'espressione genica nelle foglie intere fresche di piante cresciute *in vitro*.

Il livello di espressione relativa dei geni che codificano per (A) la proteina Thaumatin-like 5 (*TLP-5*), (B) la proteina di patogenesi 2 (*PR-2*), (C) la proteina di patogenesi 4 (*PR-4*), (D) la proteina Germin-like 7 (*GLP-7*), (E) l'Osmotina 1 (*OSM-1*), (F) la proteina Thaumatin-like 4 (*TLP-4*), (G) la calcione isomerasi (*CHI*), (H) il fattore di trascrizione NAC (*NAC*), (I) la proteina Germin-like protein 2 (*GLP-2*) e (L) la cellulosa sintasi (*CellS*) è stato determinato tramite real time PCR. Le foglie sono state trattate con acqua (controllo) o inoculate con *P. viticola* (inoculato-locale) in condizioni sterili e campionate a un giorno dall'inoculo (1 dpi). Il livello di espressione relativa è stato calcolato rispetto al livello del campione controllo usando il gene costitutivo *Actina_1* per la normalizzazione. Per ciascun gene, l'F-test ha rilevato l'assenza di differenze significative ($P=0,2-0,8$) tra gli esperimenti e i dati di due esperimenti sono stati raggruppati. Gli istogrammi rappresentano i valori medi del livello di espressione e gli errori standard di sette-nove repliche ottenute da due esperimenti indipendenti. Per ciascun gene, le lettere diverse indicano differenze significative in accordo con il test di Fisher ($\alpha=0,05$). Gli assi delle ordinate sono riportati come in Figura 4.12 per una più facile comparazione.

4.1.3 Isolamento degli stomi e delle regioni circostanti mediante microdissezione laser di foglie inoculate con *Plasmopara viticola*

4.1.3.1 Ottimizzazione del protocollo di fissazione di foglie per la microdissezione laser

Per conservare gli acidi nucleici preservando la morfologia del campione sono stati analizzati due tipi di fissativi: etanolo-acido acetico (3:1) ed acetone 100% sulle foglie di piante cresciute *in vitro*. Entrambi i fissativi hanno dato buoni risultati nella preservazione della morfologia dei tessuti e hanno permesso di isolare accuratamente gli stomi dalle foglie. Tuttavia, l'analisi dell'RNA estratto mediante corsa elettroforetica capillare ha mostrato che solo dalle sezioni dopo la fissazione con acetone è possibile ottenere RNA di buona qualità. Al contrario, l'RNA estratto da foglie fissate in etanolo-acido acetico è risultato degradato (Figura 4.7).

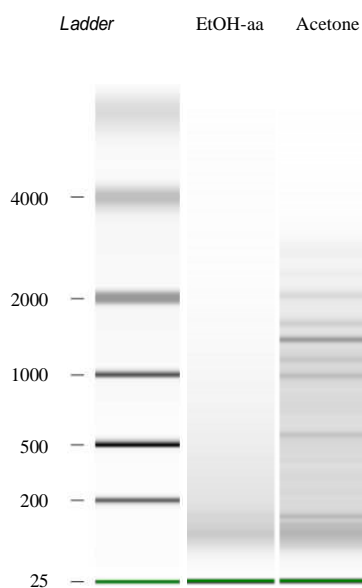


Figura 4.7: Elettroforesi capillare dell'RNA estratto da stomi di foglie fissate.

Elettroforesi dell'RNA totale estratto da 300 stomi raccolti da foglie fissate in etanolo-acido acetico (EtOH-aa) o in acetone 100% (Acetone). Il marcatore (in paia di basi) è mostrato sulla sinistra (*Ladder*).

Le analisi di conservabilità dei campioni hanno dimostrato che l'RNA si mantiene in buono stato in foglie fissate in acetone e conservate per massimo 14 giorni a -20°C prima della microdissezione laser. Al contrario dai campioni conservati per 18 o 21 giorni è stato estratto RNA degradato. Per determinare il numero minimo di stomi per avere sufficiente quantità di RNA, sono stati raccolti 1, 10, 50, 100, 300 e 500 stomi da foglie fissate in acetone, dimostrando che il numero di 300 stomi è il minimo per poter estrarre una quantità di RNA sufficiente (maggiore di 4 ng) per le analisi molecolari successive.

4.1.3.2 Microdissezione ed estrazione dell'RNA da stomi, regioni circostanti e da foglie intere fissate inoculate con *Plasmopara viticola*

I campioni dalle foglie controllo, dall'area inoculata (inoculato-locale) e dall'area non inoculata (inoculato-distale) di foglie inoculate con *P. viticola* sono stati fissati in acetone e direttamente sottoposti a microdissezione laser senza la necessità di effettuare delle sezioni con un microtomo o un criostato. Dai campioni fogliari fissati in acetone sono stati isolati 300 stomi (pari a 0,7-0,8 mm²) ed è stata isolata un'area equivalente per le regioni circostanti agli stomi (Figura 4.8). Gli stomi sono stati isolati dal campione controllo, dal campione inoculato-locale e dal campione inoculato-distale, mentre le regioni circostanti agli stomi sono state isolate dal campione controllo e dal campione inoculato-locale.

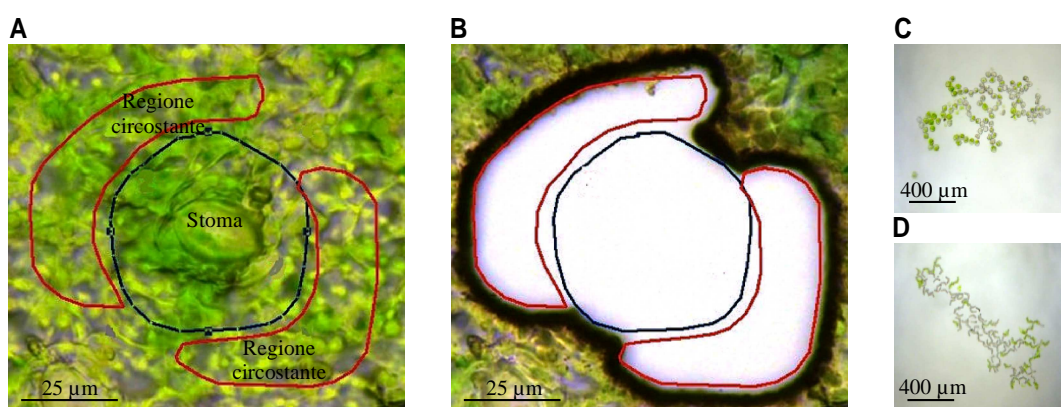


Figura 4.8: Microdissezione laser di stomi e regioni circostanti da foglie di piante cresciute *in vitro*.

La figura mostra la pagina inferiore della foglia con gli stomi e le regioni circostanti selezionati (A) prima e (B) dopo il taglio con il laser con microscopio Leica LMD7000. La presenza (C) degli stomi e (D) delle regioni circostanti è stata verificata nel tappo dei tubi da PCR al termine della microdissezione laser.

Per valutare se la preparazione del campione e il processo di microdissezione laser potessero alterare la qualità dell'RNA e l'espressione genica, l'estrazione dell'RNA è stata effettuata anche dalle foglie intere fissate e raccolte dopo il processo di selezione e taglio delle regioni di interesse (foglie intere fissate). Come mostrato nel profilo di separazione dell'RNA riportato in Figura 4.9, l'RNA è risultato di buona qualità confermando che il protocollo di preparazione del campione e la microdissezione laser non alterano la qualità dell'RNA totale. Partendo da tre mezze foglie, la resa di RNA nelle foglie intere fissate è risultata maggiore di 1,75 µg. In seguito all'estrazione dell'RNA dalle foglie intere fissate e dalle microdissezioni, è stato amplificato l'RNA ed è stato sintetizzato il cDNA, ottenendo così una sufficiente quantità di materiale per le successive analisi molecolari.

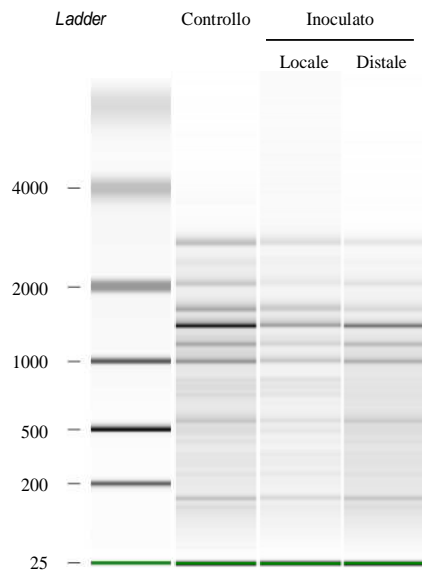


Figura 4.9: Elettroforesi capillare dell'RNA totale estratto da foglie intere fissate.

Le foglie sono state trattate con acqua e inoculate con *P. viticola* e i campioni sono stati raccolti a un giorno dall'inoculo da campioni controllo, dall'area inoculata (inoculato-locale) e dall'area non inoculata (inoculato-distale) di foglie inoculate con *P. viticola* e fissati in acetone 100%. Il marcatore (in paia di basi) è mostrato sulla sinistra.

4.1.3.3 Valutazione del cDNA ottenuto da foglie intere fissate e dalla microdissezione di stomi e regioni circostanti

Come per le foglie intere fresche (Paragrafo 4.1.2.2), il successo della reazione di retrotrascrizione è stato verificato mediante l'amplificazione del gene costitutivo *Actina* attraverso l'uso di primer disegnati tra due esoni, dimostrando l'assenza di DNA genomico nei campioni di cDNA ottenuti da foglie intere fissate e dalla microdissezione di stomi e regioni circostanti agli stomi di campioni trattati con acqua (controllo), dall'area inoculata (inoculato-locale) e non inoculata (inoculato-distale) di foglie inoculate con il patogeno (Figura 4.10).

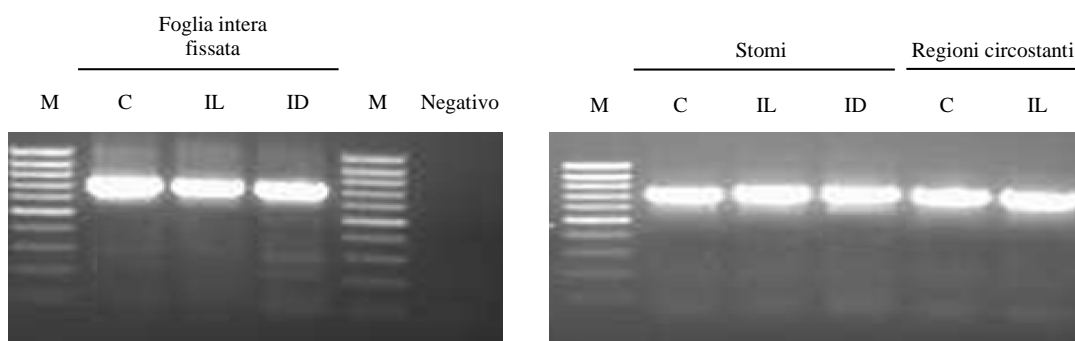


Figura 4.10: Controllo della qualità del cDNA ottenuto dalla microdissezione di stomi e regioni circostanti e dalle foglie intere fissate in seguito a microdissezione.

Come esempio è riportata la corsa elettroforetica del prodotto di PCR ottenuto con primer disegnati su due esoni del gene *Actina* di vite di campioni controllo (C), dall'area inoculata (inoculato-locale, IL) e dall'area non inoculata (inoculato-distale, ID) di foglie inoculate con *P. viticola*, in foglie intere fissate, stomi e regioni circostanti agli stomi. L'assenza di contaminazione di DNA è stata valutata mediante PCR con primer disegnati su due esoni del gene *Actina* di vite. La banda attesa dall'amplificazione del cDNA (709 bp) è stata ottenuta in tutti i campioni. M: marcatore di peso molecolare (*Low-Range DNA Ladder*, ThermoFisher Scientific)

4.1.3.4 Quantificazione di *Plasmopara viticola* nelle foglie intere fissate, negli stomi e nelle regioni circostanti

Come per le foglie intere fresche (Paragrafo 4.1.2.3), per confermare la presenza di *P. viticola* nei campioni inoculati è stata allestita una reazione di PCR con primer specifici per l'amplificazione del gene *LSU* di *P. viticola*. L'analisi real time PCR ha confermato l'assenza di amplificazione nelle foglie intere fissate del campione controllo e del campione inoculato-distale. L'assenza di amplificazione è stata ottenuta anche per gli stomi e per le regioni circostanti del campione controllo e del campione inoculato-distale. Il gene di *P. viticola* è risultato invece espresso nel campione inoculato-locale sia nella foglia intera fissata che negli stomi e regioni circostanti. Il gene *LSU* è stato amplificato anche nelle regioni circostanti agli stomi, ma l'espressione del gene è risultata 4 volte inferiore rispetto agli stomi (Figura 4.11).

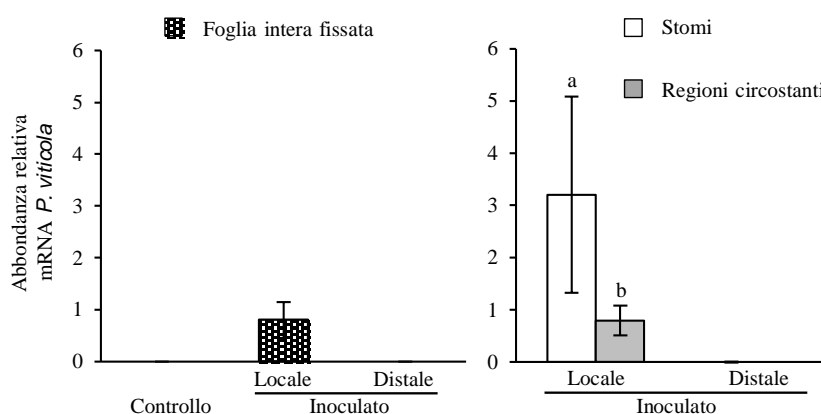


Figura 4.11: Quantificazione di *Plasmopara viticola* in foglie intere fissate, negli stomi e nelle regioni circostanti.

Lo sviluppo di *P. viticola* è stato valutato tramite amplificazione del gene della subunità ribosomiale (*LSU*) di *P. viticola* nelle foglie intere fissate, negli stomi e nelle regioni circostanti agli stomi dei campioni controllo, campioni inoculato-locale e inoculato-distale. L'espressione è stata normalizzata rispetto al gene di vite *Actina_1*. L'F-test non ha rilevato differenze significative tra gli esperimenti ($P = 0,3$) e i dati di due esperimenti indipendenti sono stati raggruppati. Gli istogrammi indicano i valori medi di abbondanza relativa e gli errori standard di sei-nove repliche ottenute da due esperimenti.

4.1.3.5 Analisi dell'espressione genica negli stomi e nelle regioni circostanti di foglie inoculate con *Plasmopara viticola*

L'espressione genica dei dieci geni marcatori della risposta della vite a *P. viticola* (Tabella 3.9) è stata valutata nelle foglie intere fissate, negli stomi e nelle regioni circostanti del campione controllo, del campione inoculato-locale e inoculato-distale (Figura 4.12). Per i geni *TLP-5*, *PR-2*, *PR-4*, *GLP-7*, *OSM-1*, *TLP-4*, *CHI*, *NAC*, e *GLP-2* non è stata osservata una significativa modulazione nella foglia intera fissata, negli stomi e nelle regioni circostanti sia da campioni trattati con acqua (controllo) che dall'area non inoculata (inoculato-distale) di foglie inoculate con il patogeno.

Il gene *TLP-5* è risultato indotto da *P. viticola* a livello comparabile tra stomi, regioni circostanti agli stomi e foglia intera fissata del campione inoculato-locale (Figura 4.12 A). Il livello di espressione dei geni *PR-2*, *PR-4*, e *GLP-7* era modulato da *P. viticola* nel campione inoculato-locale (Figura 4.12 B-D). Il livello di espressione di questi geni è risultato maggiormente indotto negli stomi (rispettivamente di 5,1, 5,3 e 16,8 volte per *PR-2*, *PR-4*, e *GLP-7*) e nelle regioni circostanti agli stomi (rispettivamente di 6,8, 8,4, e 5,0 volte per *PR-2*, *PR-4*, e *GLP-7*) rispetto alla foglia intera fissata. Il gene *OSM-1* ha mostrato un profilo di espressione simile a *PR-2*, *PR-4*, e *GLP-7* con un'induzione di 6,6 volte negli stomi e di 9,1 volte nelle regioni circostanti del campione inoculato-locale. Tuttavia, l'espressione di *OSM-1* nelle foglie intere fissate non è risultata modulata in maniera significativa nel campione inoculato-locale rispetto al campione controllo (Figura 4.12 E). Il livello di espressione del gene *TLP-4* era indotto in maniera significativa nel campione inoculato con *P. viticola* (rispettivamente di 2,9, 5,5 e 7,3 volte nelle foglie intere, negli stomi e nella regione circostante), ed era significativamente maggiore nel sito di infezione rispetto alla foglia intera fissata (Figura 4.12 F).

L'espressione dei geni *CHI* (Figura 4.12 G) e *NAC* (Figura 4.12 H) è risultata indotta in maniera significativa da *P. viticola* negli stomi (rispettivamente di 2,9 e 2,2 volte) e nelle regioni circostanti (rispettivamente di 3,7 e 3,6 volte), ma non nelle foglie intere fissate del campione inoculato-locale. L'espressione del gene *GLP-2* è significativamente modulata di 2,7 volte esclusivamente nelle regioni circostanti agli stomi, ma non nelle foglie intere fissate del campione inoculato-locale (Figura 4.12 I).

L'espressione del gene *CellS* non è risultata indotta da *P. viticola* nella foglia intera, negli stomi e nelle regioni circostanti sia del campione controllo, che inoculato-locale e inoculato-distale (Figura 4.12 L).

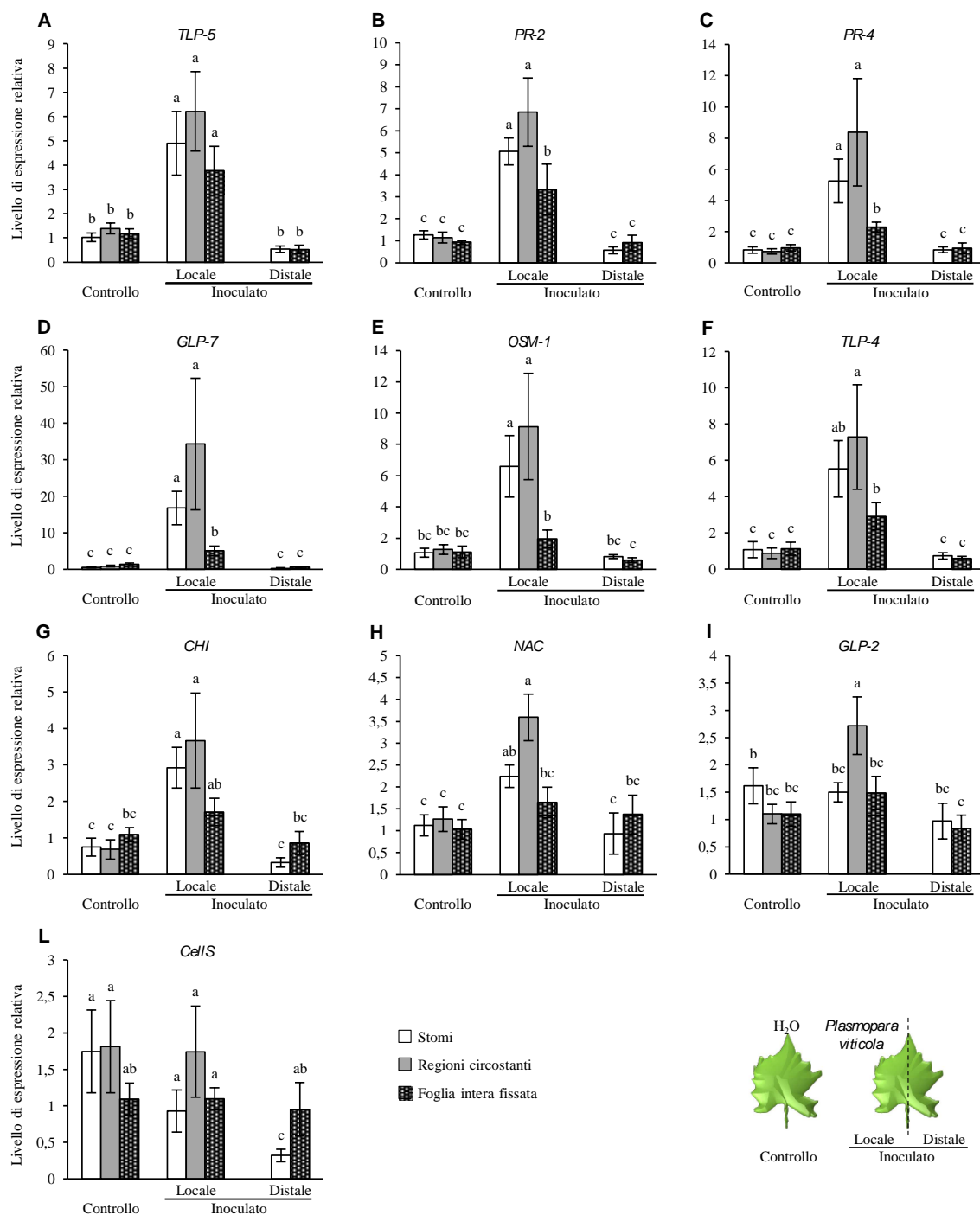


Figura 4.12: Analisi dell'espressione genica negli stomi, nelle regioni circostanti e nelle foglie intere fissate.

Il livello di espressione relativa dei geni codificanti per (A) la proteina Thaumatin-like 5 (*TLP-5*), (B) la proteina di patogenesi 2 (*PR-2*), (C) la proteina di patogenesi 4 (*PR-4*), (D) la proteina Germin-like 7 (*GLP-7*), (E) l'osmotina 1 (*OSM-1*), (F) la proteina Thaumatin-like 4 (*TLP-4*), (G) la calcione isomerasi (*CHI*), (H) il fattore di trascrizione NAC (*NAC*), (I) la proteina Germin-like protein 2 (*GLP-2*) e (L) la cellulosa sintasi (*CellS*) è stato determinato tramite real time PCR. Le foglie sono state trattate con acqua (controllo) o inoculate con *P. viticola* (inoculato-locale) in condizioni sterili, campionate un giorno dopo l'inoculo (1 dpi) e fissate in acetone 100%. L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata negli stomi, nelle regioni circostanti agli stomi e nelle foglie intere fissate ottenuti da campioni controllo, dall'area inoculata (inoculato-locale) e dall'area non inoculata (inoculato-distale) di foglie inoculate con il patogeno. Il livello di espressione relativa è stato calcolato rispetto al livello delle foglie intere fissate del campione controllo usando il gene *Actina_1* per la normalizzazione. Per ciascun gene, l'F-test ha rilevato l'assenza di differenze significative (valori di P tra 0,1 e 0,9) tra gli esperimenti e i dati di due esperimenti sono stati raggruppati. Gli istogrammi rappresentano i valori medi del livello di espressione e gli errori standard di sei-otto repliche ottenute da due esperimenti indipendenti. Per ciascun gene, le lettere diverse indicano differenze significative in accordo con il test di Fisher ($\alpha=0,05$).

4.2 Caratterizzazione delle piante di vite trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*

4.2.1 Selezione delle linee che mostrano silenziamento per i geni *MLO*

Dei 17 geni *MLO* identificati nel genoma della vite (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008), sono stati selezionati per il silenziamento i tre geni indotti da *E. necator* (*MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13*) (Winterhagen et al. 2008) e il gene *MLO-6* appartenente allo stesso gruppo filogenetico (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008). Per determinare un loro possibile ruolo nell'interazione con *E. necator*, un frammento specifico di ciascuno di questi quattro geni *MLO* è stato clonato ed è stata utilizzata la tecnica dell'*RNA interference* per ottenere piante silenziate. In totale sono state effettuate cinque trasformazioni: quattro con i costrutti per il silenziamento dei geni *MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13* ed una utilizzando un vettore vuoto (pK2WG7) come controllo. In seguito alla trasformazione dei calli embrionici, sono state rigenerate 37 linee in totale, di cui 29 hanno confermato l'inserimento del costrutto mediante PCR (Tabella 4.1).

Tabella 4.1: Numero delle linee di piante trasformate e rigenerate per ciascun costrutto.

Costrutto	Linee rigenerate	Conferma inserimento del costrutto
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-6</i>	1	1
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-7</i>	3	1
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-11</i>	13	10
pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-13</i>	13	11
pK2WG7	7	6
Totale	37	29

Il livello di espressione dei geni *MLO* è stato analizzato in piante cresciute *in vitro* mediante analisi real time PCR nelle 29 linee selezionate. Sei linee hanno mostrato un significativo silenziamento dei geni *MLO* e sono state ulteriormente analizzate: tre linee ottenute dalla trasformazione con il costrutto *MLO-13* e tre linee con il costrutto *MLO-11*. Le linee ottenute dalla trasformazione con i costrutti *MLO-6* e *MLO-7* hanno invece mostrato assenza di un significativo silenziamento per i geni *MLO* analizzati e non sono state quindi caratterizzate ulteriormente.

Le linee sono state denominate TLB (*Transgenic Line of Brachetto*): TLB1, TLB2 e TLB3 derivate dalla trasformazione con il costrutto *MLO-11*; TLB4, TLB5 e TLB6 con il costrutto *MLO-13*. Inoltre, sono state acclimate altre due linee: una linea controllo denominata EVB (*Empty Vector Brachetto*) trasformata con il vettore vuoto e una linea ottenuta dalla trasformazione con il gene *MLO-11* e caratterizzata da assenza di silenziamento dei geni *MLO* (TLB7).

Le linee trasformate sono state acclimate e trasferite in serra con una percentuale di sopravvivenza pari all'85%. Il silenziamento dei geni *MLO* non ha influenzato il fenotipo delle piante, che hanno mostrato una crescita e uno sviluppo paragonabile alle piante controllo sia *in vitro* che in serra.

La presenza del transgene nelle linee trasformate è stata ulteriormente validata tramite PCR nelle piante acclimate (Figura 4.13). La lunghezza dell'amplicone conferma l'inserimento dello specifico frammento veicolato da ogni costrutto: nelle linee TLB4, TLB5 e TLB6 l'amplicone è pari a 837 bp (dato da 210 bp del

promotore 35S e 627 bp del frammento del gene *MLO-13*), mentre l'amplicone presente in TLB1, TLB2 e TLB3 è pari a 714 bp (dato da 210 bp del promotore 35S e 504 bp del frammento dal gene *MLO-11*).

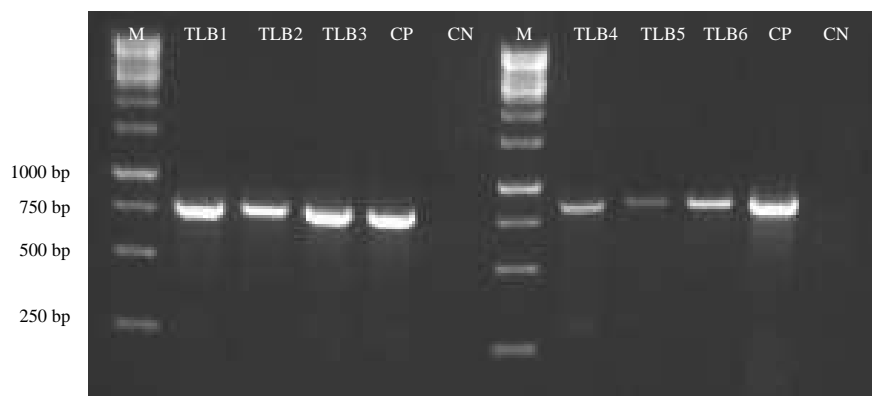


Figura 4.13: Presenza del transgene nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*. Corsa elettroforetica su gel di agarosio degli amplificati ottenuti nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5 e TLB6). La diversa altezza delle bande indica la diversa lunghezza dei frammenti dei geni *MLO* usati per la trasformazione. CP (controllo positivo): colonia di *Agrobacterium* usata per la trasformazione genica; CN (controllo negativo): DNA isolato dalla cultivar Brachetto a Grappolo lungo non trasformata; M: marcatore di peso molecolare (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*).

4.2.2 Analisi del grado di resistenza a *Erysiphe necator* delle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*

Le linee TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6, TLB7 e la linea controllo (EVB) sono state inoculate con *Erysiphe necator* in condizioni controllate. L'analisi della progressione della malattia (AUDPC) ha dimostrato una significativa riduzione dello sviluppo dell'oidio nelle linee TLB4, TLB5 e TLB6 rispetto alla linea EVB. Le linee TLB1, TLB2, TLB3 e TLB7 non hanno invece dimostrato significative differenze rispetto alla linea EVB (Figura 4.14).

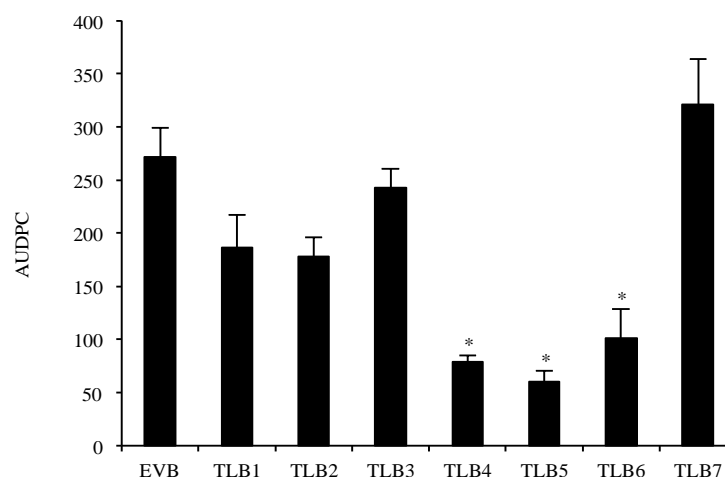


Figura 4.14: Analisi della progressione della malattia (AUDPC) di *Erysiphe necator* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6 e TLB7).

Gli istogrammi rappresentano i valori medi di AUDPC e gli errori standard di 8-19 repliche (piante) di 2 esperimenti indipendenti (F-test, $P > 0,05$). Gli asterischi indicano differenze significative rispetto alla linea EVB, in accordo con il test di Tukey ($\alpha = 0,05$).

Considerando i tre tempi di valutazione della severità della malattia (Figura 4.15), le linee TLB4, TLB5, TLB6, hanno dimostrato una ridotta severità della malattia rispetto alla linea EVB, pur mostrando un leggero incremento dell'infezione nel tempo. Al contrario, le linee TLB1, TLB2, TLB3 e TLB7 subiscono una diffusione del patogeno simile alla linea EVB. Le differenze nella percentuale di area fogliare coperta dalla sporulazione a 30 dpi sono mostrate nelle immagini della Figura 4.16.

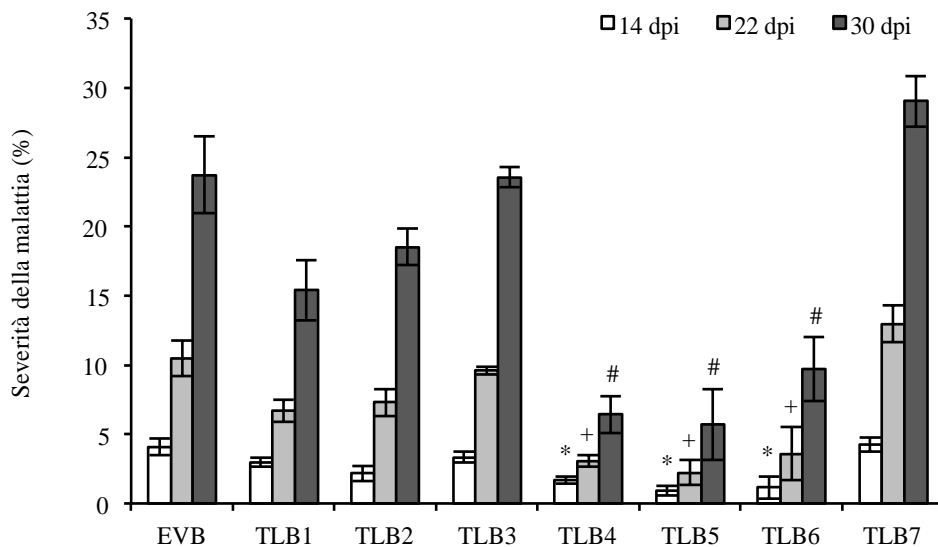


Figura 4.15: Severità dei sintomi dell'infezione di *Erysiphe necator* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6, TLB7). La severità della malattia è stata valutata come percentuale (%) di area fogliare coperta a 14, 22 e 30 giorni dall'inoculo (dpi). Gli istogrammi rappresentano i valori medi e gli errori standard di 8-19 repliche (piante) di due esperimenti indipendenti (F-test, $P > 0,05$). Per ciascun tempo, i diversi simboli indicano differenze significative rispetto alla linea EVB, in accordo con il test statistico di Tukey ($\alpha = 0,05$): * a 14dpi; + a 22 dpi; # a 30 dpi.

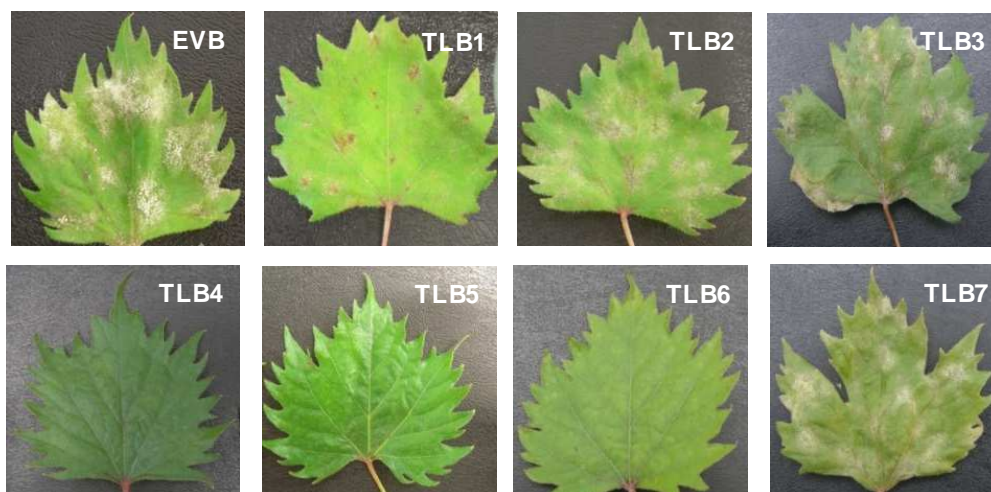


Figura 4.16: Osservazione macroscopica delle foglie in seguito ad infezione con oidio. Le immagini mostrano un esempio rappresentativo dello sviluppo del micelio fungino a 30 giorni dall'inoculo con *E. necator* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6, TLB7).

La percentuale media di riduzione della malattia è maggiore del 60% nelle linee TLB4, TLB5 e TLB6, mentre è minore del 50% per le altre linee (Tabella 4.2).

Tabella 4.2: Percentuale della riduzione della malattia nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6 e TLB7) calcolata rispetto alla severità della malattia nella linea EVB.

Linea	Costrutto	Riduzione della malattia (%)			Riduzione media (%)
		14 dpi	22 dpi	30 dpi	
TLB1	pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-11</i>	22,8	32,3	34,3	29,8
TLB2	pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-11</i>	49,2	37,2	23,8	36,8
TLB3	pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-11</i>	17,9	14,8	2,0	11,6
TLB4	pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-13</i>	60,8	71,7	72,8	68,4
TLB5	pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-13</i>	76,7	79,1	74	76,6
TLB6	pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-13</i>	71,8	63,1	60,3	65,1
TLB7	pK7GWIWG2D(II)- <i>MLO-11</i>	-8,0	-21,5	-21,2	-16,9

La misurazione dell'intensità della sporulazione ha confermato la resistenza delle linee TLB4, TLB5 e TLB6. L'oidio sviluppatosi su piante delle linee TLB4, TLB5 e TLB6 ha infatti prodotto una quantità di conidi per unità di superficie fogliare significativamente inferiore alle altre linee testate (Figura 4.17).

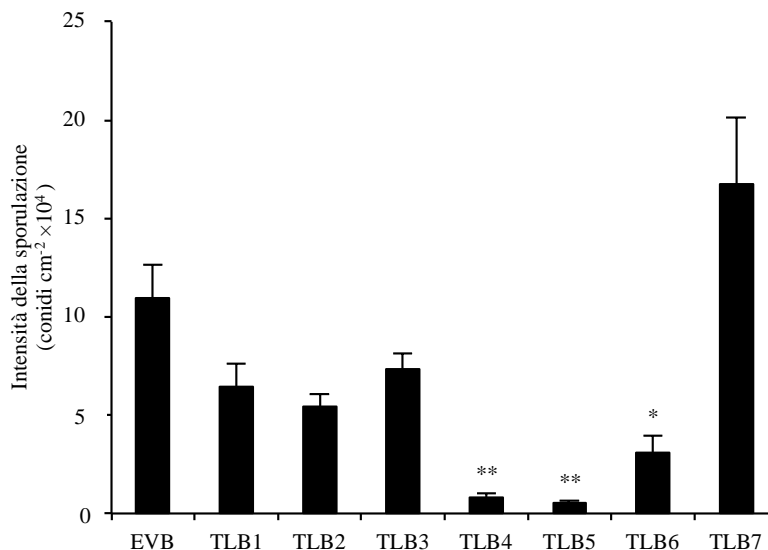


Figura 4.17: Intensità della sporulazione di *Erysiphe necator* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6 e TLB7). La severità della malattia è stata valutata come concentrazione di conidi di *Erysiphe necator* prodotti per cm² di superficie fogliare a 30 giorni dall'inoculo. Sono riportati i valori medi e gli errori standard di 8-19 repliche di due esperimenti indipendenti (F-test, $P > 0,05$). Un asterisco ($\alpha = 0,05$) e due asterischi ($\alpha = 0,01$) indicano differenze significative rispetto alla linea EVB, in accordo con il test statistico di Krustall-Wallis.

4.2.3 Analisi della resistenza a *Plasmopara viticola* delle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*

Per valutare se il silenziamento dei geni *MLO* contribuisce alla resistenza verso altri patogeni, le tre linee trasformate resistenti (TLB4) e non (TLB1 e TLB3) all'oidio sono state inoculate con *P. viticola*, dimostrando l'assenza di significative differenze rispetto alla linea EVB (Figura 4.18).

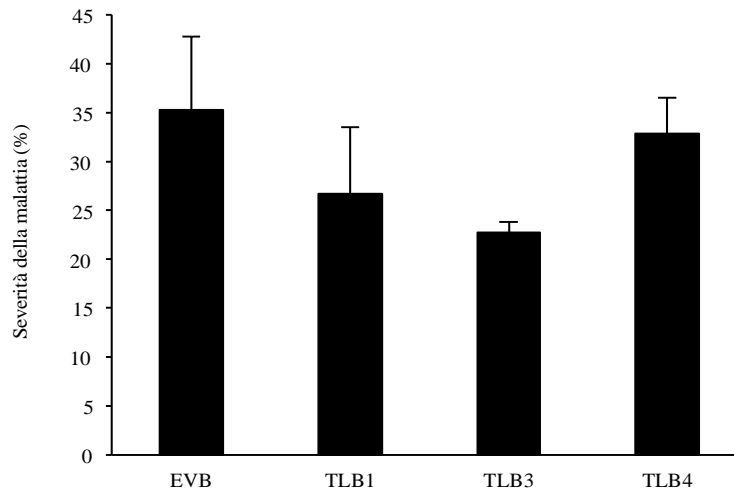


Figura 4.18: Severità dei sintomi dell'infezione di *Plasmopara viticola* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB3 e TLB4).

La severità della malattia è stata valutata a sette giorni dall'inoculo come percentuale (%) di area fogliare coperta da sporulazione. Gli istogrammi rappresentano i valori medi di severità e gli errori standard di 6-12 repliche da due esperimenti indipendenti (F-test, $P > 0,05$). Il test statistico di Tukey ($\alpha = 0,05$) non ha rivelato differenze significative tra le linee analizzate.

4.2.4 Analisi dell'espressione dei geni *MLO* nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*

L'espressione genica dei quattro geni *MLO* di vite (*MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11*, *MLO-13*) è stata valutata mediante real time PCR nelle sei linee che hanno mostrato silenziamento significativo per i geni *MLO in vitro* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6) e la linea EVB. L'analisi dell'espressione è stata condotta a 0, 1 e 10 dpi. Le linee TLB1, TLB2 e TLB3 derivano dalla trasformazione con il costrutto per il silenziamento del gene *MLO-11*, mentre le linee TLB4, TLB5 e TLB6 derivano dalla trasformazione con il costrutto per il silenziamento del gene *MLO-13*. L'analisi dell'espressione dei geni *MLO* ha messo però in evidenza che ogni linea presenta una diversa combinazione di silenziamento dei geni *MLO*, probabilmente a causa di un silenziamento non specifico tra geni *MLO* con elevata similarità di sequenza (Figura 4.19 e Tabella 4.3).

In particolare, il gene *MLO-6* è risultato silenziato in maniera significativa nelle linee TLB3, TLB4, TLB5 e TLB6 prima dell'inoculo con oidio. L'espressione del gene *MLO-6* è risultata silenziata nelle linee TLB1, TLB4, TLB5 e TLB6 a 1 dpi, e nelle linee TLB4, TLB5 e TLB6 a 10 dpi (Figura 4.19 A).

Il livello di espressione del gene *MLO-7* era significativamente minore nelle linee TLB4 e TLB5 rispetto alla linea EVB a 0 dpi. Il gene *MLO-7* era invece silenziato nelle linee TLB4 e TLB6 a 1 dpi, e nelle linee TLB4 e TLB5 a 10 dpi (Figura 4.19 B).

Il gene *MLO-11* è risultato silenziato significativamente in tutte le linee TLB a 0, 1, 10 dpi (Figura 4.19 C).

Infine, il gene *MLO-13* è risultato silenziato nelle linee TLB1, TLB4 e TLB6 a 0 dpi. Ad 1 dpi nessuna linea ha mostrato silenziamento significativo per il gene *MLO-13*, mentre l'espressione di questo gene è risultata silenziata significativamente nelle linee TLB1 e TLB4 a 10 dpi (Figura 4.19 D).

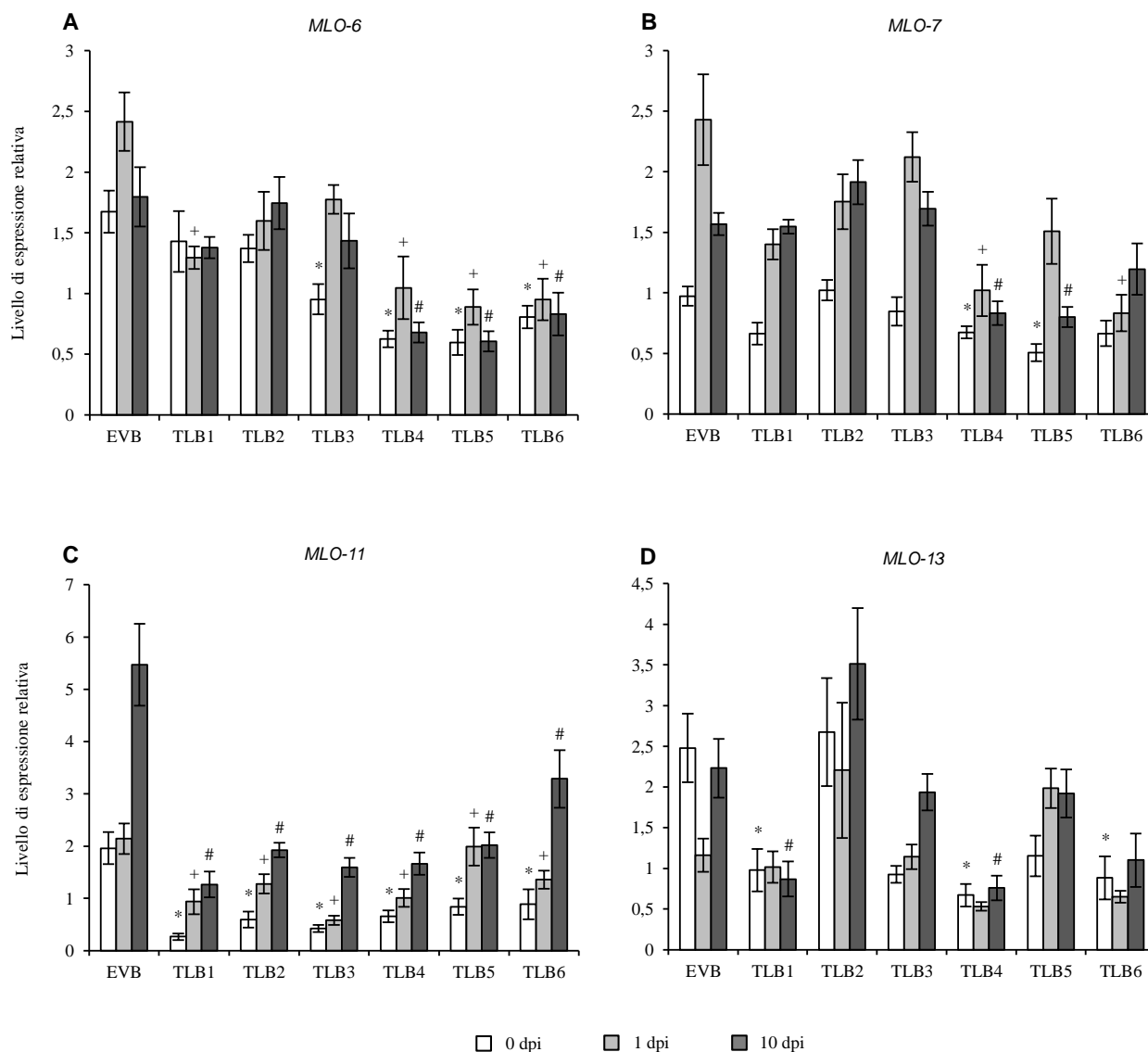


Figura 4.19: Analisi dell'espressione dei geni *MLO* nella linea controllo (EVB) e nelle linee trasformate con i costrutti per i geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6).

Il livello di espressione dei geni (A) *MLO-6*, (B) *MLO-7*, (C) *MLO-11* e (D) *MLO-13* è stato determinato tramite real time PCR. La linea EVB e le linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6) sono state inoculate con *Erysiphe necator* e le foglie sono state campionate a 0, 1 e 10 giorni dall'inoculo (dpi) con oidio. Il livello di espressione relativa è stata normalizzato per l'espressione dei geni *Actina_2*, *GADPH* e *EF-1 α* . Gli istogrammi rappresentano i valori medi del livello di espressione e gli errori standard di cinque-nove repliche (piante) ottenute da due esperimenti indipendenti (F-test, $P > 0,05$). Per ciascun tempo, i diversi simboli indicano differenze significative rispetto alla linea EVB, in accordo con il test di Tukey ($\alpha = 0,05$): * per 0 dpi; + per 1 dpi; # per 10 dpi.

La Tabella 4.3 riporta i valori di espressione relativa percentuale dei geni *MLO* nelle diverse linee TLB. L'espressione relativa percentuale è stata calcolata considerando la media dei valori di espressione a 0, 1 e 10 dpi in modo da avere una visione globale del silenziamento dei geni *MLO* nelle varie linee trasformate.

Nella linea TLB1 sono risultati silenziati in maniera significativa i geni *MLO-11* e *MLO-13*. La TLB2 ha mostrato invece solamente il silenziamento per il gene *MLO-11*, mentre nella TLB3 sono risultati silenziati i geni *MLO-6* e *MLO-11*. Le linee TLB4 e TLB6 hanno mostrato tutti i geni *MLO* silenziati in maniera significativa, mentre nella linea TLB5 sono silenziati i geni *MLO-6*, *MLO-7* e *MLO-11* (Tabella 4.3).

Tabella 4.3: Livello di espressione relativa percentuale dei geni *MLO* nelle linee trasformate con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB1, TLB2, TLB3, TLB4, TLB5, TLB6).

	<i>MLO-6</i>	<i>MLO-7</i>	<i>MLO-11</i>	<i>MLO-13</i>
TLB1	67	72	25**	49**
TLB2	79	94	40**	156
TLB3	71*	93	27**	69
TLB4	38**	49**	34**	33**
TLB5	35**	55**	50**	88
TLB6	42**	53**	55**	45**

** statisticamente significativo con $\alpha=0,05$, * statisticamente significativo con $\alpha=0,01$, in accordo con test di Tukey.

4.2.5 Caratterizzazione della linea TLB4 trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO*

4.2.5.1 Analisi istologica della linea TLB4 e della linea controllo EVB

La linea TLB4 ha mostrato una forte riduzione del grado di infezione da oidio (Paragrafo 4.2.2) e per questo motivo è stata scelta per essere ulteriormente caratterizzata. I campioni fogliari sono stati raccolti dalla linea EVB e dalla linea TLB4 a 3, 10 e 21 dpi. Nelle foglie della linea EVB è stata osservata la germinazione dei conidi con formazione di ife sviluppate a 3 dpi. A 10 dpi era visibile una diffusa crescita del micelio con formazione di rametti conidiofori che ricoprono la maggior parte della superficie fogliare a 21 giorni dall'inoculo (Figura 4.20 A). Nella linea TLB4 lo sviluppo del patogeno è risultato rallentato, a 3 dpi e 10 dpi solo pochi conidi erano germinati con minore crescita delle ife fungine rispetto alla linea EVB. A 21 giorni dall'inoculo la diffusione del micelio e la presenza di rametti conidiofori era inferiore nella linea TLB4 rispetto alla linea EVB (Figura 4.20 B).

L'analisi in microscopia fluorescente ha dimostrato un simile accumulo di composti fenolici autofluorescenti probabilmente associati alla risposta cellulare della pianta e alla formazione della papilla nelle linee EVB e TLB4 a 3 dpi (Figura 4.21).

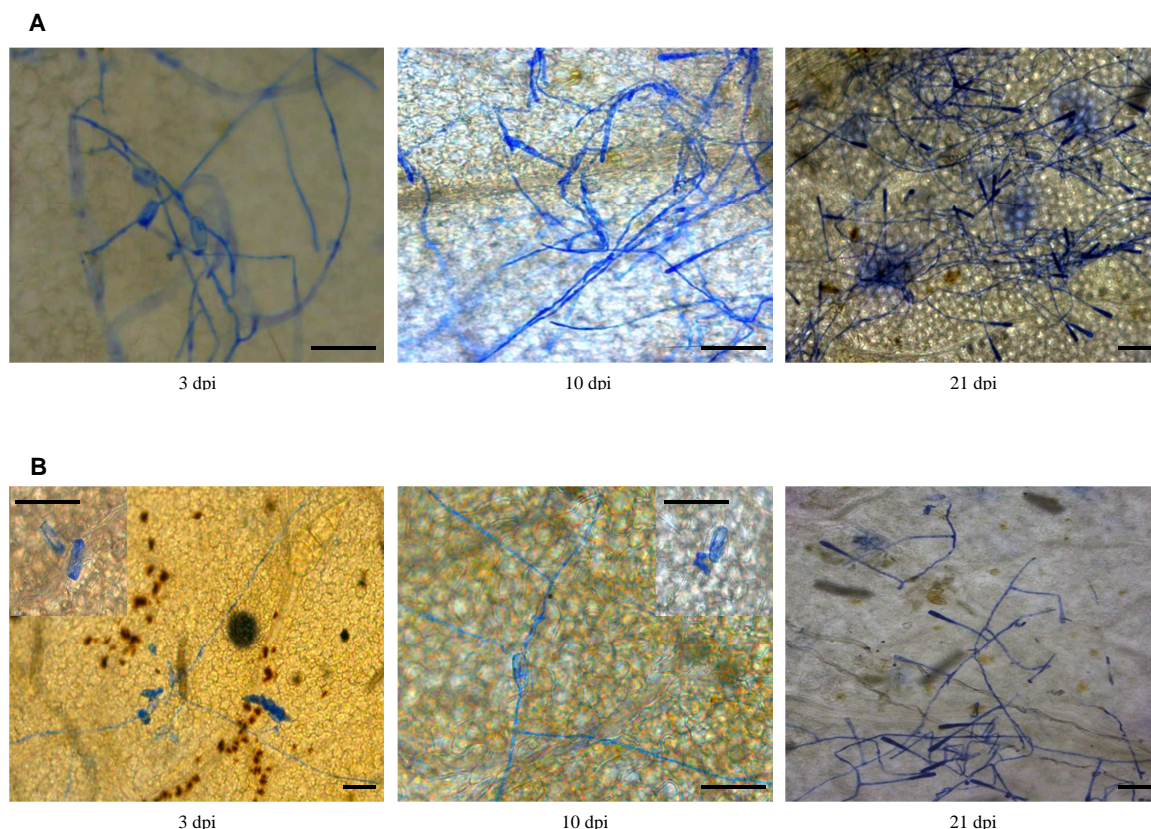


Figura 4.20: Analisi istologiche dello sviluppo di *Erysiphe necator* nelle foglie della linea controllo (EVB) e della linea trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB4) a 3, 10 e 21 giorni dall'inoculo (dpi) con il patogeno. L'infezione con *E. necator* è stata valutata in foglie delle linee (A) EVB e (B) TLB4 in seguito a colorazione con blu di anilina. La barra riportata in figura indica una lunghezza pari a 50 µm.

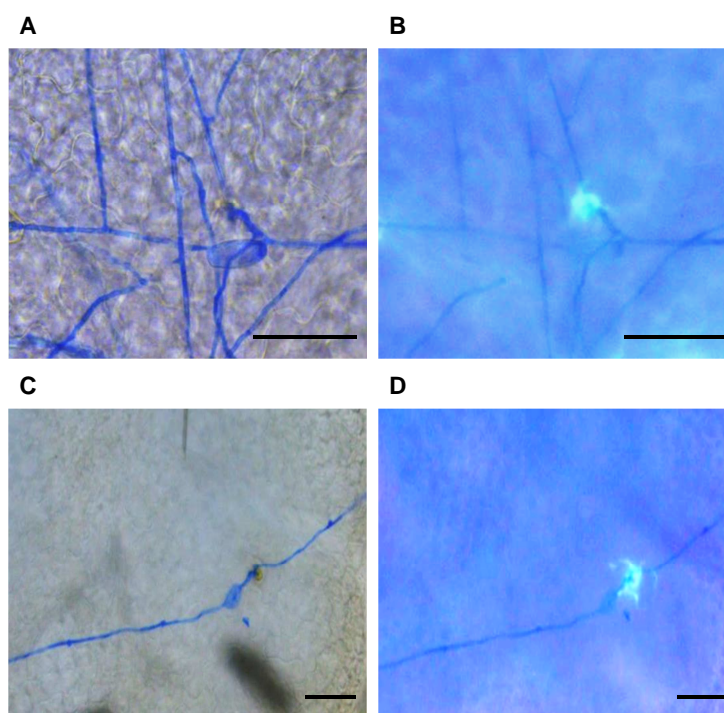


Figura 4.21: Formazione della papilla nella linea controllo (EVB) e nella linea trasformata con il costrutto per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB4). Le immagini delle foglie delle linee (A, B) EVB e (C, D) TLB4 sono state acquisite in (A, C) campo chiaro e (B, D) in fluorescenza (filtro LMD, filtro eccitazione BP 380-420nm, 415 dichroic mirror, e emissione BP 445-485) a 3 giorni dall'inoculo di *E. necator*. La barra riportata in figura indica una lunghezza pari a 50 µm.

4.2.5.2 Analisi dell'espressione di geni legati alla risposta della vite ad oidio nella linea TLB4 e nella linea controllo EVB.

Le linee EVB e TLB4 sono state ulteriormente analizzate per l'espressione genica di 13 geni legati alla risposta della vite ad oidio (Tabella 3.10) a 0, 1 e 10 dpi. Nella linea EVB sette geni sono risultati indotti in maniera significativa a 10 dpi. In particolare, i geni codificanti per Enhanced disease susceptibility (*EDS-1*) (Figura 4.22 A) e per Phytoalexin deficient 4 (*PAD-4*) (Figura 4.22 B) sono risultati indotti di 1,67 e di 4,5 volte. L'espressione dei geni codificanti per la proteina di patogenesi PR-1 (*PR-1*) e per la proteina di patogenesi PR-6 (*PR-6*) (Figura 4.22 C-D) erano modulati rispettivamente di 3,7 e 12 volte. I geni codificanti per i fattori di trascrizione WRKY-19, WRKY-48 e WRKY-52 sono risultati indotti dal patogeno di 2, 3,8 e 7 volte (Figura 4.22 E-G). Il gene codificante per il fattore di trascrizione WRKY-52 è risultato indotto da oidio anche a 1 dpi (Figura 4.22 E). L'espressione del gene codificante per Nitrate transporter1/Peptide transporter family (*NPF-3.2*) era modulata di 1,9 volte a 1 dpi (Figura 4.10 H).

Nella linea TLB4 sono risultati modulati da oidio solamente tre geni. In particolare, l'espressione del gene codificante per la lipossigenasi 1 (*LOX-1*) era indotto di 5,4 volte a 10 dpi (Figura 4.22 I). I geni codificanti per il fattore di trascrizione WRKY-52 e WRKY-19 sono risultati indotti rispettivamente di 2,9 e 4 volte a 1 dpi e di 1,9 e 3,8 volte a 10 dpi (Figura 4.22 E-G). L'espressione del gene codificante per un Trasportatore $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (*NPF-3.2*) è risultata minore rispetto alla linea EVB a 10 dpi (Figura 4.22 H).

Nessun gene analizzato ha mostrato differenze significative nel livello di espressione nella linea TLB4 prima dell'inoculo con il patogeno.

Alcuni geni analizzati non sono tuttavia risultati modulati significativamente nelle linee EVB e TLB4, come il gene codificante per l'acetolattato sintasi (Figura 4.22 L), per la lipossigenasi 9 (*LOX-9*) (Figura 4.22 M), il gene codificante per una proteina SNARE coinvolta nella penetrazione di oidio (*PEN-1*) (Figura 4.22 N) e il gene codificante per il fattore di trascrizione WRKY-27 (Figura 4.22 O).

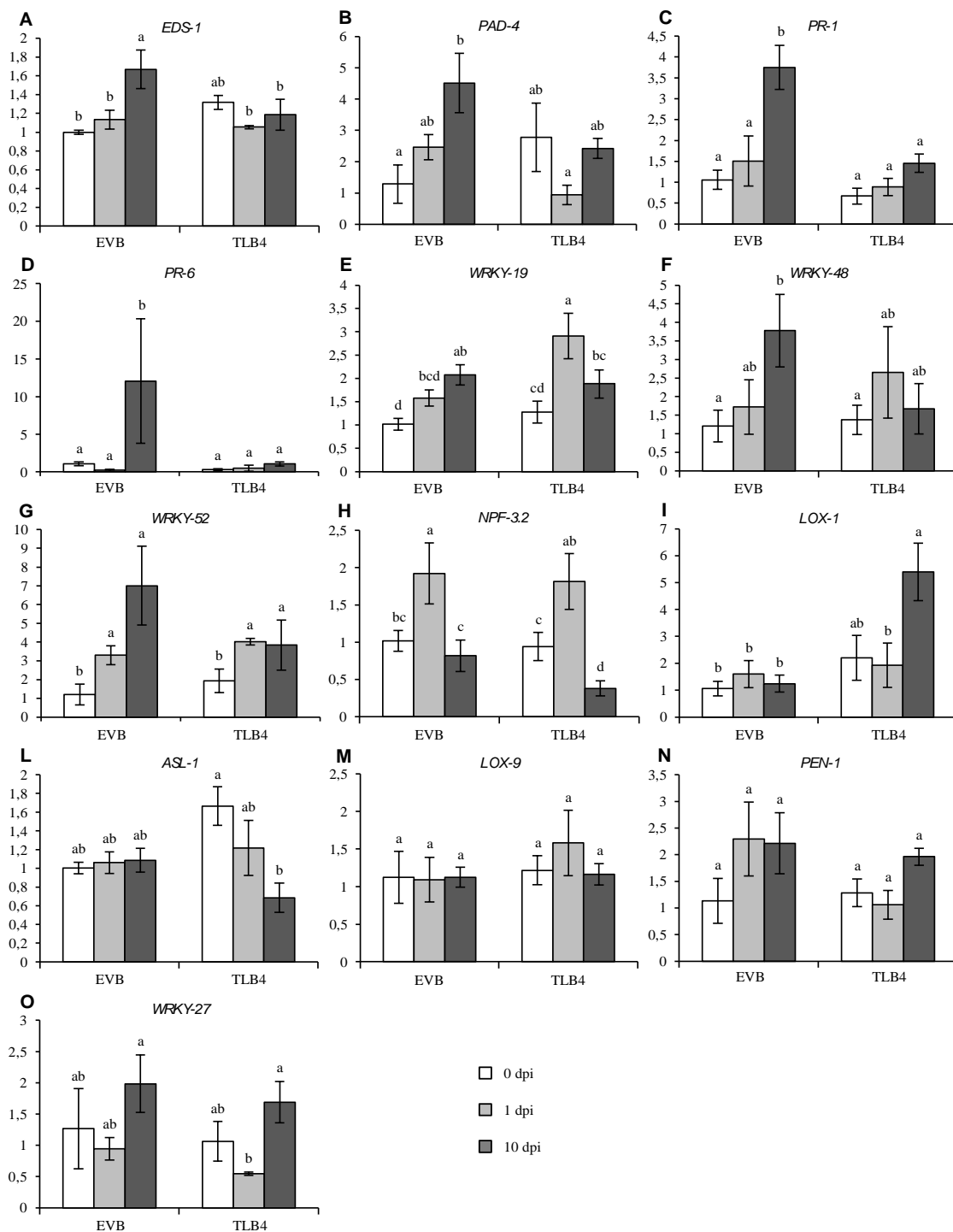


Figura 4.22: Analisi dell'espressione genica nella linea controllo (EVB) e nella linea trasformata per il silenziamento dei geni *MLO* (TLB4).

Il livello di espressione relativa dei geni codificanti (A) per la proteina Enhanced disease susceptibility (*EDS-1*), (B) per la proteina Phytoalexin deficient 4 (*PAD-4*), (C) per la proteina di patogenesi 1 (*PR-1*), (D) per la proteina di patogenesi 6 (*PR-6*), (E) per il fattore di trascrizione WRKY19 (*WRKY-19*), (F) per il fattore di trascrizione WRKY48 (*WRKY-48*), (G) per il fattore di trascrizione WRKY52 (*WRKY-52*), (H) per la proteina Nitrate transporter1/Peptide transporter family (*NPF-3.2*), (I) per la lipossigenasi 1 (*LOX-1*), (L) per la proteina acetolattato sintasi (*ASL-1*), (M) per la lipossigenasi 9 (*LOX-9*), (N) per la proteina SNARE (*PEN-1*), (O) per il fattore di trascrizione WRKY27 (*WRKY-27*) è stato determinato tramite real time PCR. Le linee EVB e TLB4 sono state inoculate con *E. necator* e le foglie sono state campionate a 0, 1 e 10 giorni dall'inoculo (dpi). Il livello di espressione relativa è stata calcolato rispetto al livello della linea EVB a 0 dpi, usando i geni *Actina_2*, *GADPH* e *EF-1a* per la normalizzazione. Gli istogrammi rappresentano i valori medi del livello di espressione e gli errori standard di cinque-nove repliche (piante) ottenute da due esperimenti indipendenti (F-test, $P > 0,05$). Per ciascun gene, le lettere diverse indicano differenze significative in accordo con il test di Fisher ($\alpha=0,05$).

5 DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi sono stati applicati gli approcci di microdissezione laser e di silenziamento genico con l'obiettivo di comprendere i meccanismi di difesa della vite alla peronospora e all'oidio per in seguito sviluppare metodi sostenibili per il controllo di queste due gravi malattie.

5.1 La microdissezione laser di foglie di vite rivela una risposta sito-specifica alla peronospora

L'interazione tra la vite e la peronospora è stata largamente studiata con analisi molecolari, sia in genotipi resistenti che suscettibili, analizzando l'intera foglia (Kortekamp 2006, Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Polesani et al. 2010, Wu et al. 2010, Gamm et al. 2011, Perazzolli et al. 2012, Li et al. 2015, Merz et al. 2015). Tuttavia, ai primi stadi di infezione del patogeno solo poche cellule sono realmente in contatto con il patogeno (Unger et al. 2007, Godard et al. 2009) e le restanti parti di tessuto fogliare non infette possono mascherare le risposte di difesa localizzate al sito di infezione (Coker et al. 2015). Per caratterizzare la risposta della vite alla peronospora nel sito di infezione del patogeno (gli stomi) e nelle regioni circostanti, è stato innanzitutto ottimizzato il protocollo per la microdissezione laser delle foglie di vite. La fissazione del campione per la microdissezione ha lo scopo di conservare gli acidi nucleici preservando la morfologia del campione stesso (Balestrini and Bonfante 2008), ma la scelta del fissativo e della metodica di fissazione dipende dal tipo di tessuto da analizzare (Nelson et al. 2006). Dei due fissativi analizzati, l'acetone 100% è risultato il migliore in quanto ha permesso di preservare la morfologia del campione e di estrarre RNA in sufficiente quantità e qualità per le successive analisi molecolari. L'efficacia del protocollo di fissazione è stata confermata dall'analisi della foglia fissata (foglia intera fissata), dimostrando l'estrazione di RNA di buona qualità e i profili di espressione genica comparabili a quelli ottenuti dall'analisi della foglia intera non fissata (foglia intera fresca). Il protocollo ha permesso di sottoporre i campioni fogliari fissati alla microdissezione laser senza la necessità di effettuare delle sezioni con il microtomo o il criostato. Questo ha consentito di ridurre i tempi di preparazione del campione, evitando l'inclusione in paraffina, che è una procedura molto lunga e laboriosa necessaria per il sezionamento al microtomo (Day et al. 2005), e di preservare la morfologia del tessuto originale, evitando il criosezionamento ed il conseguente rischio di danneggiamento dei tessuti a causa della formazione di cristalli di ghiaccio (Balestrini and Bonfante 2008). Il metodo per la microdissezione laser ottimizzato in questo lavoro offre quindi il vantaggio di isolare rapidamente le cellule di interesse in base alla loro morfologia senza particolari preparazioni. Questo protocollo permette anche di evitare la preparazione di protoplasti da piante trasformate con uno specifico marcatore fluorescente, che è invece necessaria per la tecnica FACS recentemente applicata in *A. thaliana* per studiare la risposta nelle cellule infette dal patogeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Coker et al. 2015).

L'utilizzo di piante di vite cresciute *in vitro* ha permesso di escludere la presenza di microorganismi contaminanti (Barlass et al. 1986, Dai et al. 1995) e di studiare la specifica interazione della vite con *P. viticola*, senza potenziali interferenze dovute ad altri microorganismi presenti sulle foglie o nella sospensione di inoculo. Le osservazioni istologiche hanno evidenziato la formazione dell'ifa primaria e della vescicola sottostomatica ad 1 dpi, confermando l'instaurarsi delle prime fasi dell'interazione ospite-patogeno (Unger et al. 2007, Díez-Navajas et al. 2008, Godard et al. 2009, Liu et al. 2015) e consentendo così lo studio della risposta precoce della

vite all'infezione di *P. viticola*. È stato infatti dimostrato che la resistenza alla peronospora è principalmente basata su un meccanismo post-infezione (Polesani et al. 2010), che viene attivato nelle prime fasi dell'interazione con il patogeno (Unger et al. 2007, Díez-Navajas et al. 2008, Polesani et al. 2010, Liu et al. 2015). Ai primi stadi dell'infezione di *P. viticola*, viene infatti attivata una risposta di difesa anche in varietà di vite suscettibili ed essa è caratterizzata dalla modulazione dei geni di difesa (Hamiduzzaman et al. 2005, Trouvelot et al. 2008, Legay et al. 2010, Polesani et al. 2010, Perazzolli et al. 2011, Perazzolli et al. 2012). In seguito, con l'avanzare dell'infezione, si instaura invece una relazione di tipo compatibile tra la pianta e il patogeno con repressione dei geni di difesa (Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Gamm et al. 2011). Lo studio della reazione precoce della vite alla peronospora è quindi di fondamentale importanza per comprendere i meccanismi di risposta e per permettere l'identificazione di nuovi marcatori per la selezione di varietà resistenti a questa malattia. Le osservazioni al microscopio hanno permesso di stimare la percentuale di stomi infetti a 1 dpi, che era pari al 18% in accordo con Yu et al. (2012). La presenza di *P. viticola* è stata ulteriormente confermata mediante l'amplificazione di un gene specifico di *P. viticola* (Gindro et al. 2014) nelle foglie intere e negli stomi del campione inoculato-locale. Il gene di *P. viticola* è risultato espresso anche nelle regioni vicine allo stoma. Questo può essere legato al fatto che la lunghezza dell'ifa primaria del patogeno è pari a circa 40 µm a 1 dpi (Unger et al. 2007) e l'area degli stomi isolati era pari a circa 2000 µm² (raggio di 25 µm), indicando quindi il possibile campionamento di alcune porzioni delle ife di *P. viticola* nelle regioni circostanti gli stomi.

Negli stomi e nelle regioni circostanti sono stati analizzati i livelli di espressione di dieci geni noti come marcatori della risposta della vite alla peronospora (Godfrey et al. 2007, Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Perazzolli et al. 2011, Perazzolli et al. 2012, Santi et al. 2013) e sono stati comparati con quelli della foglia intera. I geni selezionati codificano per sette proteine di patogenesi (*PR-2*, *PR-4*, *TLP-4*, *TLP-5*, *GLP-2* e *GLP-7*), un fattore di trascrizione (*NAC*) e due enzimi coinvolti nella produzione di metaboliti secondari (*CHI* e *CellS*). L'espressione dei geni *PR-2*, *PR-4*, *OSM-1* e *GLP-7* è risultata indotta da *P. viticola* nelle foglie intere fresche, in accordo con i risultati riportati in letteratura (Godfrey et al. 2007, Perazzolli et al. 2011, Perazzolli et al. 2012). L'assenza di induzione dei geni *GLP-2*, *CHI*, *NAC* e *CellS* nelle foglie intere (Godfrey et al. 2007, Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010) potrebbe essere invece dovuta alle diverse condizioni utilizzate, come il genotipo di vite, il momento del campionamento o il metodo impiegato per l'inoculo. La risposta trascrizionale all'infezione di *P. viticola* può infatti variare a seconda del genotipo della pianta ospite (Banani et al. 2014) e il gene *CellS* era indotto da *P. viticola* nella cultivar Riesling (Polesani et al. 2008) mentre in questo studio è stata usata la cultivar Pinot Noir. L'induzione dei geni *GLP-2* e *NAC* era stata invece osservata ad uno stadio avanzato dello sviluppo del patogeno (14 dpi) (Godfrey et al. 2007, Polesani et al. 2008), suggerendo che è necessaria una maggiore infezione di *P. viticola* per misurare la modulazione di questi geni nella foglia intera. In Legay et al. (2010), l'espressione del gene *CHI* era modulata in foglie di piante cresciute in serra dopo inoculo di *P. viticola* con uno spruzzatore manuale. Al contrario, il gene *CHI* è risultato indotto solamente negli stomi e nelle regioni circostanti gli stomi da foglie di piante cresciute *in vitro* in seguito all'inoculo sterile di *P. viticola*. Similmente, i geni *PR-4* e *OSM-1* avevano dimostrato una modulazione più intensa (induzione di 5 volte) in seguito all'infezione di *P. viticola* in serra (Perazzolli et al. 2011) rispetto a quanto osservato in questo studio (induzione di 3,8 volte), suggerendo che l'inoculo mediante uno spruzzatore manuale e le condizioni della serra possono determinare una maggiore induzione dei geni *CHI*, *PR-4* e *OSM-1* nella foglia intera.

La modulazione di sette geni (*PR-2*, *PR-4*, *OSM-1*, *GLP-7*, *GLP-2*, *TLP-4* e *NAC*) era generalmente maggiore negli stomi e nelle regioni circostanti rispetto alla foglia intera, indicando una regolazione trascrizionale sito-specifica della risposta della vite a *P. viticola*. In particolare, la modulazione dei geni di difesa *PR-2*, *PR-4* e *OSM-1* negli stomi e nelle regioni circostanti suggerisce l'attivazione della reazione tipica dei genotipi di vite suscettibili (Polesani et al. 2010) in corrispondenza del sito di infezione ad 1 dpi. L'espressione dei geni *GLP-2*, *NAC* e *CHI* è risultata indotta da *P. viticola* nelle microdissezioni e non nella foglia intera, indicando che la microdissezione ha permesso di misurare modulazioni geniche che sono invece mascherate nell'analisi della foglia intera. La tecnica della microdissezione laser ha quindi aumentato la sensibilità delle analisi trascrizionali, consentendo l'identificazione di modulazioni geniche altrimenti non misurabili, o misurabili con minore intensità, nell'analisi della foglia intera.

Le due isoforme *GLP-2* e *GLP-7* differiscono nei profili di espressione nei campioni ottenuti da microdissezione laser, indicando un loro diverso ruolo nella reazione della vite all'infezione di *P. viticola*. La proteina *GLP-2* è omologa a *GER1* di *Pisum sativa* (Godfrey et al. 2007), la quale codifica per un recettore di una proteina batterica (Swart et al. 1994). La modulazione del gene *GLP-2* esclusivamente nella regione circostante gli stomi suggerisce un possibile ruolo di *GLP-2* nel riconoscimento di *P. viticola* nelle cellule adiacenti al sito di infezione. La proteina *GLP-7* è invece omologa alla proteina dell'epidermide *GER4* di *Hordeum vulgare* (Godfrey et al. 2007) che è coinvolta nella formazione della papilla nei siti di infezione per bloccare la penetrazione del patogeno *Blumeria graminis* (Wei et al. 1998). Il gene *GLP-7* è risultato indotto negli stomi e nelle regioni circostanti indicando un possibile ruolo nell'arrestare la diffusione di *P. viticola* nel sito di infezione e nelle cellule vicine. Anche i geni *TLP* hanno mostrato un profilo di espressione specifico per ciascuna isoforma, come osservato in risposta all'infezione dell'agente causale del legno nero della vite (Santi et al. 2013). I geni *TLP* appartengono alla famiglia delle proteine di patogenesi *PR-5*, che presentano attività tossica contro funghi e oomiceti (Monteiro et al. 2003, van Loon et al. 2006) alterando la permeabilità della membrana del patogeno mediante la formazione di pori (van Loon et al. 2006). Il gene *TLP-5* è risultato espresso a livello comparabile negli stomi, nelle regioni circostanti e nella foglia intera indicando una risposta globale della foglia all'infezione di *P. viticola*. Al contrario, il gene *TLP-4* ha mostrato un'induzione maggiore negli stomi e nelle regioni circostanti rispetto alla foglia intera, indicando una regolazione più localizzata di questo gene per bloccare l'invasione del patogeno. I geni *CHI* e *NAC* sono risultati modulati esclusivamente negli stomi e nelle regioni circostanti ma non nella foglia intera. In particolare, il gene *CHI* codifica per un enzima della via dei fenilpropanoidi responsabile nella produzione di fitoalessine (Legay et al. 2010) e la sua modulazione localizzata è in accordo con l'accumulo di queste molecole di difesa nei siti di infezione di *P. viticola* (Slaughter et al. 2008). Il profilo di espressione del fattore di trascrizione *NAC* era simile a quello dei geni di difesa *TLP-4* e *GLP-2*, ma sono necessari studi più approfonditi per avvalorare il coinvolgimento di questo fattore di trascrizione nella regolazione sito-specifica della risposta della vite a *P. viticola*. La modulazione dei geni *PR-2*, *PR-4*, *GLP-7*, *OSM-1*, *TLP-4*, *TLP-5*, *CHI* e *NAC* era comparabile tra gli stomi e le regioni circostanti suggerendo la localizzazione dell'espressione nel sito di infezione e la produzione di segnali cellulari con un'azione a breve distanza all'interno del tessuto infetto. Allo stesso modo, è stato dimostrato che il rimodellamento dell'actina associato alla risposta di difesa della vite a *P. viticola* è attivato sia negli stomi sia nelle cellule vicine allo stoma non direttamente a contatto con il patogeno (Guan et al. 2014). Le cellule di guardia dello stoma potrebbero quindi agire come dei custodi del poro di ingresso, inviando segnali alle cellule

vicine durante l'infezione di *P. viticola* (Guan et al. 2014). Nessuno dei geni analizzati è risultato modulato da *P. viticola* in porzioni di tessuto distali rispetto al sito di infezione, nemmeno il gene *PR-4* che è marcatore dell'ormone di difesa JA (Hamiduzzaman et al. 2005), suggerendo l'assenza di segnali cellulari a lunga distanza dal sito di infezione nelle prime fasi dello sviluppo del patogeno.

5.2 Il silenziamento dei geni *MLO* riduce la suscettibilità della vite ad oidio

In lavori precedenti è stato dimostrato che il silenziamento dei geni *MLO* conferisce resistenza all'oidio in diverse specie erbacee, come orzo (Büschges et al. 1997), *A. thaliana* (Consonni et al. 2006), pomodoro (Bai et al. 2008), pisello (Pavan et al. 2011), peperone (Zheng et al. 2013), frumento (Wang et al. 2014) e cetriolo (Nie et al. 2015). Al contrario, non è stato al momento studiato il ruolo dei geni *MLO* nelle specie arboree o poliennali. Nella vite sono stati identificati 17 geni *MLO* (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008). Sei di essi (*MLO-3*, *MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-8*, *MLO-11* e *MLO-13*) appartengono al gruppo V (Winterhagen et al. 2008), che comprende le proteine *MLO* con un ruolo nella suscettibilità all'oidio nelle specie erbacee (Jørgensen 1992, Kim et al. 2002, Elliott et al. 2005, Consonni et al. 2006). In particolare, le proteine *MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13* sono filogeneticamente correlate a *MLO-2*, *MLO-6* e *MLO-12* di *A. thaliana* e a *MLO-1* di pomodoro (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008), per le quali è noto il coinvolgimento nei processi della suscettibilità all'oidio (Consonni et al. 2006, Bai et al. 2008). I geni *MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13* erano inoltre indotti da *E. necator*, mentre il gene *MLO-6* non era significativamente modulato dal patogeno (Winterhagen et al. 2008). Per comprendere il coinvolgimento dei geni *MLO* di vite nella suscettibilità all'oidio sono stati silenziati i geni *MLO-6*, *MLO-7*, *MLO-11* e *MLO-13* utilizzando la tecnica denominata RNAi. Delle 30 linee trasformate con i quattro costrutti sei hanno mostrato il silenziamento significativo dei geni *MLO*. In particolare, sono state ottenute tre linee dalla trasformazione con il costrutto contenente il gene *MLO-11* (TLB1, TLB2, TLB3) e tre con il costrutto con il gene *MLO-13* (TLB4, TLB5, TLB6). L'assenza del silenziamento dei geni *MLO* nelle linee trasformate con il costrutto contenente i geni *MLO-6* e *MLO-7* può essere dovuto all'uso di un frammento più corto (di 327 bp e 369 bp) rispetto a quello usato per il silenziamento dei geni *MLO-11* e *MLO-13* (di 504 e 627 bp). In cellule embrionali di *Drosophila melanogaster* è stato infatti dimostrato che l'efficienza del silenziamento mediante frammenti genici più lunghi di 500 bp è pari al 75-80% e si riduce a meno del 50% con frammenti più corti (Tuschl et al. 1999). Le linee TLB4, TLB5 e TLB6 hanno mostrato una significativa riduzione della severità dell'infezione di oidio. L'analisi dell'espressione dei geni *MLO* nelle linee resistenti (TLB4, TLB5, TLB6) e suscettibili (EVB, TLB1, TLB2, TLB3) all'oidio ha messo in evidenza che ogni linea presenta una diversa combinazione di silenziamento dei geni *MLO*. I quattro geni *MLO* di vite presentano infatti un'elevata identità di sequenza (Feechan et al. 2008, Winterhagen et al. 2008), suggerendo un possibile silenziamento aspecifico. Il gene *MLO-7* è risultato silenziato in maniera significativa in tutte e tre le linee resistenti (riduzione dell'espressione del 45-51%), ma non in quelle suscettibili, suggerendo che questo gene potrebbe avere un ruolo chiave nella suscettibilità all'oidio. Il gene *MLO-6* è risultato silenziato in tutte e tre le linee resistenti (riduzione dell'espressione del 58-65%) e nella linea suscettibile TLB3 (riduzione dell'espressione del 29%), suggerendo che questo gene potrebbe contribuire alla suscettibilità dell'oidio. Il gene *MLO-11* è risultato silenziato in tutte le linee, sia suscettibili che resistenti (riduzione dell'espressione rispettivamente del 60-75% nelle tre linee suscettibili e del 45-51% nelle tre linee resistenti), ipotizzando un suo ruolo nella suscettibilità ad oidio, anche se minoritario rispetto a *MLO-7*. L'espressione del gene *MLO-13* è

risultata invece significativamente silenziata nella linea suscettibile TLB1 (riduzione dell'espressione del 51%) e solo in due linee resistenti (riduzione dell'espressione del 55-67% in TLB4 e TLB6), suggerendo che questo gene non ha un effetto nella suscettibilità all'oidio. Nonostante non sia stato ottenuto il silenziamento specifico di un singolo gene *MLO*, il gene *MLO-7* potrebbe essere responsabile della suscettibilità ad oidio, mentre i geni *MLO-6* e *MLO-11* sembrano contribuire alla suscettibilità della vite, con un effetto additivo a *MLO-7*. Anche in *A. thaliana* è necessario il silenziamento di tre geni *MLO* per avere una completa resistenza ad oidio. Il silenziamento del solo gene *MLO-2* conferisce infatti una moderata resistenza, mentre il silenziamento dei *MLO-6* e *MLO-12* assieme a *MLO-2* conferisce completa resistenza all'oidio (Consonni et al. 2006). In vite, il gene *MLO-7* sembra comportarsi come *MLO-2* di *A. thaliana*, mentre i geni *MLO-6* e *MLO-11* sembrano avere un ruolo aggiuntivo contribuendo alla suscettibilità all'oidio e il silenziamento di tutti e tre porta ad una riduzione della malattia superiore al 65%. Feechan et al. (2013b) avevano però ipotizzato che i geni *MLO-11* e *MLO-13* di vite fossero i principali responsabili della suscettibilità all'oidio mediante complementazione del triplo mutante *mlo2mlo6mlo12* di *A. thaliana*. L'impiego di un sistema eterologo, come l'infezione di *E. cichoracearum* nel mutante di *A. thaliana*, potrebbe non riprodurre fedelmente i processi dell'infezione di *E. necator* in vite ed aver quindi parzialmente alterato l'analisi dei geni *MLO* di vite nei processi di suscettibilità.

Il silenziamento dei geni *MLO* non ha causato effetti pleiotropici sulle piante di vite cresciute in condizioni controllate. Al contrario, il silenziamento dei geni *MLO* in orzo, *A. thaliana* e peperone è noto per essere responsabile della formazione di macchie necrotiche sulle foglie (Jørgensen 1992) e di una crescita rallentata delle piante (Consonni et al. 2006, Zheng et al. 2013). Non si possono comunque escludere possibili effetti sui grappoli, considerando che alcuni geni *MLO* regolano la percezione del tubetto pollinico nel sacco embrionale (Kessler et al. 2010) e possono quindi influenzare la fecondazione dei fiori. Il silenziamento dei geni *MLO* non ha inoltre alterato il livello di suscettibilità della vite alla peronospora, suggerendo che questi geni non sono coinvolti nell'interazione con *P. viticola*. Il possibile ruolo dei geni *MLO* nella resistenza ad altri patogeni è però suggerito dai risultati ottenuti in altre specie che hanno indicato l'aumento della suscettibilità a *M. grisea* e *B. sorokiniana* in orzo (Jarosch et al. 1999, Kumar et al. 2001) ed *A. alternata*, *A. brassicicola* and *P. infestans* in *A. thaliana* (Consonni et al. 2006) in seguito al silenziamento dei geni *MLO*.

Il meccanismo attraverso cui il silenziamento dei geni *MLO* conferisce resistenza all'oidio non è stato al momento chiarito. Le proteine *MLO* sono localizzate nella membrana plasmatica e, in seguito all'infezione dell'oidio, si accumulano nel sito di penetrazione del fungo (Bhat et al. 2005), dove si pensa regolino negativamente i meccanismi responsabili della formazione della papilla che sono regolati dalle proteine PEN-1 e PEN-2/PEN-3 (Panstruga 2005b). La papilla è costituita da callosio, proteine, composti fenolici (lignina e derivati fenolici), arabinoglicani e composti antimicrobici (Chowdhury et al. 2014) e agisce come barriera fisica per bloccare la penetrazione del fungo. L'accumulo della papilla è stato osservato nel sito di infezione nella linea resistente TLB4 e nella linea controllo EVB, suggerendo che la papilla rappresenta una tipica risposta della vite all'infezione dell'oidio. Ciò che differenzia le papille nelle piante resistenti è il tempo necessario per la loro formazione, la composizione e le dimensioni (Lyngkjær et al. 2000, Chowdhury et al. 2014, Hueckelhoven 2014). Chowdhury et al. (2014) hanno infatti dimostrato che le papille in piante di orzo resistenti (papilla effettiva) mostrano una diversa concentrazione di callosio, cellulosa e arabinosilani rispetto alle papille delle piante suscettibili (papilla non-effettiva). In futuro, saranno quindi necessarie ulteriori analisi per valutare le

differenze nella composizione e nella tempistica di accumulo della papilla nelle piante di vite controllo e silenziate nell'espressione dei geni *MLO*.

Nella linea resistente TLB4 e nella linea controllo EVB sono stati analizzati tredici geni di difesa della vite all'oidio (Fung et al. 2008, Dufour et al. 2013, Gao et al. 2014, Guo et al. 2014). I geni selezionati codificano per due proteine di patogenesi (*PR-1* e *PR-6*), per quattro fattori di trascrizione (*WRKY-19*, *WRKY-27*, *WRKY-48*, *WRKY-52*), per due isoforme dell'enzima lipossigenasi (*LOX-1* e *LOX-9*), per un enzima coinvolto nella sintesi degli aminoacidi (*ASL-1*), per una proteina coinvolta nel trasporto di nitrato e nitriti (*NPF-3.2*), per un gene coinvolto nei processi di penetrazione dell'oidio (*PEN-1*) e per due lipasi (*EDS-1* e *PAD-4*). Prima dell'inoculo con l'oidio, tutti i geni analizzati hanno dimostrato livelli di espressione paragonabili nella linea resistente TLB4 e nella linea controllo EVB, dimostrando che il silenziamento dei geni *MLO* non ha alterato il livello di espressione dei marcatori della risposta di difesa della pianta. A 1 dpi, i geni *WRKY-52* e *NPF-3.2* sono risultati indotti nella linea controllo EVB, mentre solamente il gene *WRKY-19* è risultato indotto nella linea TLB4. In particolare, il gene *NPF-3.2* è risultato indotto da oidio a 1 dpi ma non a 10 dpi nella linea controllo, in accordo con Pike et al. (2014) ed è risultato rispettivamente non modulato a 1 dpi e represso a 10 dpi nella linea TLB4. Similmente, questo gene era indotto nella vite suscettibile (*V. vinifera* cultivar Cabernet Sauvignon) ma non nella vite resistente (*V. aestivalis* cultivar Norton) in seguito ad infezione di *E. necator* (Fung et al. 2008), suggerendo che la risposta della pianta suscettibile coinvolge un aumento del trasporto di nitrato e nitrito per sintetizzare ammonio, aminoacidi e peptidi per il metabolismo del patogeno (Pike et al. 2014). I geni *EDS-1*, *PAD-4*, *PR-1*, *PR-6*, *WRKY-19*, *WRKY-48*, e *WRKY-52* sono risultati modulati a 10 dpi nella linea controllo EVB in accordo con quanto riportato in letteratura (Dufour et al. 2013, Gao et al. 2014, Guo et al. 2014), confermando l'attivazione della risposta della vite all'oidio. L'assenza di modulazione dei geni *PEN-1*, *LOX-1*, *LOX-9* e *WRKY-27* nella linea controllo (Collins et al. 2003, Assaad et al. 2004, Fung et al. 2008, Dufour et al. 2013, Guo et al. 2014) può essere invece dovuta alle diverse condizioni utilizzate, come il genotipo della pianta ospite o la modalità dell'inoculo. Il gene *PEN-1* di vite è omologo a *PEN-1* di *A. thaliana*, che è noto per essere indotto da oidio in *A. thaliana* (Assaad et al. 2004), suggerendo che la modulazione di questo gene può essere differente nelle diverse specie vegetali. L'induzione dei geni *LOX-1*, *LOX-9* e *WRKY-27* da *E. necator* era stata osservata nelle foglie di *V. vinifera* Cabernet sauvignon (Fung et al. 2008, Dufour et al. 2013) e in *V. quinquangularis* Shang-24 (Guo et al. 2014), suggerendo una loro diversa modulazione a seconda del genotipo dell'ospite. Nella linea TLB4 sono risultati indotti i geni *LOX-1*, *WRKY-19*, e *WRKY-52* a 10 dpi. Il gene *LOX-1* codifica per una lipossigenasi coinvolta nella sintesi di JA (Mueller 1997), indicando un possibile coinvolgimento di JA nella resistenza mediata dal silenziamento dei geni *MLO*. La mancata induzione dei geni *PR-6* (Dufour et al. 2013), *WRKY-27* e *WRKY-48* (Guo et al. 2014), *LOX-1* (Fung et al. 2008), *LOX-9* (Dufour et al. 2013) e *PEN-1* (Collins et al. 2003, Assaad et al. 2004) nella linea TLB4 a 1 e 10 dpi suggerisce che la ridotta severità della malattia nella linea resistente non è sufficiente per attivare la risposta della pianta. Inoltre la mancata modulazione dei geni marcatori della via dell'ormone di difesa SA, come *PR-1* (Dufour et al. 2013), *EDS-1* e *PAD-4* (Gao et al. 2014), indica inoltre che la resistenza mediata dal silenziamento dei geni *MLO* è indipendente da SA, in accordo con gli studi ottenuti in *A. thaliana* (Consonni et al. 2006) e in cetriolo (Nie et al. 2015). Per meglio chiarire le possibili regolazioni trascrizionali responsabili della resistenza nelle piante di vite silenziate per i geni *MLO* saranno comunque necessarie analisi di trascrittomiche utilizzando alcune linee silenziate nell'espressione dei geni *MLO*.

6 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo lavoro di dottorato hanno permesso di identificare alcuni processi cellulari e geni chiave coinvolti nei meccanismi di difesa della vite in risposta all'infezione della peronospora e dell'oidio attraverso approcci di microdissezione laser e silenziamento genico.

L'ottimizzazione del protocollo per la microdissezione laser ha consentito di isolare in maniera precisa gli stomi da foglie di vite e le regioni circostanti per analizzare la risposta sito-specifica della pianta all'infezione di *P. viticola*. La tecnica della microdissezione laser ha permesso di aumentare la sensibilità dell'analisi dell'espressione genica e di identificare regolazioni trascrizionali che erano mascherate nell'analisi della foglia intera. Le analisi molecolari delle microdissezioni hanno inoltre evidenziato che le regolazioni della risposta della vite all'infezione di *P. viticola* sono principalmente localizzate nei siti di infezione e probabilmente controllate da segnali cellulari con un'azione a breve distanza che coinvolgono gli stomi infetti e le regioni circostanti. L'assenza della modulazione genica nei tessuti non infetti ha inoltre suggerito che non sono implicati segnali cellulari a lunga distanza nelle prime fasi di sviluppo del patogeno.

Mediante trasformazione genetica della vite sono state ottenute tre linee silenziate nell'espressione dei geni *MLO*, le quali hanno mostrato una maggiore resistenza all'oidio rispetto alle piante controllo. L'analisi dell'espressione dei geni *MLO* nelle linee resistenti ha messo in evidenza il ruolo chiave del gene *MLO-7* nei processi responsabili della suscettibilità all'oidio. Il gene *MLO-6* e, in misura minoritaria, il gene *MLO-11* sembrano inoltre contribuire alla suscettibilità della vite, con un effetto additivo a *MLO-7*. Il silenziamento dei geni *MLO* non influisce sulla suscettibilità della pianta alla peronospora, suggerendo che questi geni sono specifici per l'oidio e non sono coinvolti nell'interazione con *P. viticola*. I tre geni *MLO* rappresentano quindi nuovi marcatori di resistenza della vite e possono essere utilizzati per la selezione di piante resistenti all'oidio mediante programmi di miglioramento genetico assistito. Il protocollo per la microdissezione laser ottimizzato in questo studio permette inoltre di aumentare la sensibilità di future analisi trascrizionali e di consentire l'identificazione di nuovi geni marcatori della risposta di difesa della vite all'infezione dei patogeni.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi sono stati riportati in due pubblicazioni su riviste scientifiche (il primo pubblicato sulla rivista *Plant and Cell Physiology* 2016, 57: 69-81, il secondo pubblicato su *Horticulture Research* doi: 10.1038/hortres.2016.16), in un brevetto (PCT/EP/2015/065624), e sono stati presentati a tre convegni nazionali e internazionali.

7 APPENDICE: PUBBLICAZIONI OTTENUTE

I risultati ottenuti in questo progetto di dottorato hanno contribuito ad ottenere le seguenti pubblicazioni:

▪ Pubblicazioni su riviste internazionali con impact factor:

Lenzi, L.; Caruso, C.; Bianchedi, P.L.; Pertot, I.; Perazzolli, M. (2016) **Laser microdissection of grapevine leaves highlights a site-specific regulation of the transcriptional response to downy mildew.** *Plant and Cell Physiology* 57(1): 69–81.

Pessina, S.; **Lenzi, L.;** Perazzolli, M.; Campa, M.; Dalla Costa, L.; Urso, S.; Valè, G.; Velasco, R.; Salamini, F.; Malnoy, M. **Knock-down of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine.** *Horticulture Research*: doi: 10.1038/hortres.2016.16.

▪ Pubblicazioni su riviste internazionali senza impact factor:

Perazzolli, M.; Palmieri, M.C.; Roatti, B.; Banani H.; **Lenzi, L.;** Pertot, I. (2013) **Molecular characterization of induced resistance in grapevine: relevance of plant genotype and exposure to abiotic stresses.** IOBC-WPRS Bulletin 89: 79-81.

Lenzi, L.; Palmieri, M.C.; Caruso, C.; Pertot, I.; Perazzolli, M. (2013) **Characterization of efficient resistance inducers for control of crop disease.** IOBC-WPRS Bulletin 89: 137-138.

▪ Presentazioni orali a convegni nazionali ed internazionali:

Lenzi, L.*; Caruso, C.; Bianchedi, P.L.; Pertot, I.; Perazzolli, M. (2015) **Laser microdissection of grapevine leaves highlights site-specific transcriptional changes at the early stages of downy mildew infection.** Convegno SiPaV (Società Italiana Patologia Vegetale) – Torino, 21-23 Settembre 2015.

Pessina, S.; Campa, M.; Dalla Costa, L.; Perazzolli, M.; **Lenzi, L.;** Valè, G.; Urso, S.; Schouten, H.; Visser, R.; Salamini, F.; Velasco, R.*; Malnoy, M. (2015) **Reducing susceptibility to powdery mildew in apple and grapevine through silencing of MLO genes.** Convegno congiunto SIBV (Società Italiana Biologia Vegetale) - SIGA (Società Italiana Genetica Agraria). “Feeding the planet: plant science and breeding for the future of agriculture”– Milano, 8-11 Settembre 2015.

Perazzolli, M.*; Palmieri, M.C.; Roatti, B.; Banani, H.; **Lenzi, L.;** Pertot, I. (2013) **Molecular characterization of induced resistance in grapevine: relevance of plant genotype and exposure to abiotic stresses.** Comunicazione orale e abstract, 6th meeting IOBC-WPRS Working Group "Induced resistance in plants against insects and diseases". Avignone (Francia), 10-13 Giugno 2013.

▪ Presentazioni poster a convegni nazionali ed internazionali:

Lenzi, L.; Caruso, C.; Bianchedi, P.L.; Pertot, I.; Perazzolli, M.* (2015) **Laser microdissection of grapevine leaves infected by *Plasmopara viticola* reveals site-specific defence-related processes.** Poster e abstract, Convegno PR-IR2015 – Aachen (Germania), 6-10 Settembre 2015.

Lenzi, L.*; Palmieri, M.C.; Caruso, C.; Pertot, I.; Perazzolli, M. (2013) **Characterization of efficient resistance inducers for control of crop disease.** Poster e abstract, 6th meeting of the IOBC-WPRS Working Group "Induced resistance in plants against insects and diseases". Avignone (Francia), 10-13 Giugno 2013.

Lenzi, L.*; Palmieri, M.C.; Giovannini, O; Pertot, I.; Perazzolli M. (2013) **Characterization of efficient resistance inducers for control of crop disease.** Poster e abstract, Future IPM in Europe. Riva del Garda (Trento, Italia), 19-21 Marzo 2013.

Lenzi, L.*; Palmieri, M.C.; Moretto, M.; Fontana, P.; Matafora, V.; Bachi, A.; Pertot, I.; Perazzolli M. (2013) **Identification of specific grapevine biomarkers to select efficient resistance inducers.** Poster e abstract, Future IPM in Europe. Riva del Garda (Trento, Italia), 19-21 Marzo 2013.

* partecipazione al convegno

▪ Brevetti:

Velasco, R.; Malnoy, M.; Pessina, S.; Perazzolli, M.; Lenzi, L. (2015) ***Erysiphe necator* resistance providing genes in *Vitis vinifera*** (PCT/EP/2015/065624).

Laser Microdissection of Grapevine Leaves Reveals Site-Specific Regulation of Transcriptional Response to *Plasmopara viticola*

Luisa Lenzi^{1,2}, Carla Caruso², Pier Luigi Bianchedi³, Ilaria Pertot¹ and Michele Perazzolli^{1,*}

¹Research and Innovation Center, Fondazione Edmund Mach (FEM), Via E. Mach, 1, 38010 S. Michele all'Adige, Italy

²Department of Ecological and Biological Sciences, University of Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo, Italy

³Technology Transfer Center, Fondazione Edmund Mach (FEM), Via E. Mach, 1, 38010 S. Michele all'Adige, Italy

*Corresponding author: E-mail, michele.perazzolli@fmach.it; Fax, 00390461615765.

(Received September 18, 2015; Accepted October 23, 2015)

Grapevine is one of the most important fruit crops in the world, and it is highly susceptible to downy mildew caused by the biotrophic oomycete *Plasmopara viticola*. Gene expression profiling has been used extensively to investigate the regulation processes of grapevine–*P. viticola* interaction, but all studies to date have involved the use of whole leaves. However, only a small fraction of host cells is in contact with the pathogen, so highly localized transcriptional changes of infected cells may be masked by the large portion of non-infected cells when analyzing the whole leaf. In order to understand the transcriptional regulation of the plant reaction at the sites of pathogen infection, we optimized a laser microdissection protocol and analyzed the transcriptional changes in stomata cells and surrounding areas of grapevine leaves at early stages of *P. viticola* infection. The results indicate that the expression levels of seven *P. viticola*-responsive genes were greater in microdissected cells than in whole leaves, highlighting the site-specific transcriptional regulation of the host response. The gene modulation was restricted to the stomata cells and to the surrounding areas of infected tissues, indicating that the host response is mainly located at the infection sites and that short-distance signals are implicated. In addition, due to the high sensitivity of the laser microdissection technique, significant modulations of three genes that were completely masked in the whole tissue analysis were detected. The protocol validated in this study could greatly increase the sensitivity of further transcriptomic studies of the grapevine–*P. viticola* interaction.

Keywords: Gene expression • Laser microdissection • Oomycetes • Plant–pathogen interactions • *Plasmopara viticola* • Stomata • *Vitis vinifera*.

Abbreviations: Cells, cellulose synthase; CHI, chalcone isomerase; d, days; GLP, germin-like protein; hpi, hours post-inoculation; LMD, laser microdissection; LSU, large ribosomal subunit; OSM, osmotin; PR, pathogenesis-related; r.p.m., revolution per minute; SE, standard error; TLP, thaumatin-like protein.

Introduction

Downy mildew caused by the biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.) Berl. and de Toni is one of the most

economically significant grapevine diseases worldwide, particularly in warm, wet climates (Gessler et al. 2011). *Plasmopara viticola* attacks all green parts of the grapevine where functional stomata are present (in particular, leaves and clusters), and it penetrates only these natural openings (Gessler et al. 2011). When leaves are wet, zoospores are released from sporangia into the water film and swim towards the stomata where they encyst (Unger et al. 2007, Díez-Navajas et al. 2008). Subsequently, encysted zoospores form a germ tube that penetrates into the substomatal cavity and develops the primary hypha that branches to form a complex mycelial network (Unger et al. 2007, Díez-Navajas et al. 2008). Then, *P. viticola* hyphae expand into the intercellular spaces of the mesophyll tissue and differentiate specialized structures known as haustoria (Unger et al. 2007, Liu et al. 2015). Haustoria development involves localized degradation of the plant cell wall and invagination of the plasma membrane, creating intimate contact between the pathogen and the host (Jones and Dangl 2006). These highly specialized structures of biotrophic oomycetes and fungi play an essential role in nutrient acquisition from the plant cells and allow intense exchanges of signals that redirect the host metabolism and suppress the defense reaction (Voegelé and Mendgen 2003, Dodds et al. 2009). In particular, pathogenicity effector proteins are released by the pathogen to manipulate host cells and establish a parasitic relationship (Voegelé and Mendgen 2003, Kamoun 2006, Dodds et al. 2009). The molecular basis of grapevine and *P. viticola* interaction is still poorly understood, and only three effector genes have been identified in *P. viticola* (Mestre et al. 2012). However, it is assumed by comparison with similar pathosystems that the establishment of compatibility is achieved through the secretion of effector molecules, which can act as virulence factors in suppressing host defenses (Milli et al. 2012) and which can manipulate host cell metabolism to maximize energy recruitment (Gamm et al. 2011).

The wine industry relies predominantly on *Vitis vinifera*, which is highly susceptible to downy mildew (Gessler et al. 2011). Resistance traits are present in some other species of the genus *Vitis*, which are commonly used in plant breeding for resistance to *P. viticola* (Kortekamp 2006, Polesani et al. 2010, Wu et al. 2010, Malacarne et al. 2011, Figueiredo et al. 2012, He et al. 2013). A better understanding of the mechanisms responsible for compatible and incompatible interaction

between *Vitis* spp. and *P. viticola* will help breeding programs to develop resistant varieties. Restriction of pathogen growth in resistant grapevines is mainly a post-infection phenomenon (Polesani et al. 2010) that begins when the first haustoria establish intimate contact with plant cells (Unger et al. 2007, Diez-Navajas et al. 2008, Polesani et al. 2010, Liu et al. 2015). Transcriptional responses to *P. viticola* also occur in susceptible grapevines, and they have been associated with a weak and abortive defense response at early infection stages (Polesani et al. 2010), followed by the establishment of a compatible interaction (Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Gamm et al. 2011, Perazzolli et al. 2012). Grapevine response to downy mildew is characterized by the induction of genes involved in transcription regulation, such as a NAC transcription factor (Polesani et al. 2010), and defense response, including synthesis of pathogenesis-related (PR) proteins and antimicrobial compounds (Kortekamp 2006, Polesani et al. 2010, Wu et al. 2010, Malacarne et al. 2011, Figueiredo et al. 2012, He et al. 2013). PR proteins are associated with plant resistance to pathogens (van Loon et al. 2006). In particular, grapevine PR-2 and PR-4 genes are induced in response to *P. viticola* inoculation and code for β -glucanase and chitinase, respectively (Kortekamp 2006, Perazzolli et al. 2011). Likewise, osmotins (OSMs) and thaumatin-like proteins (TLPs) belong to the PR-5 family (van Loon et al. 2006), and exhibit strong inhibitory effects on germination and growth of the major pathogenic fungi of grapevine (Monteiro et al. 2003). As members of the PR-16 class (Park et al. 2004), seven genes of the germin-like protein (GLP) family were identified in grapevine and two of them, GLP-2 and GLP-7, were induced by *P. viticola* inoculation (Godfrey et al. 2007). Phytoalexins and phenolic derivatives are essential antimicrobial compounds produced following downy mildew infection, and are considered as markers of grapevine resistance (Slaughter et al. 2008, Malacarne et al. 2011). These defense molecules are synthesized by the phenylpropanoid pathway, which involves several enzymes, including a *P. viticola*-induced chalcone isomerase (CHI) (Legay et al. 2010). The grapevine response to downy mildew also includes the induction of a cellulose synthase (*CellS*) gene, which may be involved in the supply of precursors for pathogen metabolism (Polesani et al. 2008, Polesani et al. 2010).

Several studies have characterized the transcriptional changes of grapevine leaves occurring in response to *P. viticola* inoculation by analyzing RNA extracted from whole leaves (Kortekamp 2006, Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Polesani et al. 2010, Wu et al. 2010, Gamm et al. 2011, Perazzolli et al. 2012, Li et al. 2015, Merz et al. 2015). However, only a small fraction of leaf cells is in contact with the pathogen at early infection stages, and the large portion of non-infected cells could mask or dilute highly localized transcriptional changes related to the establishment of haustoriated cells. On the other hand, little is known about the local plant response to biotrophic pathogens and the potential for different transcriptional regulations of parasitized plant cells and leaf tissues far from the infection sites (Coker et al. 2015). Laser microdissection (LMD) is a powerful methodology for precisely

isolating specific cell groups or single cells from heterogeneous tissues and also allows single-cell gene expression analyses (Emmert-Buck et al. 1996). The LMD approach has been successfully used to study the transcriptional reprogramming of host cells during plant-microbe interactions, such as with nitrogen-fixing bacteria (Damiani et al. 2012, Roux et al. 2014), pathogenic fungi (Tang et al. 2006, Chandran et al. 2010, Hacquard et al. 2010, Klug et al. 2015), phytoplasma (Santi et al. 2013), arbuscular mycorrhizal (Balestrini et al. 2007, Fiorilli et al. 2009, Gaude et al. 2012) and ectomycorrhizal fungi (Hacquard et al. 2013).

The aim of this work was to compare early grapevine response in whole leaves, in the sites of *P. viticola* infection, in surrounding areas and in distal parts not infected by the pathogen. A protocol for sample preparation was optimized to isolate leaf cells, and the expression level of downy mildew-responsive genes was investigated to highlight different expression profiles in sites closely associated with *P. viticola* and in whole leaves.

Results

Plasmopara viticola inoculation of grapevine leaves

Leaf samples were collected at 24 h post-inoculation (hpi) from water-treated leaves (uninoculated sample), from inoculated areas (local-inoculated sample) and from uninoculated areas (distal-inoculated sample) of leaves inoculated with *P. viticola* only on the left side of the primary vein (left-side inoculated leaves). In local-inoculated samples, encysted zoospores and substomatal vesicles with primary hyphae of *P. viticola* were observed at 24 hpi (Fig. 1B, C), and they were not detected in uninoculated samples (Fig. 1A). Of the total stomata, 18% had an encysted zoospore or a substomatal vesicle with primary hyphae (infected stomata) (Fig. 1D). *Plasmopara viticola* infection was confirmed by the development of downy mildew symptoms with heavy production of *P. viticola* sporangia on local-inoculated samples at 7 d post-inoculation (Fig. 1E; Supplementary Fig. S1). No signs of the pathogen were noticed on uninoculated samples or distal-inoculated samples.

Gene expression analysis in whole fresh leaves inoculated with *Plasmopara viticola*

Early response to downy mildew was analyzed by assessing the modulation of 10 grapevine genes known to be defense response markers (Table 1) at 24 hpi in uninoculated and local-inoculated samples of whole fresh leaves (Fig. 2). The expression levels of the TLP-5 (Fig. 2A), PR-2 (Fig. 2B) and PR-4 (Fig. 2C) genes were induced 3.1-, 3.8- and 2.9-fold in local-inoculated samples, respectively. Likewise, *P. viticola* induced the expression of the GLP-7 (6.6-fold; Fig. 2D), OSM-1 (3.8-fold; Fig. 2E) and TLP-4 (2.9-fold; Fig. 2F) genes in whole fresh leaves. The expression levels of the GLP-2, NAC, CHI and CellS genes were not affected by *P. viticola* in whole fresh leaves of in vitro grown plants (Fig. 2G–J).

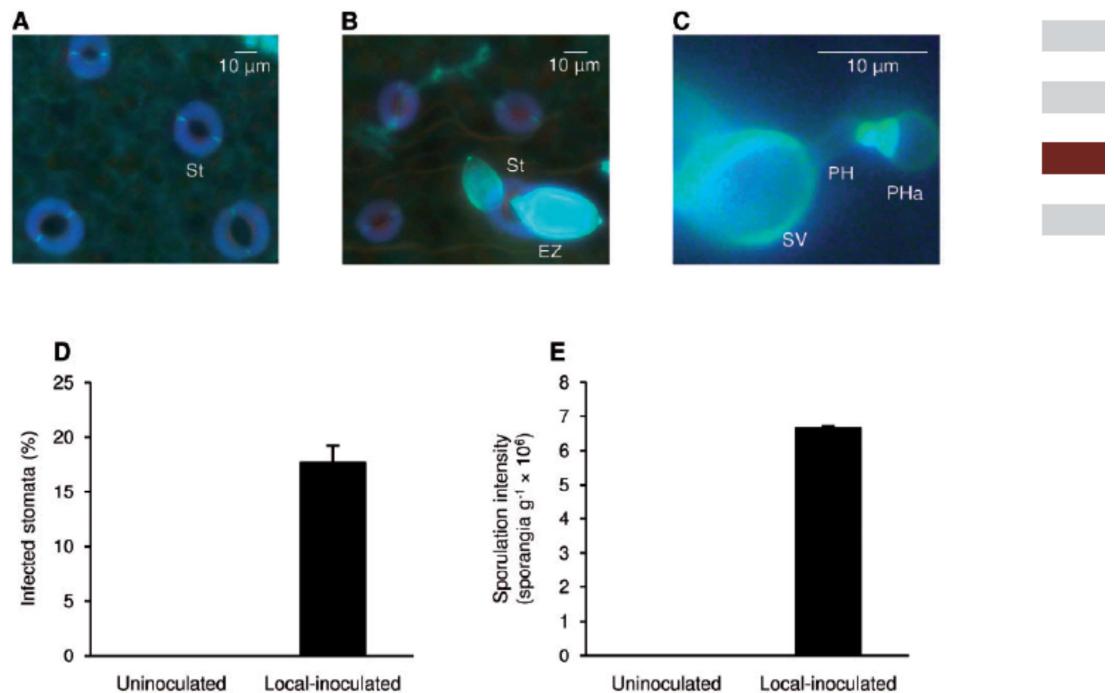


Fig. 1 Infection of *Plasmopara viticola* on grapevine leaves of in vitro grown plants. Leaves were inoculated with *P. viticola* (local-inoculated) or treated with water (uninoculated) under sterile conditions. *P. viticola* infection was assessed on (A) uninoculated and (B, C) local-inoculated samples at 24 hpi by epifluorescence microscopy after aniline blue staining. (D) Percentage of infected stomata showing encysted zoospores or substomatal vesicles with primary hyphae and primary haustoria, and (E) disease severity expressed as number of *P. viticola* sporangia per gram of leaf fresh weight were assessed at 24 hpi and at 7 d post-inoculation, respectively. Representative microscopic pictures of encysted zoospores (EZ), substomatal vesicles (SV) with primary hyphae (PH) and primary haustoria (PHa) near stomata (St) cells are shown. An *F*-test revealed non-significant differences between experiments ($P = 0.2$), and data from the two experiments were pooled. Mean scores and SEs of 10 replicates pooled from two experiments are presented.

Laser microdissection of stomata and surrounding cells from grapevine leaves

The LMD protocol was optimized by comparing two fixative solutions: ethanol–acetic acid (3:1) and 100% acetone. Although both fixative solutions provided adequate preservation of tissue morphology and allowed proper microdissection of stomata cells (data not shown), high-quality RNA was obtained only from microdissected cells of acetone-fixed leaves (Supplementary Fig. S2A). On the other hand, degraded RNA (no evident rRNA bands) was obtained from leaves fixed in the ethanol–acetic acid solution. High-quality RNA was present in acetone-fixed leaves for up to 14 d of storage at -20°C . The minimum quantity of fixed leaf tissue required to extract a sufficient amount of RNA ($>4\text{ ng}$) was 300 microdissected stomata cells. Acetone-fixed leaves were used in the following experiments.

Regulation of grapevine response at *P. viticola* infection sites was assessed on samples of 300 microdissected stomata cells, corresponding to a total area of $0.7\text{--}0.8\text{ mm}^2$ of leaf tissue, as well as on samples of an equivalent area of microdissected

surrounding cells (Fig. 3). LMD was carried out directly on whole fixed leaves without specimen sectioning by cryostat or microtome. Stomata cells were microdissected from uninoculated, local- and distal-inoculated samples, while surrounding cells were collected from uninoculated and local-inoculated samples. Extractions from whole fixed leaves after LMD confirmed that procedures of sample preparation and microdissection did not alter the quality of total RNA (Supplementary Fig. S2B). After RNA extraction, protocols for RNA amplification and cDNA synthesis were optimized for microdissected cells and whole fixed leaves, and the absence of DNA contamination was confirmed for all samples (Supplementary Fig. S3).

Quantification of *Plasmopara viticola* in cDNA samples

The presence of *P. viticola* was detected in the cDNA samples of whole fresh (Fig. 4A) and fixed (Fig. 4B) leaves of local-inoculated samples by real-time PCR analysis of the large ribosomal subunit (LSU) gene. As expected, no amplification of the *P. viticola* LSU gene was obtained from uninoculated or

Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR expression analysis

Gene abbreviation	Gene name	Accession number ^a	Grapevine gene ^b	Primer sequence ^c	Reference ^d
PR-2	Pathogenesis-related protein 2	AJ277900	VIT_208s0007g06060	For: GTATTTCAGAGAGTGTTGGC Rev: AACATGGCAACACAGTAAGTCT	Perazzoli et al. (2011)
PR-4	Pathogenesis-related protein 4	CF074510	VIT_214s0081g00030	For: CAGGCAACGGTGAGAAATAGT Rev: ACCACAGTCCAAACTCGTA	Perazzoli et al. (2011)
OSM-1	Osmotin 1	XM_002282928.2	VIT_202s0025g04310	For: CGCTCGGCTAAAGACTACC Rev: AAAACCTTGAGTAATCTGTAGCA	Perazzoli et al. (2012)
TLP-4	Thaumatin-like protein 4	XM_002282957.1	VIT_202s0025g04290	For: CACTGTTTTCAGGACCGATG Rev: GGGCATGTAAGGGTGTCTGT	Santi et al. (2013)
TLP-5	Thaumatin-like protein 5	XM_002283046.2	VIT_202s0025g04270	For: CTAGGGTCTTTTGAGTCCA Rev: CGTAGAAAAGTTGTTCCATGAG	Santi et al. (2013)
GLP-7	Germin-like protein 7	NM_001281015.1	VIT_214s0128g00570	For: GGGTGTCAAGTGGCTCGTATC Rev: CGGTGTTCAAGGTTGGATGT	Godfrey et al. (2007)
GLP-2	Germin-like protein 2	NM_001280985.1	VIT_214s0060g00120	For: CGAGTTGGATGTGGGTTTCA Rev: GACTTCGCCGTTGTTCTTCT	Godfrey et al. (2007)
NAC	Transcription factor NAC	Q52QR5	VIT_201s0026g02710	For: AACTGCCATGCCAATACAAAC Rev: ACCCAAGCCTAATCACTGAA	Polesani et al. (2008)
CHI	Chalcone isomerase	NM_001281104.1	VIT_213s0067g03820	For: AACTTCTGGTAGGACCCATCT Rev: GAAGGATGAAACCTTCCCACCA	Legay et al. (2010)
CellS	Cellulose synthase-like protein D3	XM_010664727.1	VIT_202s0012g02190	For: CAGACGAAGACTTCCGCTGAT Rev: GGAGTCCATGAGTTGCTGTA	Polesani et al. (2008)
Act	Actin	XM_010659103.1	VIT_212s0178g00200	For: ATTCCTCACCATCATCAGCA Rev: GACCCCTCTACTAAAAC	Polesani et al. (2010)
LSU	Large ribosomal subunit ^e	KM279688	-	For: GTGGTCAGTATGGGCACTTG Rev: GCGACTCAAAGAAAACCGGT	Gindro et al. (2014)

^a Accession number in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (www.ncbi.nlm.nih.gov).

^b Grapevine gene code of the V2 version (<http://genomes.crib.unipd.it/grape/>).

^c Sequences of the forward (For) and reverse (Rev) primers. References of primer pairs are: PR-2 and PR-4 (Perazzoli et al. 2011); TLP-4 and TLP-5 (Santi et al. 2013); OSM-1 (Perazzoli et al. 2012); NAC and CellS (Polesani et al. 2008); CHI (Legay et al. 2010); Act (Polesani et al. 2010).

^d References of gene markers of the grapevine defence response.

^e The large ribosomal subunit (LSU) gene of *P. viticola* was used to detect the presence of the pathogen in leaf tissues.

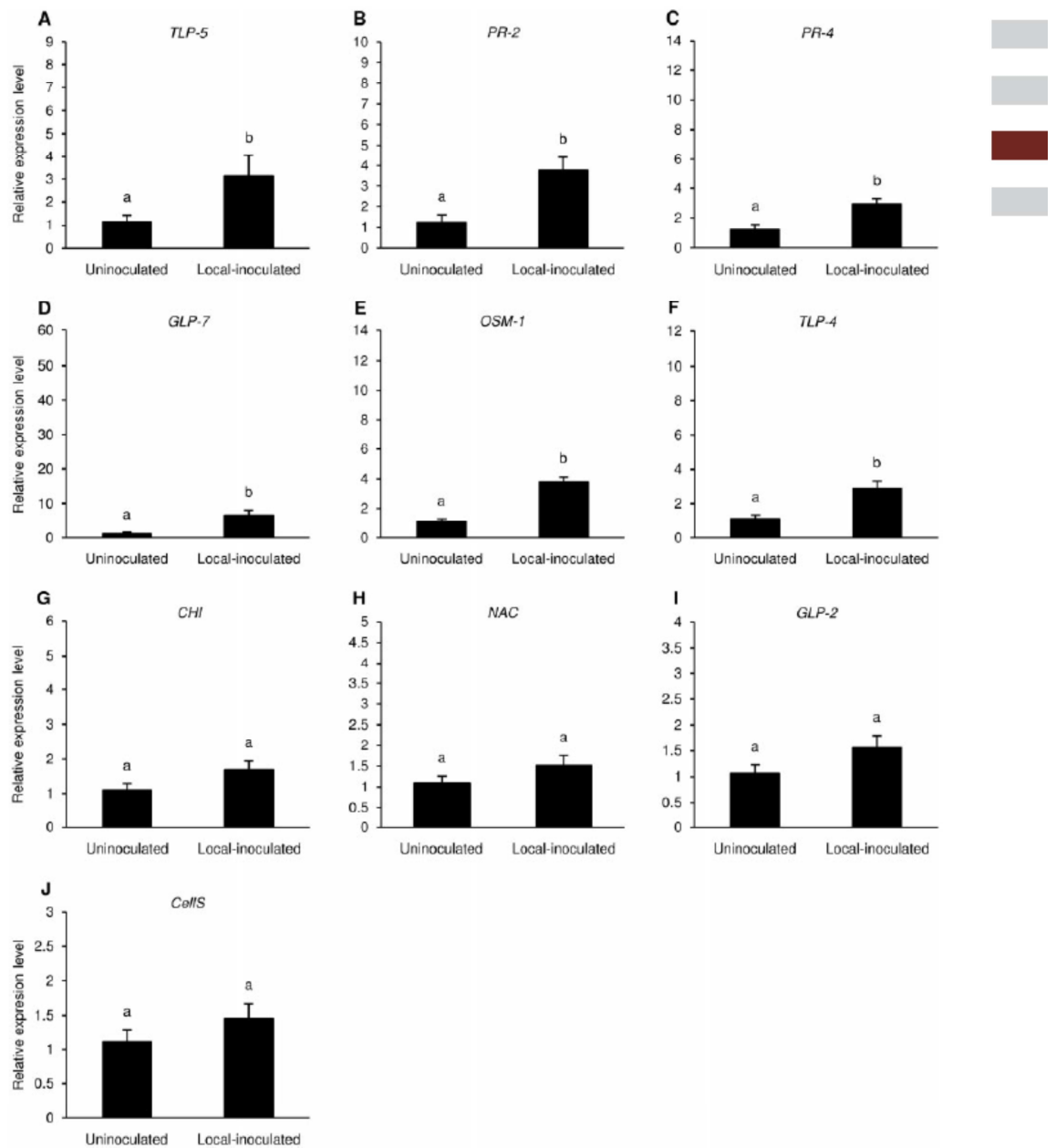


Fig. 2 Gene expression analysis of whole fresh leaves of in vitro grown grapevines. Relative expression levels of genes encoding (A) thaumatin-like protein 5 (*TLP-5*), (B) pathogenesis-related protein 2 (*PR-2*), (C) pathogenesis-related protein 4 (*PR-4*), (D) germin-like protein 7 (*GLP-7*), (E) osmotin 1 (*OSM-1*), (F) thaumatin-like protein 4 (*TLP-4*), (G) chalcone isomerase (*CHI*), (H) NAC transcription factor (*NAC*), (I) germin-like protein 2 (*GLP-2*) and (J) cellulose synthase (*CellS*) were assessed by real-time PCR analysis. Leaves were treated with water (uninoculated) or inoculated with *Plasmopara viticola* (local-inoculated) under sterile conditions, and collected at 24 hpi. Relative expression levels (fold change) were calculated using grapevine *Actin* as the constitutive gene for normalization, and data were calibrated on the uninoculated sample. An *F*-test revealed non-significant differences between experiments (*P*-values ranged from 0.2 to 0.8 for the genes tested), and data from the two experiments were pooled. Mean levels of relative expression and SEs from 7–9 replicates pooled from two experiments are presented for each sample. For each gene, different letters indicate significant differences according to Fisher's test ($\alpha = 0.05$).

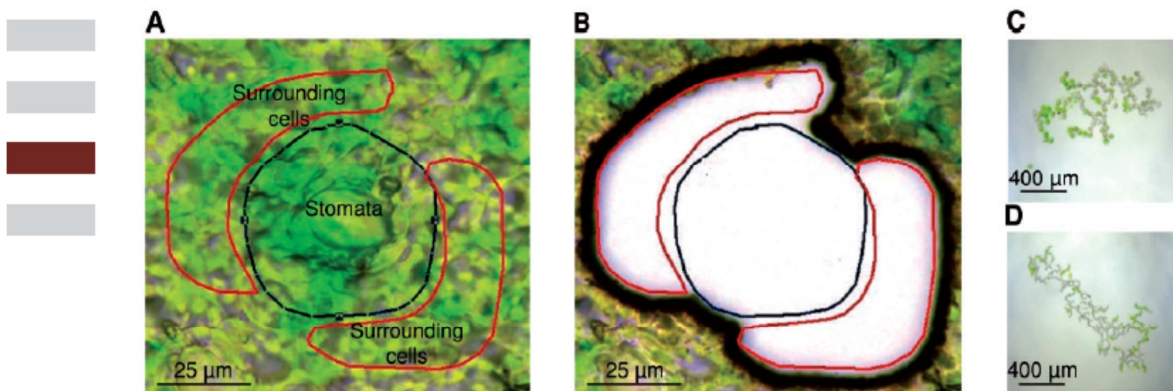


Fig. 3 Laser microdissection of stomata and surrounding cells from leaves of in vitro grown grapevines. Abaxial surface of a grapevine leaf fixed in 100% acetone with stomata (blue line) and surrounding (red line) cells selected on a Leica LMD7000 instrument (A) before and (B) after laser microdissection. Visualization of microdissected (C) stomata cells and (D) surrounding cells collected in PCR tube caps after laser microdissection.

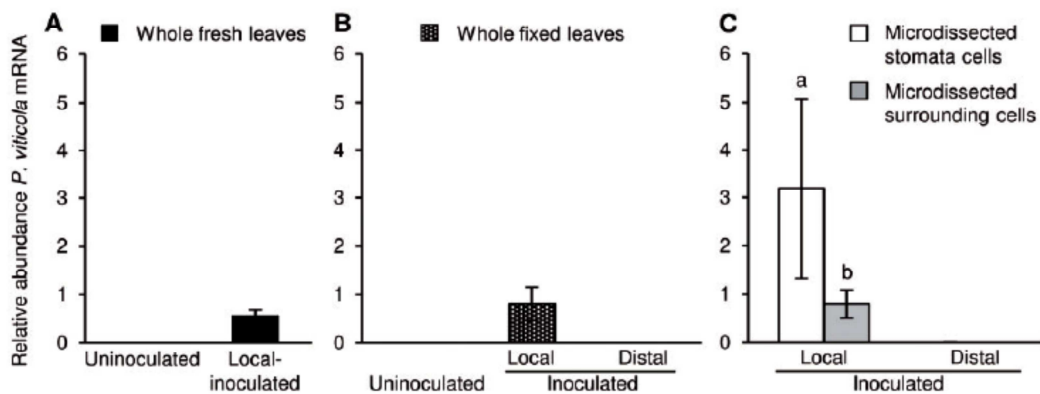


Fig. 4 Detection of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *P. viticola* development was assessed in (A) whole fresh leaves, (B) whole fixed leaves and (C) microdissected stomata and surrounding cells of in vitro grown grapevines. Leaves were treated with water (uninoculated) or inoculated with *P. viticola* (inoculated) under sterile conditions, and samples were collected at 24 hpi from the inoculated (local-inoculated) or uninoculated (distal-inoculated) area of left-side inoculated leaves. *P. viticola* development was estimated by real-time PCR of the expression of the large ribosomal subunit (LSU) gene of *P. viticola* and normalized to the transcription level of the grapevine *Actin* gene. An *F*-test revealed non-significant differences between experiments ($P = 0.3$), and data from the two experiments were pooled. Mean levels and SEs of relative *P. viticola* quantification from 6–9 replicates pooled from two experiments are presented for each sample.

distal-inoculated samples of whole fresh or fixed leaves. Likewise, the presence of *P. viticola* was not detected in microdissected stomata or surrounding cells of distal-inoculated samples (Fig. 4C). The *P. viticola* LSU gene was amplified from local-inoculated samples, and its signal was 4-fold greater in microdissected stomata than in microdissected surrounding cells.

Gene expression analysis in microdissected stomata and surrounding cells of leaves inoculated with *Plasmopara viticola*

The molecular response of grapevine to *P. viticola* at the infection sites was assessed with gene expression analysis of the

selected marker genes (Table 1) in microdissected stomata and surrounding cells of uninoculated, local- and distal-inoculated samples (Fig. 5). No significant modulation of the *TLP-5*, *PR-2*, *PR-4*, *GLP-7*, *OSM-1*, *TLP-4*, *CHI*, *NAC* or *GLP-2* genes was observed in whole leaves, microdissected stomata or surrounding cells of uninoculated and distal-inoculated samples.

The *TLP-5* gene was induced by *P. viticola* in local-inoculated samples, with comparable expression levels in whole fixed leaves, microdissected stomata and surrounding cells (Fig. 5A). The expression levels of the *PR-2*, *PR-4* and *GLP-7* genes were induced by *P. viticola* in local-inoculated samples (Fig. 5B–D). The expression levels of these genes in local-inoculated samples were greater in microdissected stomata

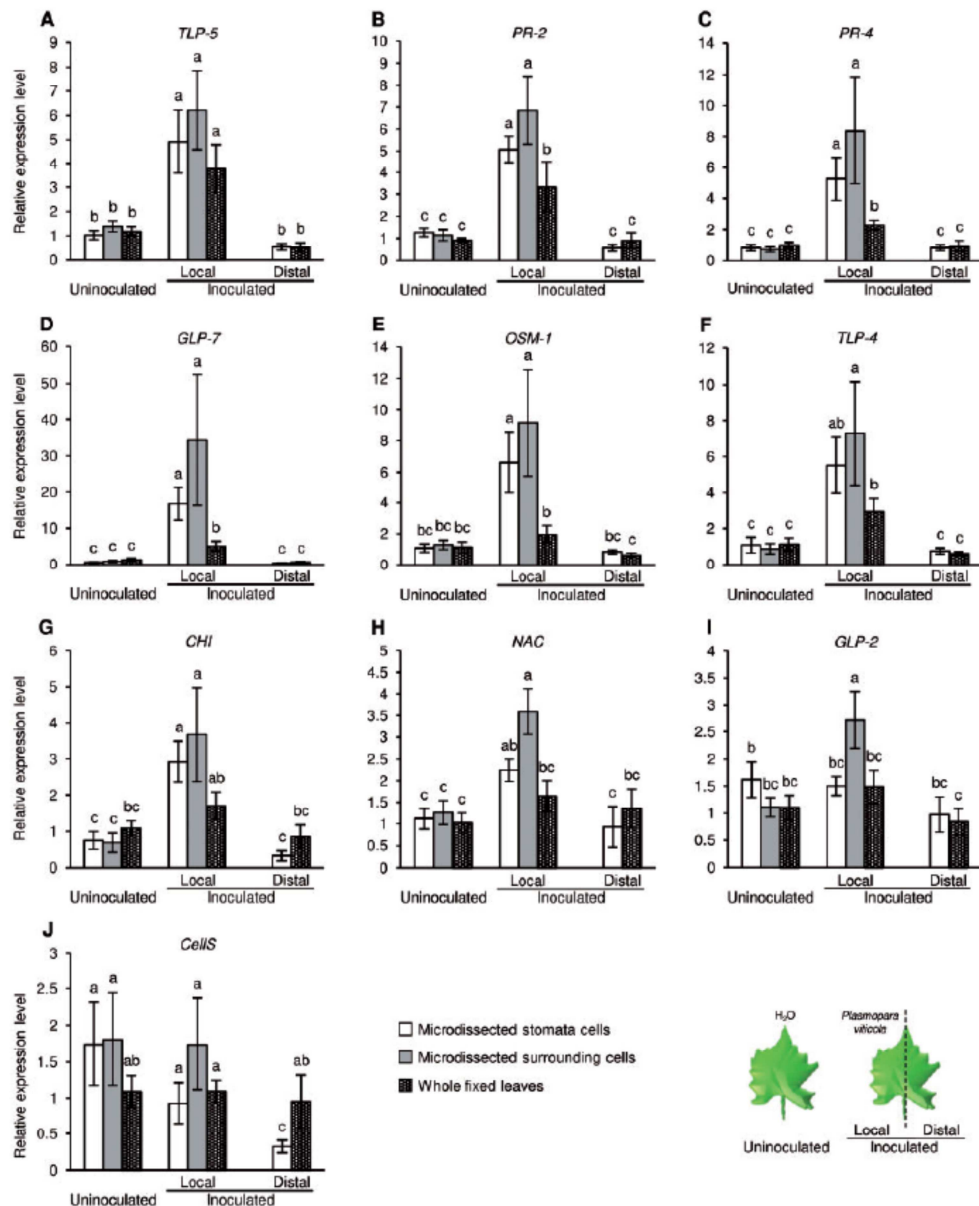


Fig. 5 Gene expression analysis of microdissected cells and whole fixed leaves of in vitro grown grapevines. Relative expression levels of genes encoding (A) thaumatin-like protein 5 (*TLP-5*), (B) pathogenesis-related protein 2 (*PR-2*), (C) pathogenesis-related protein 4 (*PR-4*), (D) germin-like protein 7 (*GLP-7*), (E) osmotin 1 (*OSM-1*), (F) thaumatin-like protein 4 (*TLP-4*), (G) chalcone isomerase (*CHI*), (H) NAC transcription factor (*NAC*), (I) germin-like protein 2 (*GLP-2*) and (J) cellulose synthase (*CellS*) were assessed by real-time PCR analysis. Leaves were treated with water (uninoculated) or inoculated with *Plasmopara viticola* (inoculated) under sterile conditions and fixed in 100% acetone at 24 hpi. Gene expression analysis was carried out on microdissected stomata cells, microdissected surrounding cells and in whole fixed leaves of uninoculated samples and inoculated (local-inoculated) or uninoculated areas of left-side inoculated leaves (distal-inoculated). Relative expression levels (fold change) were calculated using grapevine *Actin* as the constitutive gene for normalization, and data were calibrated on whole fixed leaves of the uninoculated sample. An *F*-test revealed non-significant differences between experiments (*P*-values ranged from 0.1 to 0.9 for the genes tested) and data from the two experiments were pooled. Mean levels of relative expression and SEs from 6–8 replicates pooled from two experiments are presented for each sample. For each gene, different letters indicate significant differences according to Fisher's test ($\alpha = 0.05$).

cells (5.1-, 5.3- and 16.8-fold for *PR-2*, *PR-4* and *GLP-7*, respectively) and surrounding cells (6.8-, 8.4- and 34.3-fold for *PR-2*, *PR-4* and *GLP-7* respectively) than in whole fixed leaves (3.3-, 2.3- and 5.0-fold for *PR-2*, *PR-4* and *GLP-7*, respectively).

The *OSM-1* gene showed similar expression profiles to *PR-2*, *PR-4* and *GLP-7* in microdissected cells of local-inoculated samples (6.6- and 9.1-fold induction in microdissected stomata and surrounding cells, respectively). However, the *OSM-1* expression of whole fixed leaves was not significantly affected by *P. viticola* in local-inoculated samples as compared with uninoculated samples (Fig. 5E). The expression level of *TLP-4* was significantly induced by *P. viticola* in local-inoculated samples (2.9-, 5.5- and 7.3-fold in whole fixed leaves, microdissected stomata and surrounding cells, respectively), and it was significantly greater in microdissected surrounding cells than in whole fixed leaves (Fig. 5F).

The expression of the *CHI* (Fig. 5G) and *NAC* (Fig. 5H) genes was significantly induced by *P. viticola* in microdissected stomata (2.9- and 2.2-fold, respectively) and surrounding cells (3.7- and 3.6-fold, respectively), but not in whole fixed leaves of local-inoculated samples. The *GLP-2* gene was induced (2.7-fold) exclusively in surrounding cells of local-inoculated samples (Fig. 5I). The expression levels of *NAC* and *GLP-2* genes were significantly greater in microdissected surrounding cells than in whole fixed leaves, while the expression level of *CHI* was not.

The expression level of *CellS* was not affected by *P. viticola* in whole fixed leaves and microdissected cells of uninoculated, local- and distal-inoculated samples. Only a slight decrease of *CellS* expression was observed in microdissected stomata of distal-inoculated samples (Fig. 5J).

Discussion

Transcriptional reprogramming is a crucial part of the interaction of biotrophic pathogens with host plants. However, gene expression analyses carried out to date have been done at a global level using whole leaves (Kortekamp 2006, Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Polesani et al. 2010, Wu et al. 2010, Gamm et al. 2011, Perazzolli et al. 2012, Li et al. 2015, Merz et al. 2015), while only a small fraction of leaf cells was in contact with the pathogen at early stages of the infection. Therefore, many key transcriptional events that occurred exclusively in host cells in direct contact with the pathogen might have been diluted or masked by the greater abundance of non-infected cells when analyzing whole-organ samples (Coker et al. 2015). In this study, we characterized early grapevine responses to downy mildew with spatial resolution in sites with *P. viticola* infection, in surrounding cells and in distal leaf areas not infected by the pathogen, by specifically selecting groups of cells with an optimized LMD protocol. As sample fixation depends on the plant species (Nelson et al. 2006), we compared two protocols, and grapevine leaf fixation in 100% acetone proved to be the best option for preserving histological integrity and RNA quality. The effectiveness of the fixation protocol was further confirmed through comparable gene expression levels

in whole fixed and whole fresh leaves after *P. viticola* inoculation for all the genes tested. Fixed samples were directly subjected to LMD without specimen sectioning by a microtome, saving time for paraffin embedding (Day et al. 2006), or by a cryotome, reducing the risk of morphological damage from ice crystals (Balestrini and Bonfante 2008). In comparison with fluorescence-activated cell sorting recently developed for *Arabidopsis thaliana* (Coker et al. 2015), our LMD method can be used at early time points after inoculation and allows morphology-based cell isolation, with no requirement for protoplast production or specific transgenic plants expressing infection markers. Because leaves of grown plants were used under axenic conditions, we could exclude interference from potential contaminant microorganisms (Barlass et al. 1986, Dai et al. 1995). Samples were collected when the formation of encysted zoospores, substomatal vesicles and primary hyphae established the first intimate contact between pathogen and host cells (Unger et al. 2007, Díez-Navajas et al. 2008, Polesani et al. 2010, Liu et al. 2015). The proportion of infected stomata was in agreement with previous observations (Yu et al. 2012), and the presence of *P. viticola* at 24 hpi was confirmed by amplification of the *P. viticola* *LSU* gene in whole leaves and microdissected stomata cells of local-inoculated samples. *Plasmopara viticola* was also detected in microdissected surrounding cells. Primary hyphae reached up to 40 μm in length at 24 hpi (Unger et al. 2007), and an area of 2,000 μm^2 (radius of about 25 μm) was collected for stomata cells, indicating that some primary hyphae may have been sampled from the surrounding areas.

The expression levels of 10 grapevine genes known to be markers for defense responses (Godfrey et al. 2007, Polesani et al. 2008, Legay et al. 2010, Perazzolli et al. 2011, Perazzolli et al. 2012, Santi et al. 2013) were examined in microdissected stomata and surrounding cells, and were compared with those of whole leaves. In particular, seven defense-related genes (*PR-2*, *PR-4*, *OSM-1*, *TLP-4*, *TLP-5*, *GLP-7* and *GLP-2*), one transcription factor (*NAC*) and two genes related to secondary metabolic processes (*CHI* and *CellS*) were analyzed. As reported in previous studies (Godfrey et al. 2007, Perazzolli et al. 2011, Perazzolli et al. 2012), expression of the *PR-2*, *PR-4*, *OSM-1* and *GLP-7* genes was induced by *P. viticola* in whole leaves. Conversely, the absence of the *P. viticola*-dependent induction of *GLP-2* (Godfrey et al. 2007), *CHI* (Legay et al. 2010), *NAC* and *CellS* (Polesani et al. 2008) in whole leaves may be related to the use of different plant genotypes, time points and inoculation methods. Indeed, the *CellS* gene was induced by *P. viticola* in Riesling (Polesani et al. 2008) and not in Pinot noir plants, in agreement with the different transcriptional response of susceptible genotypes to *P. viticola* (Banani et al. 2014). The induction of *GLP-2* and *NAC* was previously observed at late stages of infection (Godfrey et al. 2007, Polesani et al. 2008), suggesting that heavy *P. viticola* invasion of grapevine tissues is required to detect the modulation of these genes by whole-leaf analyses. *CHI* expression was induced in whole leaves by spray inoculation of *P. viticola* on greenhouse-grown plants (Legay et al. 2010), while its expression change after in vitro inoculation was detected only in microdissected cells.

The use of spray inoculation and greenhouse conditions could also explain the greater magnitude of *PR-4* and *OSM-1* modulation in Perazzolli et al. (2011, 2012) than in our experiments.

The extent of gene modulation was generally greater in microdissected cells than in whole leaves, demonstrating that the analysis of selected tissue portions dramatically increases sensitivity for detecting transcriptional changes. Furthermore, the dilution effect of whole-leaf analysis totally masked the modulation of the *GLP-2*, *NAC* and *CHI* genes, which was significantly affected by *P. viticola* in the microdissected cells. The expression levels of the *PR-2*, *PR-4*, *OSM-1*, *GLP-2*, *GLP-7*, *TLP-4* and *NAC* genes were greater in microdissected stomata and surrounding cells than in whole leaves, indicating site-specific regulation of grapevine response to *P. viticola*. Specifically, the gene expression profiles of defense-related genes (*PR-2*, *PR-4* and *OSM-1*) suggested that the attempted defense reaction of susceptible grapevine (Polesani et al. 2010) was mainly activated corresponding to the infection sites at 24 hpi. The specific expression profiles of the *GLP* family members in stomata cells and surrounding areas indicated different roles in grapevine response. For example, *GLP-2* was modulated by *P. viticola* exclusively in microdissected surrounding cells. *GLP-2* is closely related to the *PsGER1* gene from *Pisum sativa* (Godfrey et al. 2007), which encodes a receptor of bacterial cell surface proteins (Swart et al. 1994), and it could be responsible for the *P. viticola* recognition around the infection sites. Conversely, the *GLP-7* gene was induced in both stomata and surrounding cells and is related to the epidermal-specific *Hordeum vulgare* protein HvGER4 (Godfrey et al. 2007), which is involved in the formation of papilla in response to powdery mildew (Wei et al. 1998), and it is possibly implicated in the defense reaction of cells in contact with the pathogen. The *TLP* genes showed specific modulation patterns in microdissected cells, possibly due to the spatial regulation following *P. viticola* inoculation, as reported in response to stolbur infection (Santi et al. 2013). *TLP* genes belong to the *PR-5* family, which is associated with antifungal activity (Monteiro et al. 2003), and the *TLP-5* gene was expressed at comparable levels in whole leaves and microdissected cells, indicating a global response to *P. viticola* infection. Conversely, a more localized role for *TLP-4* in the restriction of pathogen development at the infection sites was suggested by greater expression levels in microdissected surrounding cells than in whole leaves. Likewise, the *P. viticola*-dependent induction of *CHI* and *NAC* was detected exclusively in microdissected stomata and surrounding cells and not in whole leaves. In particular, *CHI* encodes an enzyme responsible for the production of phytoalexins (Legay et al. 2010), indicating local accumulation of key defense molecules against downy mildew (Slaughter et al. 2008) near the infection sites. The expression profiles of the *NAC* transcription factor in microdissected cells correlated well with those of defense-related genes, but further investigations are required to prove its involvement in site-specific regulation of grapevine responses to *P. viticola*. The modulation of *PR-2*, *PR-4*, *GLP-7*, *OSM-1*, *TLP-4*, *TLP-5*, *CHI* and *NAC* was comparable in microdissected stomata and in surrounding areas, suggesting that short-distance signals are released from infected

stomata to adjacent cells. Indeed, Guan et al. (2014) reported that stomatal guard cells act as gatekeepers of *P. viticola* infection and that a cytoskeletal-based response is activated in neighboring cells. However, none of the tested genes, including the *PR-4* gene, which is a marker of jasmonic acid (JA) signaling (Hamiduzzaman et al. 2005), was modulated by *P. viticola* in uninoculated areas of left-side inoculated leaves at 24 hpi. Therefore, these expression profiles indicate that defense signals and the JA-mediated response to *P. viticola* (Polesani et al. 2010) were not yet diffused at long distances from the infection site at 24 hpi.

Conclusions

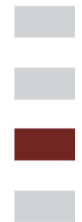
The LMD protocol used in this work permitted transcriptional analysis of grapevine response to *P. viticola* with spatial resolution by specific isolation of selected leaf cells. In this study, we identified site-specific regulation of the transcriptional response at *P. viticola* infection sites. The gene modulation was generally comparable in microdissected stomata cells and in surrounding areas, indicating that defense signals rapidly stimulated grapevine responses in leaf cells near to the infection sites. However, long-distance signals were not diffused at early stages of infection and genes were not modulated in distal-inoculated tissues. The LMD technique highlighted greater magnitudes of gene modulation in microdissected cells than in whole leaves, and identified transcriptional changes that were totally masked at the whole-tissue level. Therefore, our LMD method increases the sensitivity of gene expression analyses and it could lead to the identification of novel genes involved in the local reaction of grapevine leaves to *P. viticola* in future transcriptomic studies.

Materials and Methods

Plant material and *Plasmopara viticola* inoculum

Plants of the susceptible *V. vinifera* cv. Pinot noir ENTAV115 were grown in vitro in 75 ml glass tubes for plant tissue culture (SciLabware Limited) on 20 ml of half-strength Murashige and Skoog (MS) basal medium pH 5.5 ± 0.1 augmented with 0.6 mg l⁻¹ (w/v) thiamine, 100 mg l⁻¹ (w/v) myo-inositol, 30 g l⁻¹ (w/v) sucrose and 6 g l⁻¹ (w/v) agar. Plants were grown for 2 months in a growth chamber at 23 ± 1°C with a photoperiod of 16 h light.

A *P. viticola* population was collected from an untreated vineyard in northern Italy (Trentino region) in 2014 and maintained by subsequent inoculations on Pinot noir plants under greenhouse conditions at 25 ± 1°C, with a photoperiod of 16 h light and a relative humidity of 70 ± 10%, as described by Perazzolli et al. (2011). To obtain a sterile inoculum suspension of *P. viticola* sporangia, infected leaves showing early downy mildew symptoms (oil spots) were collected and washed in a 1% sodium hypochlorite solution for 10 min under orbital shaking at 80 r.p.m. (Márquez et al. 2007). Surface-sterilized leaves were washed three times for 5 min each in sterile distilled water under orbital shaking at 80 r.p.m. Leaves were transferred with the abaxial side uppermost onto sterile moist filter paper (three foils) in autoclaved glass Petri dishes (175 mm diameter), and incubated overnight in the dark at room temperature to allow downy mildew sporulation (Algarra Alarcon et al. 2015). Leaves bearing freshly sporulating lesions were transferred to a 50 ml sterile tube and gently washed with 5 ml of cold (4°C) sterile distilled water. The inoculum suspension was filtered with a sterile fine net and the concentration was adjusted to 4 × 10⁶ sporangia ml⁻¹ by counting with a hemocytometer under a light microscope.



Inoculation of grapevine leaves with *Plasmopara viticola* and sample collection

Leaves from 12 in vitro grown plants were detached and placed randomly on Petri dishes (92 mm diameter) containing 25 ml of 0.7 g l⁻¹ water agar (MicroAgar; Duchefa Biochemie). For each dish, 2–3 leaves were placed abaxial side uppermost. Five leaves were inoculated by applying six to eight 2 µl drops of the fresh *P. viticola* sporangia suspension to the abaxial surface of each leaf under sterile conditions (local-inoculated sample). In order to investigate the distal activation of grapevine defense, three leaves were inoculated exclusively in the area to the left of the primary vein by applying 3–4 drops of the sporangia suspension under sterile conditions (left-side inoculated leaf), and the area to the right of the primary vein was not inoculated with the pathogen (distal-inoculated sample). As control, the abaxial surfaces of six grapevine leaves were treated with 6–8 drops of sterile distilled water under sterile conditions (uninoculated sample). Leaves were incubated overnight in the dark at 25 ± 1°C to allow *P. viticola* infection, then dried using a sterile filter paper under sterile conditions, and samples were collected at 24 hpi from uninoculated and inoculated samples. This time point was chosen because it is associated with the formation of the substomatal vesicle and the primary hyphae of *P. viticola* (Unger et al. 2007, Godard et al. 2009), and with up-regulation of defense-related genes (Hamiduzzaman et al. 2005, Polesani et al. 2008, Trouvelot et al. 2008, Perazzoli et al. 2011, 2012).

Five replicates (each composed of 6–8 leaves for uninoculated and inoculated samples, respectively) were used for each sample, and the experiment was carried out twice. Four types of analysis were carried out for each replicate: (i) three half leaves of uninoculated and local-inoculated samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for gene expression analysis of the whole fresh leaves; (ii) three half leaves of uninoculated, local-inoculated and distal-inoculated samples were subjected to the fixation protocol for LMD; (iii) two half leaves of uninoculated and local-inoculated samples were stained with aniline blue to assess the proportion of infected stomata; and (iv) two leaves of uninoculated and local-inoculated samples were incubated on agar plates for 7 d in a growth chamber at 24 ± 1°C and a photoperiod of 16 h light to evaluate the development of downy mildew symptoms.

Aniline blue staining of *Plasmopara viticola* and assessment of the percentage of infected stomata

In order to observe *P. viticola* structures, leaf samples were stained with the KOH–aniline blue fluorescence method (Díez-Navajas et al. 2007) with slight modifications. Leaves were clarified in 1 M KOH at 95°C for 15 min and washed with fresh 1 M KOH by incubation at room temperature for 15 min. Samples were washed three times in distilled water for 15 min each, and incubated in the staining solution (0.05% aniline blue in 0.067 M K₂HPO₄ at pH 8.0) for 15 min. Leaf samples were transferred to microscope slides with the lower side up, and microscopic observations were carried out with an LMD7000 instrument (Leica Microsystems) using an LMD filter (BP filter 380–420 nm excitation, 415 dichroic mirror, and BP 445–485 nm emission). For each half leaf, 10 areas of 1 mm² each were randomly selected, and the number of stomata with encysted zoospores or with a substomatal vesicle with primary hyphae and haustoria (infected stomata) was visually assessed under the fluorescent microscope and expressed as a percentage of the total number of stomata.

Assessment of downy mildew severity

Disease severity was assessed visually at 7 d post-inoculation with *P. viticola* as a percentage of infected leaf area on the abaxial leaf surface according to standard guidelines of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO 2001). For each leaf, disease severity was expressed as a percentage of abaxial leaf area covered by white sporulation of *P. viticola* in relation to total leaf area.

Downy mildew severity was also assessed as the number of *P. viticola* sporangia per gram of leaf fresh weight. The fresh weight of all leaves of each replicate was determined and leaves were then washed by gently vortexing in 1 ml of sterile water for 1 min to collect *P. viticola* sporangia. The concentration of sporangia per ml was determined by counting with a hemocytometer under

a light microscope and it was converted to number of sporangia per gram of fresh weight of grapevine leaves (sporangia g⁻¹).

RNA extraction and cDNA synthesis from whole fresh leaves

For RNA extraction from whole fresh leaves, samples were homogenized by two grinding cycles at 25 Hz for 30 s in a mixer mill (Retsch Technology GmbH). Total RNA was extracted using the Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich), quantified by NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific), and its quality was checked by agarose gel electrophoresis.

The total RNA of whole fresh leaves was treated with DNase I (Invitrogen, Life Technologies), and the first-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using SuperScript III (Invitrogen, Life Technologies) and oligo(dT) primers. cDNA obtained from whole fresh leaves was diluted 10 times for real-time PCR analysis.

Tissue fixation for laser microdissection

Leaf samples were cut into small pieces (about 0.5 cm²) with a sharp razor blade in ice-cold fixative solution, and two different fixative solutions were tested: cold ethanol–acetic acid (3:1) solution and 100% acetone. Samples were immediately transferred in 3 ml of cold (0°C) fixative solution in a 20 ml plastic syringe (Artsana S.p.a). A vacuum was applied three times for 1 min each and rapidly released to allow fast penetration of the fixative solution into the leaf tissues (Vitha and Osteryoung 2011). Leaf samples were transferred into 30 ml of cold (0°C) fixative solution in a 50 ml sterile tube, incubated in ice for 10 min and gently swirled on a rotator (20 r.p.m.) at 4°C overnight. Fixed samples were stored in the fixative solution at -20°C for up to a maximum of 14 d prior to LMD. Preliminary experiments revealed that high-quality RNA can be extracted from samples stored for 5, 11 or 14 d in the fixative solution, but not those stored for 18 or 21 d.

Laser microdissection of grapevine leaves

The fixative solution was removed by decanting, and fixed leaves were washed briefly in 10 ml of PBS buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3 in RNase-free water). Fixed leaves were laid on PEN slides (Leica Microsystems) with the abaxial side up, dried at room temperature and subjected to LMD. LMD was carried out with an LMD7000 instrument (Leica Microsystems) using the ×40 objective and laser parameters power 48 mW, aperture 1, speed 5 ms, in order to isolate specifically stomata and the surrounding cells. Microdissected stomata and surrounding cells were collected from uninoculated and local-inoculated samples, and stomata cells were also microdissected from distal-inoculated samples. Microdissected cells were directly collected in a 0.5 ml RNase-free PCR tube cap containing 30 µl of extraction buffer (PicoPure RNA Isolation kit; Arcturus) that was located in the collection vessel directly under the microscope slides. In a preliminary experiment, different numbers of stomata (1, 10, 50, 100, 300 and 500) were collected from whole fixed leaves, and samples of at least 300 stomata, corresponding to >0.7 mm², showed good quantity and quality of extracted RNA. In order to limit the risk of RNA degradation and to prevent sample heating by the microscope lamp, each replicate was collected in two PCR caps (150 microdissected cells each) in <1.5 h.

After LMD, PCR tubes were closed and centrifuged at 3,000×g for 1 min to collect microdissected cells at the bottom. To transfer all collected cells to the tube bottom, the cap was washed with 20 µl of lysis buffer, and the tube was centrifuged at 3,000×g for 1 min. In order to verify the RNA quality at the end of the LMD and to analyze the gene expression levels of whole fixed leaves, leaf tissues that remained on the microscope slides were scraped off from the PEN slide and collected in 2 ml RNase-free PCR tubes. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

RNA extraction and cDNA synthesis from microdissected samples

RNA was extracted from microdissected cells using a PicoPure RNA Isolation kit and eluted in 14 µl of RNase-free water. RNA was extracted from whole fixed leaves using a PicoPure RNA Isolation kit with 200 µl of extraction buffer, 200 µl

of 70% ethanol and 25 μ l of RNase-free water. For each replicate, the two PCR tubes obtained by LMD were pooled after the lysis step. An RNase-free DNase set kit (Qiagen) was used during RNA extraction in order to remove genomic DNA.

The quality of RNA extracted from the microdissected cells and whole fixed leaves was assessed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) using an RNA 6000 Pico Assay kit (Agilent Technologies) and an RNA 6000 Nano Assay kit (Agilent Technologies), respectively.

For each replicate, 10 μ l (0.3–2.5 ng μ l⁻¹) of total RNA extracted from microdissected cells and 400 ng of total RNA extracted from whole fixed leaves were subjected to one round of RNA amplification using the MessageAmp II aRNA Amplification kit (Ambion, Life Technologies). The reaction was carried out at 37°C for 14 and 8 h for RNA of microdissected cells and whole fixed leaves, respectively. The amplified RNA (aRNA) was purified according to the manufacturer's instructions, eluted in 100 μ l of RNase-free water and quantified with a NanoDrop ND-8000 (Thermo Fisher Scientific). The aRNA from microdissected cells was concentrated to approximately 30 μ l in a vacuum centrifuge (Eppendorf). For both microdissected cells and whole fixed leaves, 14 μ l of aRNA (about 15–45 ng μ l⁻¹) were reverse-transcribed using the SuperScript VILO (Invitrogen, Life Technologies) in a total volume of 20 μ l. The cDNA was diluted 10 and 20 times for the detection of the *P. viticola* and grapevine genes by real-time PCR analysis, respectively.

Quality control of cDNA by PCR analysis

In order to verify the synthesis of cDNA and the absence of DNA contamination, PCR amplification was carried out from 1 μ l of cDNA, using intron-spanning primers designed on a grapevine *Actin* gene (VIT_204s0044g00580, Act_PCR_For: 5'-TGACAATGGAAGTGAATGGT-3'; Act_PCR_Rev: 5'-ATCAGCGAGCTCTATAGTTCTTC-3'). PCRs were carried out using DreamTaq DNA Polymerase (Fermentas) with a T-Professional Thermocycler (Biometra), using the following PCR conditions: 94°C for 2 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 68°C for 1 min. Amplification of the expected fragment without DNA contamination was verified by agarose gel electrophoresis.

Quantitative real-time PCR analysis

Quantitative real-time PCRs were carried out with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Life Technologies) and specific primers for markers of grapevine response to downy mildew (Table 1) using the Light Cycler 480 (Roche Diagnostics). Reactions were set with two initial steps at 55°C for 10 min and at 95°C for 2 min, followed by 50 and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min for the grapevine and *P. viticola* genes, respectively. Each sample was examined in three technical replicates, and dissociation curves were analyzed to verify the specificity of each amplification reaction. Cycle threshold (Ct) values were obtained by second derivative calculation using the Light Cycler 480 1.5.1.62 SP2 software (Roche). Reaction efficiencies were calculated with the LinRegPCR 11.1 software (Ruijter et al. 2009), and the relative expression level of each grapevine gene was calculated according to the Pfaffl equation (Pfaffl 2001) using uninoculated samples for calibration. Grapevine *Actin* (VIT_212s0178g00200) was used as the constitutive gene for normalization because its expression was not significantly affected by *P. viticola* inoculation (Polesani et al. 2010, Perazzolli et al. 2011). Pathogen development in the leaf samples was estimated from the expression of the LSU gene of *P. viticola* (KM279688) (Gindro et al. 2014), and normalized to the transcription level of the grapevine *Actin* gene (Casagrande et al. 2011).

Primer design

Primer pairs for the real-time PCR analysis of grapevine germin-like proteins (*GLP-2* and *GLP-7*) and *P. viticola* LSU genes, and for the PCR analysis of the grapevine *Actin* gene were designed using the Primer3 software V. 4.0 (<http://primer3.sourceforge.net>) and analyzed with the Oligo Analyzer V.1.0.2 (www.bio.net/bionet/mm/bio-soft/2001-September/023431.html).

Statistical analysis

Experiments were repeated and data were analyzed using Statistica 9 software (StatSoft). An *F*-test was used to demonstrate non-significant differences between two experiments ($P > 0.05$), and data from the two experimental

repetitions were pooled. Fold change values of gene expression analysis were transformed using the equation $y = \log_{10}(1 + x)$ (Casagrande et al. 2011). After validation of normal distribution (*K-S* test, $\alpha < 0.05$) and variance homogeneity of the data (Levene's test, $\alpha < 0.05$), analysis of variance (ANOVA) was carried out and Fisher's test ($\alpha = 0.05$) was applied to detect significant differences.

Supplementary data

Supplementary data are available at PCP online.

Funding

This work was supported by the European Union's Seventh Framework Programme for research (grant agreement No. 289497, CO-FREE project, theme KBBE.2011.1.2-06).

Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Algarra Alarcon, A., Lazazzara, V., Cappellin, L., Bianchedi, P.L., Schuhmacher, R., Wohlfahrt, G. et al. (2015) Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation in vitro. *J. Mass Spectrom.* 50: 1013–1022.
- Balestrini, R. and Bonfante, P. (2008) Laser microdissection (LM): applications to plant materials. *Plant Biosyst.* 142: 331–336.
- Balestrini, R., Gómez-Ariza, J., Lanfranco, L. and Bonfante, P. (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1055–1062.
- Banani, H., Roatti, B., Ezzah, B., Giovannini, O., Gesler, G., Pertot, I. et al. (2014) Characterization of resistance mechanisms activated by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. *Plant Pathol.* 63: 334–343.
- Barlass, M., Miller, R.M. and Antcliff, A.J. (1986) Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. I. Dual culture in vitro. *Amer. J. Enol. Vitic.* 37: 61–66.
- Casagrande, K., Falginella, L., Castellari, S.D., Testolin, R. and Di Gaspero, G. (2011) Defence responses in *Rpv3*-dependent resistance to grapevine downy mildew. *Planta* 234: 1097–1109.
- Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C.K. and Wildermuth, M.C. (2010) Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 460–465.
- Coker, T.L., Cevik, V., Beynon, J.L. and Gifford, M.L. (2015) Spatial dissection of the *Arabidopsis thaliana* transcriptional response to downy mildew using fluorescence activated cell sorting. *Front. Plant Sci.* 6: 527.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L. and Boubals, D. (1995) Histochemical responses of leaves of in vitro plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 85: 149–154.
- Damiani, L., Baldacci-Cresp, F., Hopkins, J., Andrio, E., Balzergue, S., Lecomte, P., et al. (2012) Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *New Phytol.* 194: 511–522.
- Day, R.C., McNoe, L.A. and Macknight, R.C. (2006) Transcript analysis of laser microdissected plant cells. *Physiol. Plant.* 129: 267–282.

- Diez-Navajas, A.M., Greif, C., Poutaraud, A. and Merdinoglu, D. (2007) Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Micron* 38: 680–683.
- Diez-Navajas, A.M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Greif, C. and Merdinoglu, D. (2008) Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* 98: 776–780.
- Dodds, P.N., Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Hardham, A.R., Jones, D.A. and Ellis, J.G. (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol.* 183: 993–1000.
- Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., et al. (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274: 998–1001.
- EPPO (2001) European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Guidelines for the efficacy evaluation of fungicides: *Plasmopara viticola*. EPPO Bull. 31: 313–317.
- Figueiredo, A., Monteiro, F., Fortes, A.M., Bonow-Rex, M., Zyprian, E., Sousa, L., et al. (2012) Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. *Funct. Integr. Genomics* 12: 379–386.
- Fiorilli, V., Catoni, M., Miozzi, L., Novero, M., Accotto, G.P. and Lanfranco, L. (2009) Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 184: 975–987.
- Gamm, M., Heloir, M.C., Bligny, R., Vaillant-Gaveau, N., Trouvelot, S., Alcaraz, G., et al. (2011) Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1061–1073.
- Gaude, N., Bortfeld, S., Duensing, N., Lohse, M. and Krajinski, F. (2012) Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *Plant J.* 69: 510–528.
- Gessler, C., Pertot, I. and Perazzolli, M. (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* 50: 3–44.
- Gindro, K., Lecoultre, N., Molino, L., de Joffrey, J.P., Schnee, S., Voinesco, F., et al. (2014) Development of rapid direct PCR assays to identify downy and powdery mildew and grey mould in *Vitis vinifera* tissue. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 48: 261–268.
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O. and Gindro, K. (2009) Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 827–837.
- Godfrey, D., Able, A.J. and Dry, I.B. (2007) Induction of a grapevine germin-like protein (*VvGLP3*) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: a possible role in defense? *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1112–1125.
- Guan, X., Buchholz, G. and Nick, P. (2014) Actin marker lines in grapevine reveal a gatekeeper function of guard cells. *J. Plant Physiol.* 171: 1164–1173.
- Hacquard, S., Delaruelle, C., Legué, V., Tisserant, E., Kohler, A., Frey, P., et al. (2010) Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 1275–1286.
- Hacquard, S., Tisserant, E., Brun, A., Legué, V., Martin, F. and Kohler, A. (2013) Laser microdissection and microarray analysis of *Tuber melanosporum* ectomycorrhizas reveal functional heterogeneity between mantle and Hartig net compartments. *Environ. Microbiol.* 15: 1853–1869.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.M. and Mauch-Mani, B. (2005) β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 819–829.
- He, M., Xu, Y., Cao, J., Zhu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., et al. (2013) Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma* 250: 129–140.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Kamoun, S. (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 41–60.
- Klug, K., Hogeckamp, C., Specht, A., Myint, S.S., Blöink, D., Küster, H., et al. (2015) Spatial gene expression analysis in tomato hypocotyls suggests cysteine as key precursor of vascular sulfur accumulation implicated in *Verticillium dahliae* defense. *Physiol. Plant.* 153: 253–268.
- 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.
- Legay, G., Marouf, E., Berger, D., Neuhaus, J.M., Mauch-Mani, B. and Slaughter, A. (2010) Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). *Eur. J. Plant Pathol.* 129: 281–301.
- Li, X., Wu, J., Yin, L., Zhang, Y., Qu, J. and Lu, J. (2015) Comparative transcriptome analysis reveals defense-related genes and pathways against downy mildew in *Vitis amurensis* grapevine. *Plant Physiol. Biochem.* 95: 1–14.
- Liu, R., Wang, L., Zhu, J., Chen, T., Wang, Y. and Xu, Y. (2015) Histological responses to downy mildew in resistant and susceptible grapevines. *Protoplasma* 252: 259–270.
- Malacarne, G., Vrhovsek, U., Zulini, L., Cestaro, A., Stefanini, M., Mattivi, F., et al. (2011) Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol.* 11: 114.
- Márquez, S.S., Bills, G.F. and Zabalgoitia, I. (2007) The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Divers.* 27: 171–195.
- Merz, P.R., Moser, T., Höll, J., Kortekamp, A., Buchholz, G., Zyprian, E., et al. (2015) The transcription factor VvWRKY33 is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defense against the oomycete pathogen *Plasmopara viticola*. *Physiol. Plant.* 153: 365–380.
- Mestre, P., Piron, M.C. and Merdinoglu, D. (2012) Identification of effector genes from the phytopathogenic oomycete *Plasmopara viticola* through the analysis of gene expression in germinated zoospores. *Fungal Biol.* 116: 825–835.
- Milli, A., Cecconi, D., Bortesi, L., Persi, A., Rinalducci, S., Zamboni, A., et al. (2012) Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. *J. Proteomics* 75: 1284–1302.
- Monteiro, S., Barakat, M., Piçarra-Pereira, M.A., Teixeira, A.R. and Ferreira, R.B. (2003) Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 93: 1505–1512.
- Nelson, T., Tausta, S.L., Gandotra, N. and Liu, T. (2006) Laser microdissection of plant tissue: what you see is what you get. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 181–201.
- Park, C.J., An, J.M., Shin, Y.C., Kim, K.J., Lee, B.J. and Paek, K.H. (2004) Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* 219: 797–806.
- Perazzolli, M., Moretto, M., Fontana, P., Ferrarini, A., Velasco, R., Moser, C., et al. (2012) Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics* 13: 660.
- Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E. and Pertot, I. (2011) *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biol. Control* 58: 74–82.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.

- Polesani, M., Bortesi, L., Ferrarini, A., Zamboni, A., Fasoli, M., Zadra, C., et al. (2010) General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics* 11: 117.
- Polesani, M., Desario, F., Ferrarini, A., Zamboni, A., Pezzotti, M., Kortekamp, A., et al. (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9: 142.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., et al. (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.* 77: 817–837.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Balkker, O., van den Hoff, M.J.B., et al. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37: e45.
- Santi, S., Grisan, S., Pierasco, A., De Marco, F. and Musetti, R. (2013) Laser microdissection of grapevine leaf phloem infected by stolbur reveals site-specific gene responses associated to sucrose transport and metabolism. *Plant Cell Environ.* 36: 343–355.
- Slaughter, A.R., Hamiduzzaman, M.M., Gindro, K., Neuhaus, J.M. and Mauch-Mani, B. (2008) Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 185–195.
- Swart, S., Logman, T.J.J., Smit, G., Lugtenberg, B.J.J. and Kijne, J.W. (1994) Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of rhizobiaceae. *Plant Mol. Biol.* 24: 171–183.
- Tang, W., Coughlan, S., Crane, E., Beatty, M. and Duwick, J. (2006) The application of laser microdissection to in planta gene expression profiling of the maize anthracnose stalk rot fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1240–1250.
- Trouvelot, S., Varnier, A.L., Allegre, M., Mercier, L., Baillieu, F., Arnould, C., et al. (2008) A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 232–243.
- Unger, S., Büche, C., Boso, S. and Kassemeyer, H.H. (2007) The course of colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host–pathogen interactions. *Phytopathology* 97: 780–786.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135–162.
- Vitha, S. and Osteryoung, K.W. (2011) Immunofluorescence microscopy for localization of *Arabidopsis* chloroplast proteins. *Methods Mol. Biol.* 774: 33–58.
- Voegele, R.T. and Mendgen, K. (2003) Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytol.* 159: 93–100.
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., et al. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* 36: 101–112.
- Wu, J., Zhang, Y., Zhang, H., Huang, H., Folta, K.M. and Lu, J. (2010) Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biol.* 10: 234.
- Yu, Y., Zhang, Y., Yin, L. and Lu, J. (2012) The mode of host resistance to *Plasmopara viticola* infection of grapevines. *Phytopathology* 102: 1094–1101.

ARTICLE

Q1

Knockdown of *MLO* genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevineStefano Pessina^{1,2}, Luisa Lenzi^{1,3}, Michele Perazzolli¹, Manuela Campa¹, Lorenza Dalla Costa¹, Simona Urso^{4,5}, Giampiero Valè^{4,5}, Francesco Salamini¹, Riccardo Velasco¹ and Mickael Malnoy¹

Erysiphe necator is the causal agent of powdery mildew (PM), one of the most destructive diseases of grapevine. PM is controlled by sulfur-based and synthetic fungicides, which every year are dispersed into the environment. This is why PM-resistant varieties should become a priority for sustainable grapevine and wine production. PM resistance can be achieved in other crops by knocking out susceptibility *S*-genes, such as those residing at genetic loci known as *MLO* (*Mildew Locus O*). All *MLO* *S*-genes of dicots belong to the phylogenetic clade V, including grapevine genes *VvMLO7*, *11* and *13*, which are upregulated during PM infection, and *VvMLO6*, which is not upregulated. Before adopting a gene-editing approach to knockout candidate *S*-genes, the evidence that loss of function of *MLO* genes can reduce PM susceptibility is necessary. This paper reports the knockdown through RNA interference of *VvMLO6*, *7*, *11* and *13*. The knockdown of *VvMLO6*, *11* and *13* did not decrease PM severity, whereas the knockdown of *VvMLO7* in combination with *VvMLO6* and *VvMLO11* reduced PM severity up to 77%. Thus, the knockdown of *VvMLO7* and *VvMLO6* seemed to be important for PM resistance, whereas a role for *VvMLO11* does not seem likely. Cell wall appositions (papillae) were present in both resistant and susceptible lines in response to PM attack. Thirteen genes involved in defense were less upregulated in infected *mlo* plants, highlighting the early *mlo*-dependent disruption of PM invasion.

Horticulture Research (2016) 3, 16016; doi:10.1038/hortres.2016.16; Published online xx xxx 2016

Keywords: *Erysiphe necator*; grapevine; *MLO* genes; powdery mildew; RNA interference; *Vitis vinifera*

INTRODUCTION

Vineyards are treated with an impressive amount of chemical compounds, particularly fungicides, to prevent yield losses due to fungal pathogens. In France, Italy, Spain and Germany, between 1992 and 2003, 73% of the fungicides were used for grapevine protection, a crop that covers only 8% of the agricultural land in those countries.¹

Worldwide, grapevine powdery mildew (PM), caused by the fungus *Erysiphe necator*, is a destructive disease.² *E. necator* Schw. (syn. *Uncinula necator* (Schw.) Burr.) is an obligate biotroph infecting all green tissues of grapevine and results in significant losses in yield and berry quality. Symptoms are a white or gray powder covering both leaf surfaces, and, after infection, the fruits show shriveling or cracking.³ The quality of the fruit is severely damaged, due to increased acidity and decreased anthocyanin and sugar content.⁴

PM can be controlled by frequent applications of fungicides, particularly those based on sulfur. However, due to the ecological drawbacks of fungicides,⁵ the relative high costs (up to 20% of total grapevine production expenses⁶) and the rapid appearance of resistant strains of the pathogen^{7–9} because of its adaptative gene copy-number variation,¹⁰ new alternatives to chemical treatments should be adopted. Resistant varieties are one of the best options. The use of PM-resistant cultivars could reduce production costs in California by 720 \$ ha⁻¹, with a significant reduction of fungicide usage.⁶

Vitis vinifera is susceptible to PM,¹¹ whereas North American *Vitis* species, due to their co-evolution with *E. necator*, have variable degrees of resistance to the pathogen.¹² Their resistances have been transferred to *V. vinifera* but the acceptance of resistant hybrids by producers and consumers has been very limited because of the attachment to traditions and lower quality of resulting wine, although resistant cultivar suitable for wine production are becoming available.⁶ One strategy to create crops resistant to diseases is based on the exploitation of R-genes that encode proteins that recognize pathogen effectors and trigger defense response,¹³ such as the *Vitis REN* and *RUN* genes.¹⁴ Resistance manifests as localized hypersensitive responses at the sites of attempted infection.¹⁵ However, R-genes are frequently overcome by mutations of the pathogen.¹⁶ An alternative approach is based on susceptibility genes (*S*-genes), which loss of function results in recessively inherited resistance.¹⁷ Knockout of *S*-genes may, however, induce pleiotropic phenotypes in the plant.^{18,19}

A typical class of *S*-genes is represented by the *MOL* (*Mildew Locus O*) genetic factors that, when inactivated, results in recessive *mlo* resistance, as discovered in barley.²⁰ *MLO* genes are largely conserved across the plant kingdom and their loss of function resulted in PM resistance in *Arabidopsis thaliana*,²¹ pea,¹⁸ tomato,²² wheat²³ and pepper.²⁴ Of the seven phylogenetic clades in which the *MLO* family is divided,^{25,26} only two include *S*-genes: clade IV with all monocot *S*-genes^{27,28} and clade V with all dicot

¹Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, via Edmund Mach 1, 38010 San Michele all'Adige, Italy; ²Wageningen UR Plant Breeding, Wageningen University and Research Centre, PO Box 386, 6700 AJ Wageningen, The Netherlands; ³Department of Ecological and Biological Sciences, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, Viterbo 01100, Italy; ⁴Council for Agricultural Research and Economics (CREA), Rice Research Unit, S.S. 11 per Torino km 25, Vercelli 13100, Italy and ⁵Council for Agricultural Research and Economics (CREA), Genomics Research Centre, Via San Protaso, 302, 29017, Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italy.
Correspondence: M Malnoy (mickael.malnoy@fmach.it)

Received: 29 November 2015; Revised: 15 March 2016; Accepted: 15 March 2016

S-genes.^{21,22,29,30} Not all members of clades IV and V are S-genes, but candidates can be identified during early stages of PM infection because of their increased expression, as documented in tomato,²² barley,³¹ pepper,²⁴ grapevine^{29,30} and apple.²⁶ In grapevine, of four clade V *MLO* genes, three (*VmLO7*, *VmLO11* and *VmLO13*) are upregulated early after PM infection, whereas *VmLO6*, the fourth, is not transcriptionally responsive to the pathogen.^{29,30}

MLOs are membrane proteins with seven transmembrane domains³² involved also in a variety of physiological processes in different tissues, such as root morphogenesis³³ and pollen tube reception by embryo sac.³⁴ The proposed function of *MLO* S-genes is the negative regulation of vesicle-associated and actin-dependent defense pathways at the site of PM penetration.²⁷ The secretory vesicle traffic controls pathogen penetration, allowing the formation of cell wall appositions called papillae,^{2,33} which are associated with *mlo* resistance.^{21,36}

The development of DNA-editing tools is rapidly changing plant genetics and biotechnology, due to the possibility of inducing mutations in specific genes.^{37–39} Before adopting a gene-editing approach to knockout candidate S-genes, the evidence that loss of function of *MLO* genes can reduce PM susceptibility is necessary. This paper reports the knockdown through RNA interference of *VmLO6*, 7, 11 and 13 and its effect on PM infection in grapevine.

MATERIALS AND METHODS

Constructs

Three hundred- to 600-bp fragments of genes *VmLO6*, *VmLO7*, *VmLO11* and *VmLO13* were amplified (Supplementary Table S1) and cloned in pENTR/SD-TOPO (Invitrogen). After checking the sequences, the fragments were inserted in the RNAi Gateway vector pK7GWG2D(II)⁴⁰ (<http://www.psb.ugent.be/>), as in Urso et al.⁴¹ After sequencing both the strands, the constructs were inserted in *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, as in Zottini et al.⁴² *A. tumefaciens*-transformed cells were tested by PCR for the presence of constructs, using primers annealing to the 35S promoter (5'-CGCACAAATCCCCTATCCTT-3') and the *MLO* fragment (Supplementary Table S1).

Plant material, gene transfer and screening of regenerants

Plant material of the grapevine cultivar long-cluster Brachetto was cultivated *in vitro* as described by Dalla Costa et al.⁴³ This cultivar was chosen because it is easy to transform,^{44,45} has high somatic embryogenesis efficiency and good efficiency of regeneration from the callus.⁴⁶ Somatic embryos were used for gene transfer. Gene transfer, regeneration and selection of transgenic plants were performed as in Dalla Costa et al.⁴³ Five different gene transfers were carried out; four aimed to silence the four *MLO* target genes and the fifth was a control consisting of the empty vector (pK2WVG7). DNA was extracted from *in vitro* leaf tissue (Phytopure kit, GE Healthcare, UK). Integration was proven using the primers described above. Transformed *in vitro* grown lines were moved to a woody plant medium⁴⁷ in growth chamber at 20–24 °C and transferred in fresh medium once a month.

Greenhouse acclimation

Plants were first acclimated to greenhouse conditions in a growth chamber at 25 °C, 16-h day/8-h night, relative humidity (RH) 70 ± 5%. One-month-old plants with at least two main roots 3-cm long were transferred in a 250-ml plastic cup containing wet autoclaved turf (Tercomposti Spa, Brescia, Italy) and sealed with parafilm, to preserve humidity. Every 7 days, holes were made in the parafilm cover to progressively reduce air humidity and promote the formation of the foliar cuticle. After 3 weeks, parafilm was completely removed and, after 1 more week, the plants were transplanted in 1 l pots kept in the greenhouse at 25 °C, 16-h day/8-h night, humidity 70 ± 5%.

E. necator and *P. viticola* inoculation and disease severity assessment

The *E. necator* and *P. viticola* inocula were obtained from infected leaves of an untreated vineyard in northern Italy (Trentino region). Subsequent

reproduction of the inoculum was carried out infecting the *V. vinifera* cultivar Pinot Noir, under greenhouse conditions. For *E. necator* inoculation, plants were dry inoculated onto target leaves gently brushing adaxial leaf surfaces with infected young leaves carrying fresh PM sporulation.⁴⁸ Inoculated plants were incubated in a greenhouse at 25 ± 1 °C with 100% RH for 6 h to promote fungal penetration, and then kept at 25 ± 1 °C and 70 ± 10% RH until the end of symptom evaluation. Disease severity was assessed on all leaves at 14, 22 and 30 days post inoculation (d.p.i.).

For *P. viticola* inoculation, fresh sporangia were collected by washing the abaxial surfaces, carrying freshly downy mildew (DM) sporulating lesions, with distilled water at 4 °C. Abaxial leaf surfaces were sprayed with the inoculum suspension of *P. viticola* (2 × 10⁵ sporangia per ml). Inoculated plants were incubated overnight in the dark at 25 °C with 99–100% RH, and then maintained under controlled greenhouse conditions at 25 ± 1 °C and 70 ± 10% RH. Six days after inoculation, plants were incubated overnight in darkness at 25 °C with 99–100% RH to allow DM sporulation and assess the disease severity.

Severity of PM and DM was assessed visually on all leaves of each plant, according to the standard guidelines of the European and Mediterranean Plant Protection Organization.^{49,50} For each leaf, disease severity was expressed as the proportion (percentage of 0–100%, with intervals of 5%) of the leaf area covered by white sporulation of PM or DM in relation to the total leaf area, and a mean value was calculated for each plant. Disease reduction was calculated as (disease severity in control plants – disease severity in transformed plants)/(disease severity in control plants) and expressed as a percentage. For PM severity, the area under disease progress curve was considered as a quantitative summary of disease intensity over time to analyze all time points together,^{51,52} using the following formula: area under disease progress curve = $\sum [(X_i + X_{i+1})/2] \times (t_{i+1} - t_i)$, where X_i corresponds to the disease severity (%) at assessment i , X_{i+1} corresponds to the disease severity (%) at subsequent assessment $i+1$ and $(t_{i+1} - t_i)$ corresponds to the number of days between the two consecutive assessments. PM severity was also assessed as the number of *E. necator* conidia produced from infected leaves as in Angeli et al.⁵³ Three leaves were collected from each replicate at 30 d.p.i. and four disks of 0.8 cm diameter for each leaf were cut, for a total of 12 disks per replicate. Leaf disks were transferred to 50-ml tubes containing 5 ml distilled water with 0.01% Tween-80 (Sigma-Aldrich). Tubes were vortexed for 1 min and the concentration of conidia per ml was determined by a hemocytometer count. The values obtained were converted in conidia per cm² of grapevine leaf. Two inoculation experiments were carried out and in each experiment three to nine biological replicates (plants) per line were analyzed in a randomized complete block design.

Histological analysis

Two inoculated leaves were collected from three replicates of each transgenic and control line at 3, 10 and 21 d.p.i. for hyphae visualization and histological analyses. Leaves were treated as described by Vanacker et al.⁵⁴ with the following modifications: small pieces of leaf with the adaxial surface up were laid on filter paper moistened with ethanol:glacial acetic acid (3:1, v/v) until the chlorophyll was removed. Leaf segments were transferred to water soaked filter paper for 2 h, incubated in lactoglycerol [lactic acid:glycerol:water 1:1:1 (v/v/v)] for 12 h and stored in lactoglycerol at room temperature. For microscopic analysis, leaf segments were mounted on microscope slides and a drop of aniline blue (0.1% (w/v) in lactoglycerol) was pipetted on their surface. Aniline blue staining does not fluoresce when in lactoglycerol and *E. necator* structures (hyphae, conidia and appressoria) were visualized using the bright-field illumination of a Leica LMD7000 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). After spore localization, fluorescence was used with a LMD filter (BP filter 380–420-nm excitation, 415 dichroic mirror, and BP 445–485-nm emission) to visualize the bright blue-green auto-fluorescence associated with infected cells and papillae (autofluorogenic phenolic compounds) formation.⁵⁴

RNA extraction and gene expression analysis

The first gene expression analysis of transgenic plants was carried out on *in vitro* grown lines to identify genotypes with reduced expression of target genes. Three biological replicates were collected from each line. The second analysis was carried out on acclimated transgenic plants, with leaf samples collected before inoculation, 24 h and 10 days post PM inoculation, the time of the last two samplings corresponding to the upregulation of *MLO* genes after infection.^{29,30} Five biological replicates

were collected from each line. For each line at each time point, the third and fifth half leaves from the top were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Total RNA was extracted with the Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich). Following a treatment with the DNase I (Sigma-Aldrich), the RNA was reverse-transcribed using the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, USA).

Quantitative PCR amplification (SYBR Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was carried out in a 15- μl volume (primers in Supplementary Table S2) and the results were recorded by a CFX96 Touch Real-Time PCR detection system (Bio-Rad), run by CFX Manager software. The software applies comparative quantification with an adaptive baseline. Each sample was run in two technical replicates with the following parameters: 95°C 3 min, 40 cycles of 95°C 10 s and 55°C 30 s, with a final step at 95°C 10 s. Primers for genes *VvMLO6*, *VvMLO11* and *VvMLO13* were taken from Winterhagen et al.³⁰ whereas for *VvMLO7* they were specifically designed (Supplementary Table S2). Primers for *VvWRKY19*, *VvWRKY27*, *VvWRKY48* and *VvWRKY52* were taken from Guo et al.,⁵⁵ for *VvEDS1* from Gao et al.⁵⁶ and for *VvPRI1*, *VvPR6* and *VvLXX9* from Dufour et al.⁵⁷ The new primer pairs were designed with the NCBI Primer Designing Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; Supplementary Table S2). Complementary DNA samples diluted 10, 100, 1000 and 10 000 times were used to test calculate the efficiency of the primers pairs and the size of the PCR products was confirmed by agarose gel electrophoresis. Presence of a specific final dissociation curve was determined after every quantitative PCR run with progressive increments of temperature from 65 to 95°C (0.5 $^{\circ}\text{C}$ each step, 5 s).

Reference genes were, as reported for grapevine,⁵⁸ *Elongation Factor 1 α* , *GAPDH* and *Actin*. Reference genes stability was assessed with GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>): the three genes had M-values < 0.5 , well below the threshold of 1.5 considered sufficient for stability.^{59–61}

Threshold cycles (Ct) were converted to relative expression following Hellemans et al.⁶² and based on the average Ct of two technical replicates. For *MLO* genes, the reference Ct was the average of all samples; for other genes, the control EVB (empty vector Brachetto) at $T=0$ was adopted.

Statistical analyses

Disease severity. Data were analyzed using the Statistica 9 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) and the package SPSS (IBM, Armonk, NY, USA). The smallest statistical unit considered was a plant. Severity values of all leaves were averaged, resulting in the value considered in further analyses. Normal distributions (Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests, $P > 0.05$) were validated for variances homogeneity (Levene's test, $P > 0.05$) and subsequently used for one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* test ($P < 0.05$) at each time point. Data were transformed in $\arcsin(x)$ to meet the pre-requisites of ANOVA. In case of non-homogeneous variances, the Games–Howell's *post hoc* test was used.

In some cases, data from two experiments were pooled and the ANOVA applied independently for each time point (14, 22 and 30 d.p.i.). Area under disease progress curve data were treated as for severity data. Conidia counts were analyzed with the Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

Quantitative PCR data analysis. Values of relative expression were expressed in logarithms²⁶ to obtain normal distributions and homogeneity of variances of the residues, as assessed with Shapiro–Wilk ($P \leq 0.05$) and Levene ($P \leq 0.05$). Homoscedastic data were analyzed with Tukey's test ($P < 0.05$) and non-homoscedastic with Games–Howell test ($P < 0.05$) using the statistical package SPSS (IBM).

Expression data from two experiments were analyzed independently and pooled. Differences were revealed by one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test ($P < 0.05$). In addition, a two-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test ($P < 0.05$), considered at the same time the effects of the transgenic line and of the time point. For the gene expression characterization of TLB4, Fisher's *post hoc* test was used.

RESULTS

Gene transfer, selection and acclimation of *MLO* transgenic lines
A total of five gene transfers were carried out. Four were aimed to knockdown (KD) specific *MLO* genes (i=KD-*VvMLO6*, ii=KD-*VvMLO7*, iii=KD-*VvMLO11*, iv=KD-*VvMLO13*), the fifth to insert an empty vector. Thirty-seven regenerated lines were obtained,

with 29 of them confirmed to contain the insert (Supplementary Table S3). The result of the PCR analysis of six lines is shown in Supplementary Figure S1. Twenty-six transgenic lines were propagated *in vitro* and tested for the silencing of *MLO* genes with quantitative PCR. Due to *in vitro* contaminations, three lines were lost before it was possible to test the level of expression. Gene knockdown evident for three lines out of eight from gene transfer (iii) (KD-*VvMLO11*), and three out of nine from gene transfer (iv) (KD-*VvMLO13*), whereas the lines regenerated from gene transfers (i) (KD-*VvMLO6*) and (ii) (KD-*VvMLO7*) did not show any reduction of expression (data not shown). Regenerated lines were also tested for off-target silencing, showing that the RNAi fragments targeted other clade V *MLO* genes (data not shown). Six lines with various combinations of silenced genes were selected and indicated with acronyms TLB1 (transgenic line of Brachetto) to TLB6 (Supplementary Table S3). Lines from TLB1 to 3 came from gene transfer (iii) (KD-*VvMLO11*), lines from TLB4 to TLB6 from gene transfer (iv) (KD-*VvMLO13*; Supplementary Table S3). The control was the EVB line. In addition, TLB7, a regenerated line with no reduction of expression, was also included. All lines, including the control, will be referred in the text as 'transgenic lines'. Lines from TLB1 to 7 are further indicated as 'RNAi lines' and from TLB1 to 6 'mlo lines'.

The survival rate of plants to the acclimation process was $\sim 85\%$. Under greenhouse conditions, the transgenic plants showed normal growth and no pleiotropic phenotypes.

PM and downy mildew resistance of transgenic lines

Two independent experiments of PM inoculation were carried out on the RNAi lines TLB1 to 7, and the transgenic control EVB. Three *mlo* lines, TLB4, 5 and 6, showed a reduction of *E. necator* infection $> 60\%$ at 30 d.p.i. (Figure 1; Table 1). The disease reduction of TLB6 decreased with the progression of the infection (Table 1). TLB1, 2, 3 and 7 had a level of susceptibility to PM comparable to EVB (Figure 1; Supplementary Figure S2). The leaf phenotypes in Figure 1 visualize the differences between the different lines. All the *mlo* lines showed fewer conidia at 30 d.p.i. compared with EVB and the decrease was statistically significant for TLB4, TLB5 and TLB6 (Supplementary Figure S3). Compared with EVB plants, TLB4, 5 and 6 had a reduction of 93%, 95% and 72%, respectively. Conidia counts and disease severity were, as expected, correlated ($R=0.58$; $P \leq 0.01$). The reduction of conidia in TLB 4, 5 and 6 (93, 95 and 72%) was higher than the reduction of PM symptoms (68.4, 76.6 and 65.1%), indicating that the leaf diseased area had a lower concentration of conidia in TLB 4, 5 and 6 compared with EVB.

Line TLB4 was characterized by histological analysis, demonstrating a reduced progression of PM infection compared with EVB (Figure 2). In EVB, conidiophores appeared at 10 and 21 d.p.i. they were present all over the leaf surface (Figure 2a), whereas on TLB4 leaves they were visible in a limited number only at 21 d.p.i. (Figure 2b). Histological analysis revealed the accumulation of autofluorescent phenolic compounds possibly associated to host cell response and papillae formation in both TLB4 and EVB plants at 3 d.p.i. (Figure 3).

An experiment was designed to test the cross-reaction of *mlo* lines to fungal pathogens different from PM. Three *mlo* lines (TLB1, 3 and 4) and the EVB control were inoculated with the downy mildew causal agent *Plasmopara viticola*. None of the plants were resistant and all plants showed statistically comparable levels of susceptibility to the pathogen (Supplementary Figure S4).

Expression of *MLO* genes in the *mlo* transgenic lines

The lines TLB1 to 6 and the EVB control were considered in a gene expression analysis. The results concerned four genes member of clade V and supported the off-target cross-silencing, as well as, some variability among samples of different time points (Figure 4).

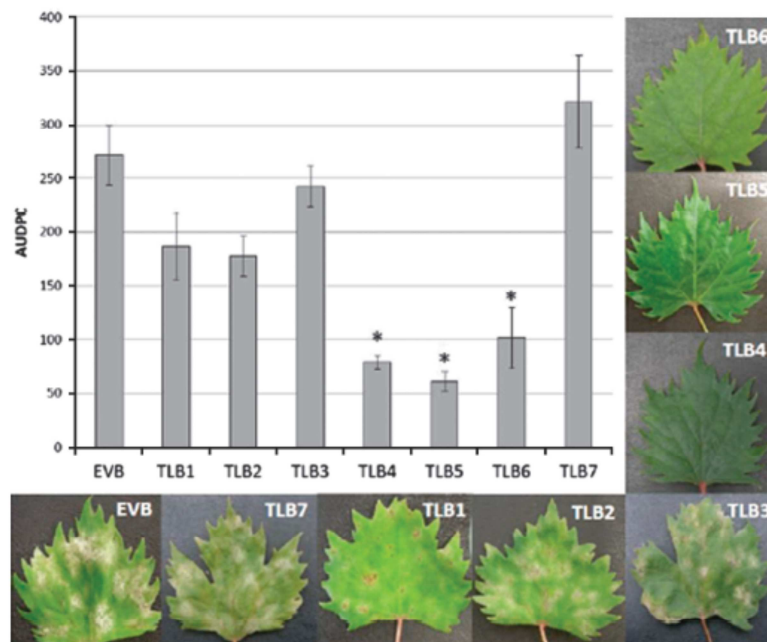


Figure 1. Area under disease progress curve (AUDPC) of grapevines inoculated with *Erysiphe necator* in control (EVB) and transgenic lines (TLB1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7). The average scores of AUDPC (from 8 to 19 biological replicates) from two experiments are reported. Error bars show s.e.m. The asterisks indicates statistically significant differences respect to the control line EVB, according to Tukey or Games-Howell *post hoc* test ($P=0.05$). The representative leaves reproduced here were collected 30 days after inoculation.

Table 1. Disease reduction of seven RNAi lines transformed with *MLO* knockdown constructs.

Gene transfer	Number of plants	Disease reduction (%) ^a			Average reduction (%)	
		14 d.p.i.	22 d.p.i.	30 d.p.i.		
TLB1	iii	8	22.8	32.3	34.3	29.8
TLB2	iii	15	49.2	37.2	23.8	36.8
TLB3	iii	15	17.9	14.8	2.0	11.6
TLB4	iv	19	60.8	71.7	72.8	68.4
TLB5	iv	14	76.7	79.1	74	76.6
TLB6	iv	11	71.8	63.1	60.3	65.1
TLB7	iii	13	-8.0 [#]	-21.5 ^b	-21.2 ^b	-16.9 ^b

Abbreviations: EVB, empty vector Brachetto; RNAi, RNA interference. ^aLine EVB was the control (12 replicates). Disease reduction was calculated as disease severity of EVB - disease severity of the transgenic line divided by disease severity of EVB × 100. ^bThe negative values of TLB7 indicate higher level of infection compared with EVB.

Lines TLB1, 2 and 3, all resulting from transformation (iii) (KD-*VvMLO11*), as expected had the target gene *VvMLO11* silenced. TLB1 showed also knockdown of *VvMLO13* and TLB3 of *VvMLO6* (Table 2). Lines TLB4, 5 and 6 derived from transformation (iv) (KD-*VvMLO13*) showed more off-target silencing: in TLB4 and 6, all four clade V *MLO* genes were, to some degree, significantly knocked down, whereas in TLB5 the expression of genes *VvMLO6*, 7 and 11 was reduced (Table 2).

Gene expression analysis of the *mlo* line TLB4

The expression profile at three time points of 13 genes not belonging to the *MLO* gene family and modulated by PM infection was carried out for the resistant line TLB4 and compared with the EVB line (Figure 5; Supplementary Table S4). The reason to choose TLB4 over the other resistant lines was that, in this line, all four *MLO* clade V genes were knocked down and the knockdown was more intense than TLB5 and 6. In EVB, seven of the genes tested were upregulated at 10 d.p.i. In TLB4, fewer genes were upregulated and the increase of expression was limited in terms of fold change (Figure 5; Supplementary Table S4). Moreover, three genes were downregulated in TLB4 after inoculation, namely, *VvPR6* (pathogenesis related) at 1 d.p.i. and *VvNPF3.2* (nitrate transporter/peptide transporter family) and *VvALS1* (acetolactate synthase) at 10 d.p.i. It is noteworthy that, before the inoculation, there were no differences in expression between TLB4 and the control EVB (Figure 5; Supplementary Table S4).

DISCUSSION

Loss-of-function mutations of *MLO* genes reduce susceptibility to PM in barley,⁶³ *A. thaliana*,²¹ pea,¹⁸ tomato,²² wheat²³ and pepper.²⁴ Because in dicots not all Clade V *MLO* S-genes are implicated in PM susceptibility,^{21,22,29,30} the aim of this work was to identify which of the clade V *MLO* genes of grapevine have a role in PM susceptibility and can be inactivated to develop resistant genotypes. Out of 26 transgenic lines tested, six from gene transfers (iii) (KD-*VvMLO11*) and (iv) (KD-*VvMLO13*) supported significant gene knockdown. In the regenerated lines obtained from gene transfers (i) (KD-*VvMLO6*) and (ii) (KD-*VvMLO7*), reduction of expression was not evident. It cannot be excluded

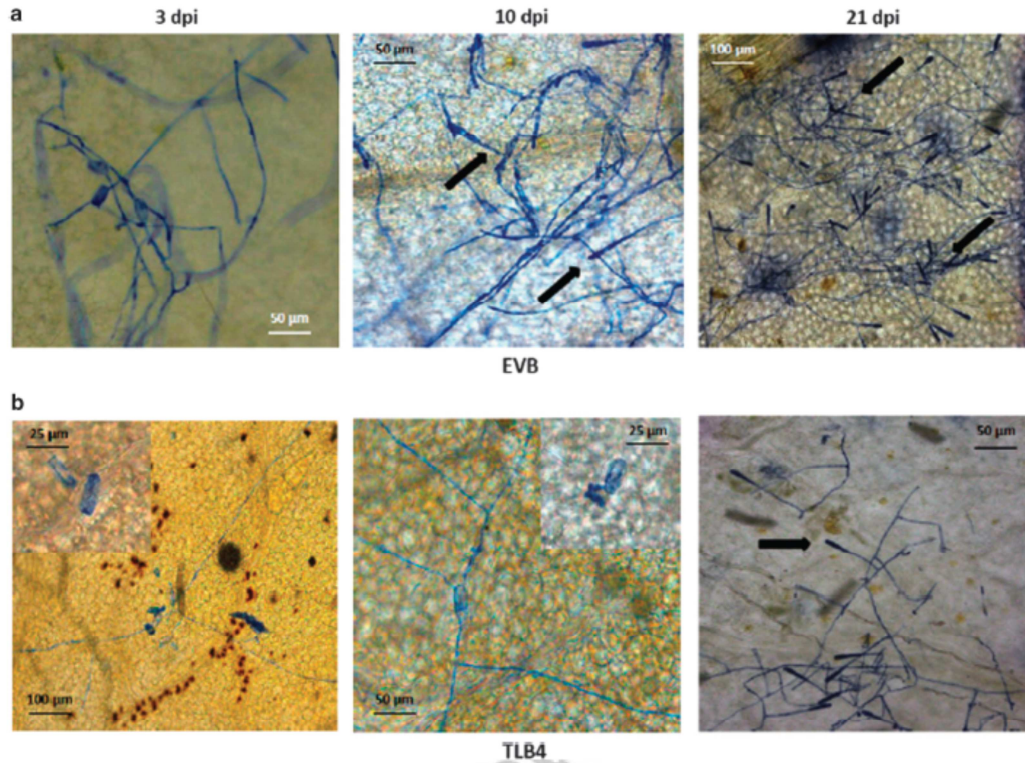


Figure 2. Germination of *E. necator* conidia in the control line EVB (a) and in the resistant transgenic line TLB4 (b). Microscopy images of infected leaves were taken at 3, 10 and 21 days post inoculation (d.p.i.) with powdery mildew. Insert at high magnification highlights the germination of an *E. necator* conidia at 3 and 10 d.p.i. The arrows indicate the conidiophores.

that this was due to the short RNAi fragments present in the constructs.⁶⁴ The detection of off-target silencing in five of the six mentioned lines was expected, as clade V *MLO* genes have high levels of sequence identity (36–60%, 46% on average^{29,30}). To find a balance between specificity (short RNAi fragments) and effectiveness (long RNAi fragments) is particularly difficult in gene families with high sequence similarity.⁶⁵ As the aim was to study the effect of the knockdown of four *MLO* genes quite similar to each other, we opted for long RNAi fragments, so that off-target silencing was not only expected but also desired.

Knockout and knockdown of *MLO* genes may induce pleiotropic phenotypes, such as necrotic spots on leaves and reduced grain yield in barley,²⁰ slow growth in *A. thaliana*²¹ and reduced plant size in pepper.²⁴ In grapevine, no pleiotropic phenotypes were observed under the experimental conditions adopted.

Lines TLB4, 5 and 6, which showed clear resistance to PM, allowed the investigation of the link between resistance and the expression of specific *MLO* genes. *VvMLO11* expression was significantly reduced in susceptible and resistant *mlo* lines: it is concluded that its knockdown was not directly linked to grapevine susceptibility to PM. *VvMLO6* was significantly silenced in the resistant lines TLB4, 5 and 6, and in the susceptible line TLB3. As for *VvMLO11*, the knockdown of *VvMLO6* in both susceptible and resistant lines indicates that this should not be an S-gene. Similarly to *VvMLO6*, *VvMLO13* was knocked down in the resistant lines TLB4 and 6, but also in the susceptible line TLB1. *VvMLO7* was knocked down only in the three resistant lines TLB4, 5 and 6, but it was always knocked down together with other two or three *MLO*

genes, as there was no line showing the knockdown of *VvMLO7* only. Therefore, the knockdown of multiple *MLO* genes provided resistance to PM. *VvMLO6* was also knocked down in all the resistant lines with a reduction of expression of 58–65%, whereas the reduction of its expression was of only 29% in the susceptible line TLB1, indicating that it can contribute to PM resistance. There are no information available about how the reduction of the expression of an S-gene affects disease severity: it could be a linear relationships, meaning that the reduction of expression causes a proportional reduction of disease severity or there could be a threshold above which the knockdown, even if statistically significant, does not cause any reduction of disease severity. Given the weak knockdown of *VvMLO6* in TLB1 (29%), it is possible that this hypothetical threshold was not surpassed, therefore we cannot rule out the possibility of a role for *VvMLO6*. This would be particularly surprising, as there are no precedence of *MLO* genes acting as S-genes without being upregulated on PM inoculation, such as *VvMLO6*.^{29,30} In conclusion, *VvMLO6* and *VvMLO7* are the main candidates for causing PM susceptibility in *V. vinifera*, with a possible additive activity.

A similar scenario was observed in *A. thaliana*, where the simultaneous knockout of three *MLO* genes is necessary to obtain complete PM resistance: knockout of *AtMLO2* results in a moderate level of resistance, whereas the knockout of *AtMLO6* and *AtMLO12*, alone or combined, does not decrease the intensity of the infection.²¹ When *AtMLO2* is knocked out together with *AtMLO6* or *AtMLO12*, the level of resistance rises to become complete when the three genes are knocked out together.²¹ In

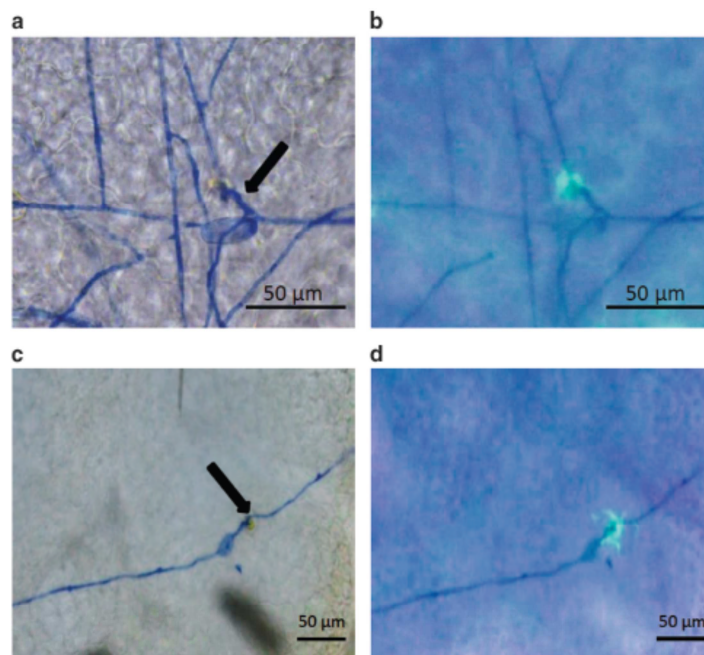


Figure 3. Microscopic visualization of powdery mildew infection in the control line EVB (a, b) and in the resistant transgenic line TLB4 (c, d). Microscopy images were taken with bright-field (a, c) and fluorescence (b, d) microscope at 3 days post inoculation (d.p.i.). One representative picture is reported for each line and arrows indicate germinated conidia. Scale bars, 50 μ m.

grapevine, *VvMLO7* is the best candidates to act as *A. thaliana AtMLO2*, whereas *VvMLO6* and *VvMLO11* might have an additive synergistic role in PM susceptibility, as their expression was also significantly reduced in all three resistant lines. In *A. thaliana*, the knockout of three *MLO* genes induces complete resistance,²¹ a situation not observed in grapevine, in agreement with the incomplete silencing of *MLO* genes obtained by the RNAi approach. A complementation test carried out in *A. thaliana mlo* triple mutant showed that *VvMLO11* and *VvMLO13* induce susceptibility to PM, whereas *VvMLO7* has only a partial effect and *VvMLO6* has no effect at all.⁶⁶ However, single and double *VvMLO11* and *VvMLO13* knockdown mutants of *V. vinifera* obtained by RNAi did not show significant reduction of PM penetration.¹⁵ Accordingly, our data indicated only a putative additive effect provided by *VvMLO11* and no role at all for *VvMLO13*. The differences observed with the results carried out by Feechan *et al.*⁶⁶ can be explained by the fact that they operated in a heterologous system (*A. thaliana*) not reproducing with fidelity the PM infection of grapevine plants.

The precise mechanism through which the reduction of *MLO* genes expression results in resistance to PM pathogens is not completely clear. Resistance seems linked to secretory vesicles traffic^{2,35} and to the formation of cell wall appositions called papillae.²¹ These structures consists of a callose matrix enriched in proteins and autofluorogenic phenolics compounds,⁵⁴ and their formation depends on endomembrane transport.⁶⁷ Our results showed the accumulation of autofluorogenic compounds at the infection sites of transgenic and control lines that reflects the host response and the papilla formation. This first observation suggested that papillae were accumulated in both TLB4 and EVB lines. A difference in dimension was noted between the two lines, but further investigations are required to clear whether this is a direct consequence of *MLO* knockdown or a random event.

Particularly, the use of specific staining protocols⁶⁸ would allow to better characterize the composition, dimensions and timing of papilla accumulation in resistant and susceptible lines. It is known that the defense response based on papillae differs between resistant and susceptible genotypes in timing of formation, composition and size.^{67–69} Particularly, Chowdhury *et al.*⁶⁸ showed that the difference between effective and non-effective papillae is due to the higher concentration of callose, cellulose and arabinoxylan of the effective ones. The *MLO* protein has been proposed to be a negative regulator of vesicle-associated and actin-dependent defense pathways at the site of attempted PM penetration.²⁷ Furthermore, Miklis *et al.*³⁵ proposed that, once *MLO* proteins are under the control of the fungus, actin filaments serve the purpose of supplying nutrients for the growing hyphae through vesicular transport. The pathogen may be able to control the transport of material to the cell wall, with the purpose of changing the composition of the papillae and turning them from effective to non-effective.

The formation of papillae is not the only process instigated by the activity of *MLO* genes. To understand the effect of *MLO* knockdown on other genes involved in plant–pathogen interaction, the expression of 13 genes known to be differentially expressed after PM inoculation^{55–57,66,70–74} was analyzed. The knockdown of *MLO* genes in the TLB4 line did not affect the expression levels of the 13 considered genes as compared with the EVB line in absence of PM infection. At 1 d.p.i., the response of the considered genes was very limited in both the lines tested, suggesting that the infection was not sufficient to trigger the response. Conversely, some differences between TLB4 and EVB lines were observed at 10 d.p.i. As a general trend, seven genes (*VvEDS1*, *VvPAD4*, *VvPR1*, *VvPR6*, *VvWRKY19*, *VvWRKY48* and *VvWRKY52*) were upregulated in EVB, reflecting the reaction of grapevine to PM. Conversely, only four genes (*VvLOX1*, *VvNPF3.2*,

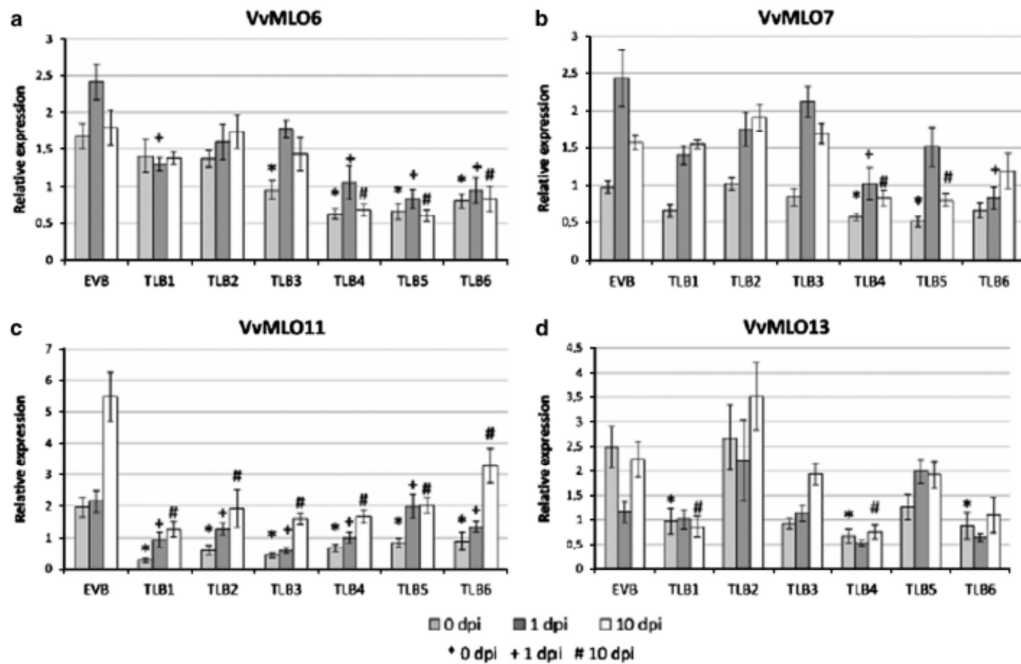


Figure 4. Gene expression of four grapevine MLO genes in the *mlo* lines TLB1, 2, 3, 4, 5 and 6, and in the control line EVB, following inoculation with *E. necator*. Expression of VvMLO6 (a), VvMLO7 (b), VvMLO11 (c) and VvMLO13 (d) was analyzed before (0 d.p.i.; light gray), 1 (dark gray) and 10 (white) days post inoculation. The mean scores of five to nine plants pooled from the two experiments are reported for each line. Error bars show s.e.m. For each time point, symbols highlight significant differences respect to the control EVB, according to Tukey or Games-Howell post hoc test ($P = 0.05$): *for 0 d.p.i., + for 1 d.p.i. and # for 10 d.p.i.

Table 2. Relative level of expression (RE%)^a of VvMLO6, 7, 11 and 13 in transgenic lines TBL1 to 7

	VvMLO6	VvMLO7	VvMLO11	VvMLO13
TLB1	67	72	25**	49**
TLB2	79	94	40**	156
TLB3	71*	93	27**	69
TLB4	38**	49**	34*	33**
TLB5	35**	55**	50**	88
TLB6	42**	53**	55**	45**
TLB7	83	85	51	57

*, **Indicates statistically significant difference at $P = 0.05$ and $P = 0.01$, respectively, according to the Tukey post hoc test. ^aEach RE% value is the average of time points 0, 1 and 10 d.p.i. and of two experiments. RE% = (RE of *mlo* line/RE of control EVB) × 100.

VvWRKY19 and VvWRKY52) were activated in TLB4, suggesting that the less severe PM infection was not sufficient to activate the defense pathways with the same intensity of the susceptible control EVB. Particularly, VvNPF3.2, a nitrite/nitrate transporter, is known to be upregulated in grapevine infected with *E. necator*⁷⁰ and it was downregulated in TLB4 at 10 d.p.i., indicating that only a severe infection could elicit VvNPF3.2 upregulation in this line. Three genes were upregulated at 10 d.p.i. in the control EVB but not in TLB4, namely, VvPR1, VvPR6 (pathogenesis related) and VvEDS1 (enhanced disease susceptibility). The two pathogenesis-related genes are involved in plant defense and are known to be

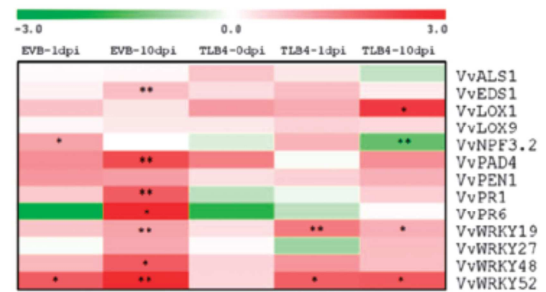


Figure 5. Relative expression of 13 grapevine genes at three time points in the control line EVB and in the resistant line TLB4. The color scale indicates the expression values relative to the control EVB at 0 d.p.i., used as reference for data normalization. The asterisks highlight statistically significant differences according to Fisher post hoc test. One and two asterisks indicate significance at $P = 0.05$ and $P = 0.01$, respectively. The image was prepared with the Multiexperiment Viewer software with the Log2 of relative expression data.

upregulated in PM-infected grapevine leaves pretreated with a salicylic acid (SA) analog,⁵⁷ whereas VvEDS1 is a grapevine defense gene involved in the SA pathway,⁵⁶ a plant growth regulator that activates pathogenesis-related genes and induces disease resistance.⁷¹ This may indicate that only a severe *E. necator*

infection triggers the plant defense depending on SA. However, the expression profiles observed in this two lines genes need to be confirmed by further gene expression studies that comprise more transgenic control and knockdown lines.

The knockout of MLO genes increased susceptibility to other pathogens in barley^{75,76} and *A. thaliana*.²¹ Not surprisingly, the infection with *P. viticola*, an obligate biotroph fungus such as *E. necator*, revealed that the knockdown of MLO genes did not change the susceptibility of grapevine to downy mildew, supporting the conclusion that MLOs S-genes are specific for *E. necator* and are not involved in the plant interaction with *P. viticola*.

This work provides crucial information that can be used in breeding grapevine varieties resistant to *E. necator*. The tagging via genome editing of the MLO genes identified in this paper should result in knockout mutants highly resistant to PM. Alternatively, the search in *V. vinifera* and in wild species of non-functional MLO alleles should contribute to the creation of durable resistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that on 08/07/2015 a patent protecting VmMLO genes has been submitted to the European Patent Office (EPO). The patent application number is PCT/EP2015/065624.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Valentino Poletti for the help with gene transfers and *in vitro* cultivation and acclimation and Oscar Giovannini for the help with disease severity assessment. This work was funded by the autonomous province of Trento (Italy) and the GMPF PhD program.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SP propagated and acclimated the transgenic lines, carried out the gene expression analysis and the statistical analysis and wrote the major part of the manuscript. LL designed and performed the inoculation experiments and visually assessed the symptoms with powdery and downy mildew, counted the conidia, took the microscopy pictures and revised the manuscript. MP designed the inoculation experiments, contributed to the analysis of severity and gene expression data, and revised the manuscript. MC carried out the grapevine gene transfer, identified false positives and revised the manuscript. LDC carried out the grapevine gene transfer and revised the manuscript. SU designed and built the construct for RNAi and revised the manuscript. GV conceived the project and revised the manuscript. RV conceived the project and revised the manuscript. FS conceived the project and revised the manuscript. MM conceived the project, contributed to data analysis and was the main reviser of the manuscript.

REFERENCES

- EUROSTAT EC. The use of plant protection products in the European Union. Data 1992-2003. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 2007. ISBN 92-79-03890-7.
- Feechan A, Kabbara S, Dry IB. Mechanisms of powdery mildew resistance in the Vitaceae family. *Mol Plant Pathol* 2011; **12**: 263–274.
- Wilcox WF. Grapevine Powdery Mildew. Publication number 102FG-SG-D2. New York State Integrated Pest Management Program 2013.
- Calonnec A, Cartolaro P, Poupot C, Dubourdieu D, Darriet P. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathol* 2004; **53**: 434–445.
- Wightwick A, Walters R, Allinson G, Reichman S, Menzies N. Environmental risks of fungicides used in horticultural production systems. *Fungicides Odile Carisse*, 2010; **62**: 380–390.
- Fuller KB, Alston JM, Sambucci O. The value of powdery mildew resistance in grapes: evidence from California. *Wine Econ Policy* 2014; **3**: 90–107.
- Baudoin A, Olaya G, Delmotte F, Colcol JF, Sierotki H. Qol resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the mid-Atlantic United States. *Plant Health Progress* 2008.

- Dufour MC, Fontaine S, Montary J, Corio-Costet MF. Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag Sci* 2011; **67**: 60–69.
- Kunova A, Pizzati C, Bonaldi M, Cortesi P. Metrafenone resistance in a population of *Erysiphe necator* in northern Italy. *Pest Manag Sci* 2012; **68**: 398–404.
- Jones L, Riaz S, Morales-Cruz A et al. Adaptive genomic structural variation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*. *BMC Genom* 2014; **15**: 1081.
- Gadoury DM, Seem RC, Ficke A, Wilcox WF. Ontogenic resistance to powdery mildew in grape berries. *Phytopathol* 2003; **93**: 547–555.
- Fung RWM, Gonzalo M, Fekete C et al. Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiol* 2008; **146**: 236–249.
- Dodds PN, Rathjen JP. Plant immunity: towards an integrated view of plant pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 539–548.
- Qiu W, Feechan A, Dry I. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Hort Res* 2015; **2**: 15020.
- Morel JB, Danq JL. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ* 1997; **4**: 671–683.
- Parlevliet JE. *What is Durable Resistance, a General Outline. Durability of Disease Resistance* In Jacobs TH, Parlevliet JE (eds.) Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, 1993, pp 23–29.
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol Breed* 2010; **25**: 1–12.
- Pavan S, Schiavulli A, Appiano M, Marcotrigiano AR, Cillo F, Visser RGF et al. Pea powdery mildew er1 resistance is associated to loss-of-function mutations at a MLO homologous locus. *Theor Appl Genet* 2011; **123**: 1425–1431.
- Van Schie CCN, Takken FLW. Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu Rev Phytopathol* 2014; **52**: 551–581.
- Jørgensen JH. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 1992; **63**: 141–152.
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA et al. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet* 2006; **38**: 716–720.
- Bai Y, Pavan S, Zheng Z et al. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of MLO function. *Mol Plant Microbe Interact* 2008; **21**: 30–39.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 2014; **32**: 947–952.
- Zheng Z, Nonomura T, Appiano M et al. Loss of function in Mlo orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. *PLoS One* 2013; **8**: e70723.
- Acevedo-García J, Kusch S, Panstruga R. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytol* 2014; **204**: 273–281.
- Pessina S, Pavan S, Catalano D et al. Characterization of the MLO gene family in Rosaceae and gene expression analysis in *Malus domestica*. *BMC Genomics* 2014; **15**: 618.
- Panstruga R. Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 389–392.
- Reinstädler A, Müller J, Czembor JH, Piffanelli P, Panstruga R. Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein. *BMC Plant Biol* 2010; **10**: 31.
- Feechan A, Jermakow AM, Torregrosa L, Panstruga R, Dry IB. Identification of grapevine MLO gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Funct Plant Biol* 2008; **35**: 1255–1266.
- Winterhagen P, Howard SF, Qiu W, Kovács LG. Transcriptional up-regulation of grapevine MLO genes in response to powdery mildew infection. *Am J Enol Vit* 2008; **59**: 2.
- Piffanelli P, Zhou FS, Casais C et al. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1076–1085.
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I et al. Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34993–35004.
- Chen Z, Noir S, Kwaaitaal M, Hartmann A, Wu MJ, Mudgil Y et al. Two seven-transmembrane domain MILDEW RESISTANCE LOCUS O proteins cofunction in Arabidopsis root thigmomorphogenesis. *Plant Cell* 2009; **21**: 1972–1991.
- Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, Wuest SE, Ingram G, Panstruga R et al. Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science* 2010; **330**: 968.
- Miklis M, Consonni C, Bhat RA, Lipka V, Schulze-Lefert P, Panstruga R et al. modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. *Plant Physiol* 2007; **144**: 1132–1143.

- 36 Aist JR, Bushnell WR Invasion of plants by powdery mildew fungi, and cellular mechanisms of resistance *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* In Cole GT, Hoch HC (eds.) Plenum press: New York, USA, 1991, pp 321–345.
- 37 Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III 2013 ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; **31**: 7.
- 38 Lozano-Juste J, Cutler SR. Plant genome engineering in full bloom. *Trends Plant Sci* 2014; **19**: 284–287.
- 39 Puchta H, Fauser F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J* 2014; **78**: 7276–7741.
- 40 Karimi M, Inze D, Depicker A. GATEWAYTM vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 193–195.
- 41 Urso S, Zottini M, Ruberti C et al. An Agrobacterium tumefaciens-mediated gene silencing system for functional analysis in grapevine. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2013; **114**: 49–60.
- 42 Zottini M, Barizza E, Costa A et al. Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Rep* 2008; **27**: 845–853.
- 43 Dalla Costa L, Pinto-Sintra AL, Campa M, Poletti V, Martinelli L, Malnoli M. Development of analytical tools for evaluating the effect of T-DNA chimeric integration on transgene expression in vegetatively propagated plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2014; **118**: 471–484.
- 44 Dalla Costa L, Vaccari I, Mandolini M, Martinelli L. Elaboration of a reliable strategy based on real-time PCR to characterize genetically modified plantlets and to evaluate the efficiency of a marker gene removal in grape (*Vitis* spp.). *J Agric Food Chem* 2009; **57**: 2668–2677.
- 45 Perrone I, Gambino G, Chitarra W, Vitali M, Pagliarini C, Riccomagno N et al. The grapevine root-specific aquaporin VvPIP2;4N controls root hydraulic conductance and leaf gas exchange under well-watered conditions but not under water stress. *Plant Physiol* 2012; **160**: 965–977.
- 46 Martinelli L, Gribaudo I, Bertoldi D, Candioli E, Poletti V. High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cultivars Chardonnay and Brachetto a grappolo lungo. *Vitis* 2001; **40**: 111–115.
- 47 McCown BH, Lloyd G. Woody plant medium (WPM) - a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *Hort Sci* 1981; **16**: 453.
- 48 Blaich R, Heintz C, Wind R. Studies on conidial germination and initial growth of the grapevine powdery mildew *Uncinula necator* on artificial substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; **30**: 415–421.
- 49 EPPO. Guideline for the biological evaluation of fungicides: uncinula necator. *EPPO Bull* 1998; **18**: 605–612.
- 50 EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Guidelines for the efficacy evaluation of fungicides: Plasmopara viticola. *EPPO Bull* 2001; **31**: 313–317.
- 51 Campbell CL, Madden LV. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley and Sons: New York, USA, 1990.
- 52 Madden LV, Hughes G, Van Den Bosch F. *The Study of Plant Disease Epidemics*. APS press: St. Paul, USA, 2007.
- 53 Angelì D, Puopolo G, Maurhofer M, Gessler C, Pertot I. Is the mycoparasitic activity of *Ampelomyces quisqualis* biocontrol strains related to phylogeny and hydrolytic enzyme production? *Biol Control* 2012; **63**: 348–358.
- 54 Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol* 2000; **123**: 1289–1300.
- 55 Guo C, Guo R, Xu X et al. Evolution and expression analysis of the grape (*V. vinifera*) WRKY gene family. *J Exp Bot* 2014; **65**: 1513–1528.
- 56 Gao F, Dai R, Pike SM, Qiu W, Gassmann W. Functions of EDS1-like and PAD4 genes in grapevine defenses against powdery mildew. *Plant Mol Biol* 2014; **86**: 381–393.
- 57 Dufour MC, Lambert C, Bouscaut J, Mérillon JM, Corio-Costet MF. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol* 2013; **62**: 370–382.
- 58 Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* 2006; **6**: 27.
- 59 Strube C, Buschbaum S, Wolken S, Schnieder T. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate protein disulfide isomerase transcription pattern in the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Gene* 2008; **425**: 36–43.
- 60 Van Hiel MB, Van Wielendaele P, Temmerman L et al. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Mol Bio* 2009; **10**: 56.
- 61 Ling D, Salvaterra PM. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. *PLoS One* 2011; **6**: 3.
- 62 Hellemans J, Mortier G, De Paeppe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007; **8**: R19.
- 63 Büschges R, Hollricher K, Panstruga R et al. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 1997; **88**: 695–705.
- 64 Preuss S, Pikaard CS. *RNA Interference (RNAi): Nuts & Bolts of siRNA Technology*. 2003.
- 65 Zhao W, Fanning ML, Lane T. Efficient RNAi-based gene family knockdown via set cover optimization. *Artif Intell Med* 2005; **35**: 61–73.
- 66 Feechan A, Jermakow AM, Ivancevic A et al. Host cell entry of powdery mildew is correlated with endosomal transport of antagonistically acting VvPEN1 and VvMLO to the papilla. *Mol Plant Microbe Interact* 2013; **26**: 1138–1150.
- 67 Hüchelhoven R. The effective papilla hypothesis. *New Phytol* 2014; **204**: 438–440.
- 68 Chowdhury J, Henderson M, Schweizer P, Burton RA, Fincher GB, Little A. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*. *New Phytol* 2014; **204**: 650–660.
- 69 Lyngkjær MF, Newton AC, Atzema JL, Baker SJ. The Barley mlo-gene: an important powdery mildew source. *Agronomie* 2000; **20**: 745–756.
- 70 Pike S, Gao F, Kim MJ, Kim SH, Schachtman DP, Gassmann W. Members of the NPF3 transporter subfamily encode pathogen-inducible Nitrate/Nitrite transporters in grapevine and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 2014; **55**: 162–170.
- 71 Ward ER, Uknes SJ, Williams SC et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1991; **3**: 1085–1094.
- 72 Lorek JA. Molecular characterization of mlo-based powdery mildew resistance and the role of heterotrimeric G-protein signaling in Arabidopsis defense. PhD dissertation: Universität zu Köln. 2012.
- 73 Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V et al. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 2003; **425**: 973–977.
- 74 Gao D, Huibers RP, Loonen AE, Visser RGF, Wolters AM, Bai Y. Down-regulation of acetolactate synthase compromises OI-1-mediated resistance to powdery mildew in tomato. *BMC Plant Biol* 2014; **14**: 32.
- 75 Jarosch B, Kogel KH, Schaffrath U. The ambivalence of the barley Mlo locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 1999; **12**: 508–514.
- 76 Kumar J, Hüchelhoven R, Beckhove U, Nagarajan S, Kogel KH. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathol* 2001; **91**: 127–133.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information for this article can be found on the *Horticulture Research* website (<http://www.nature.com/hortres>)

8 REFERENZE

- Acevedo-Garcia, J., Kusch, S. and Panstruga, R. (2014) Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist* 204: 273-281.
- Agrios, G.N. (2005) Plant pathology (Fifth edition). Florida: Elsevier.
- Algarra Alarcon, A., Lazazzara, V., Cappellin, L., Bianchedi, P.L., Schuhmacher, R., Wohlfahrt, G., Pertot, I., Biasioli, F. and Perazzolli, M. (2015) Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation *in vitro*. *Journal of Mass Spectrometry* 50: 1013-1022.
- Allègre, M., Daire, X., Heloir, M.C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M. and Pugin, A. (2007) Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytologist* 173: 832-840.
- Alleweldt, G. and Possingham, J.V. (1988) Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 669-673.
- Angeli, D. and Pertot, I. (2007) L'oidio della vite. Istituto Agrario di San Michele all'Adige. www.envirochange.eu/download/free_publications/2007_oidio_della_vite.pdf.
- Angeli, D., Puopolo, G., Maurhofer, M., Gessler, C. and Pertot, I. (2012) Is the mycoparasitic activity of *Ampelomyces quisqualis* biocontrol strains related to phylogeny and hydrolytic enzyme production? *Biological Control* 63: 348-358.
- Assaad, F.F., Qiu, J.L., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S.C., Edwards, H., Ramonell, K., Somerville, C.R. and Thordal-Christensen, H. (2004) The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5118-5129.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bezier, A., Lambert, B., Joubert, J.M. and Pugin, A. (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 1118-1128.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhucq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. and Vernet, G. (2006) Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* 96: 1188-1194.
- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N.F., Reinstaedler, A., Lotti, C., De Giovanni, C., Ricciardi, L., Lindhout, P., Visser, R., Theres, K. and Panstruga, R. (2008) Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a central American tomato accession is caused by loss of *Mlo* function. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 30-39.
- Baldacci, E. (1947) Epifittie di *Plasmopara viticola* (1941-1946) nell'Oltrepò pavese ed adozione del calendario di incubazione come strumento di lotta. *Atti Istituto Botanico Laboratorio Crittogamico di Pavia* 8: 45-85.
- Baldacci, E. and Refatti, E. (1956) La lotta contro le due maggiori ampelopatie: peronospora (*Plasmopara viticola*) e oidio (*Uncinula necator*) in relazione alla conoscenza dei periodi di incubazione e dei cicli biologici. *Annali della Facoltà di Agraria di Milano* V 35: 151-178.
- Balestrini, R. and Bonfante, P. (2008) Laser microdissection (LM): applications to plant materials. *Plant Biosystems* 142: 331-336.
- Balestrini, R., Gómez-Ariza, J., Klink, V.P. and Bonfante, P. (2009) Application of Laser Microdissection to plant pathogenic and symbiotic interactions. *Journal of Plant Interactions* 4: 81-92.
- Balestrini, R., Gómez-Ariza, J., Lanfranco, L. and Bonfante, P. (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1055-1062.
- Banani, H., Roatti, B., Ezzahi, B., Giovannini, O., Gessler, G., Pertot, I. and Perazzolli, M. (2014) Characterization of resistance mechanisms activated by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. *Plant Pathology* 63: 334-343.
- Barlass, M., Miller, R.M. and Antcliff, A.J. (1986) Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. I. Dual culture *in vitro*. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 61-66.
- Belhadj, A., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.F. and Merillon, J.M. (2008) Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5781-5787.
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R. and Di Gaspero, G. (2009) Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics* 120: 163-176.
- Bhat, R.A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102: 3135-3140.

- Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dumas, V., Mestre, P. and Merdinoglu, D. (2012) A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics* 125: 1663-1675.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M.A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A. and Soustre-Gacougnolle, I. (2013) Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology* 13: 31.
- Boubakri, H., Wahab, M.A., Chong, J., Bertsch, C., Mliki, A. and Soustre-Gacougnolle, I. (2012) Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defense responses, including HR like-cell death. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 120-133.
- Brandt, S., Kehr, J., Walz, C., Imlau, A., Willmitzer, L. and Fisahn, J. (1999) A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal, mesophyll and companion cells of intact leaves. *The Plant Journal* 20: 245-250.
- Burruano, S., Alfonzo, A., Lo Piccolo, S., Conigliaro, G., Mondello, V., Torta, L., Moretti, M. and Assante, G. (2008) Interaction between *Acremonium byssoides* and *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera*. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 122-131.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., vanDaelen, R., vanderLee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F. and Schulze-Lefert, P. (1997) The barley *mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705.
- Casagrande, K., Falginella, L., Castellarin, S.D., Testolin, R. and Di Gaspero, G. (2011) Defence responses in *Rpv3*-dependent resistance to grapevine downy mildew. *Planta* 234: 1097-1109.
- Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C.K. and Wildermuth, M.C. (2010) Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 107: 460-465.
- Chen, W.J., Delmotte, F., Richard-Cervera, S., Douence, L., Greif, C. and Corio-Costet, M.F. (2007) At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5162-5172.
- Chen, Y., Wang, Y. and Zhang, H. (2014) Genome-wide analysis of the mildew resistance locus o (*MLO*) gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Omics* 7: 87-93.
- Chen, Z., Hartmann, H.A., Wu, M.J., Friedman, E.J., Chen, J.G., Pulley, M., Schulze-Lefert, P., Panstruga, R. and Jones, A.M. (2006) Expression analysis of the *AtMLO* gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Molecular Biology* 60: 583-597.
- Chen, Z., Noir, S., Kwaaitaal, M., Hartmann, H.A., Wu, M.J., Mudgil, Y., Sukumar, P., Muday, G., Panstruga, R. and Jones, A.M. (2009) Two seven-transmembrane domain MILDEW RESISTANCE LOCUS O proteins cofunction in *Arabidopsis* root thigmomorphogenesis. *The Plant Cell* 21: 1972-1991.
- Chowdhury, J., Henderson, M., Schweizer, P., Burton, R.A., Fincher, G.B. and Little, A. (2014) Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytologist* 204: 650-660.
- Coker, T.L., Cevik, V., Beynon, J.L. and Gifford, M.L. (2015) Spatial dissection of the *Arabidopsis thaliana* transcriptional response to downy mildew using Fluorescence Activated Cell Sorting. *Frontiers in Plant Science* 6: 527.
- Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.L., Huckelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C. and Schulze-Lefert, P. (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425: 973-977.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B. and Prime, A.P.G. (2006) Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1062-1071.
- Consonni, C., Humphry, M.E., Hartmann, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S.C. and Panstruga, R. (2006) Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics* 38: 716-720.
- Corio-Costet, M.F., Dufour, M.C., Cigna, J., Abadie, P. and Chen, W.J. (2011) Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 129: 315-329.
- Crisp, P., Wicks, T.J., Lorimer, M. and Scott, E.S. (2006) An evaluation of biological and abiotic controls for grapevine powdery mildew. 1. Greenhouse studies. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12: 192-202.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L. and Boubals, D. (1995) Histochemical responses of leaves of *in vitro* plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 85: 149-154.
- Dalla Costa, L., Pinto-Sintra, A.L., Campa, M., Poletti, V., Martinelli, L. and Malnoy, M. (2014) Development of analytical tools for evaluating the effect of T-DNA chimeric integration on transgene expression in vegetatively propagated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 471-484.

- Damiani, I., Baldacci-Cresp, F., Hopkins, J., Andrio, E., Balzergue, S., Lecomte, P., Puppo, A., Abad, P., Favery, B. and Herouart, D. (2012) Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *New Phytologist* 194: 511-522.
- Day, R.C., Grossniklaus, U. and Macknight, R.C. (2005) Be more specific! Laser-assisted microdissection of plant cells. *Trends in Plant Science* 10: 397-406.
- Day, R.C., McNoe, L.A. and Macknight, R.C. (2006) Transcript analysis of laser microdissected plant cells. *Physiologia Plantarum* 129: 267-282.
- Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clement, C., Baillieul, F., Dorey, S. and Cordelier, S. (2014) Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 4837-4846.
- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Deshmukh, R., Singh, V.K. and Singh, B.D. (2014) Comparative phylogenetic analysis of genome-wide *Mlo* gene family members from *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 289: 345-359.
- Devoto, A., Hartmann, H.A., Piffanelli, P., Elliott, C., Simmons, C., Taramino, G., Goh, C.S., Cohen, F.E., Emerson, B.C., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. (2003) Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. *Journal of Molecular Evolution* 56: 77-88.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G. and Schulze-Lefert, P. (1999) Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *Journal of Biological Chemistry* 274: 34993-35004.
- Díez-Navajas, A.M., Greif, C., Poutaraud, A. and Merdinoglu, D. (2007) Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Micron* 38: 680-683.
- Díez-Navajas, A.M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Greif, C. and Merdinoglu, D. (2008) Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* 98: 776-780.
- Dodds, P.N., Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Hardham, A.R., Jones, D.A. and Ellis, J.G. (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist* 183: 993-1000.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11: 539-548.
- Dufour, M.C., Fontaine, S., Montarry, J. and Corio-Costet, M.F. (2011) Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science* 67: 60-69.
- Dufour, M.C., Lambert, C., Bouscaut, J., Merillon, J.M. and Corio-Costet, M.F. (2013) Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* 62: 370-382.
- Elliott, C., Muller, J., Miklis, M., Bhatt, R.A., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. (2005) Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop-loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein. *Biochemical Journal* 385: 243-254.
- Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A. and Liotta, L.A. (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274: 998-1001.
- EPPO (1988) Guideline for the biological evaluation of fungicides. No. 4. *Uncinula necator*. *EPPO Bulletin* 18: 605-612.
- EPPO (2001) European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Guidelines for the efficacy evaluation of fungicides: *Plasmopara viticola*. *EPPO Bulletin* 31: 313-317.
- FAOSTAT (2014) The food and agriculture organization corporate statistical database. «www.fao.org.» www.fao.org. 2013. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- Feechan, A., Anderson, C., Torregrosa, L., Jermakow, A., Mestre, P., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Walker, A.R., Cadle-Davidson, L., Reisch, B., Aubourg, S., Bentahar, N., Shrestha, B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.F., Thomas, M.R. and Dry, I.B. (2013a) Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. *The Plant Journal* 76: 661-674.
- Feechan, A., Jermakow, A.M., Ivancevic, A., Godfrey, D., Pak, H., Panstruga, R. and Dry, I.B. (2013b) Host cell entry of powdery mildew is correlated with endosomal transport of antagonistically acting VvPEN1 and VvMLO to the papilla. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 1138-1150.
- Feechan, A., Jermakow, A.M., Torregrosa, L., Panstruga, R. and Dry, I.B. (2008) Identification of grapevine *MLO* gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Functional Plant Biology* 35: 1255-1266.

- Feechan, A., Kabbara, S. and Dry, I.B. (2011) Mechanisms of powdery mildew resistance in the Vitaceae family. *Molecular Plant Pathology* 12: 263-274.
- Feechan, A., Kocsis, M., Riaz, S., Zhang, W., Gadoury, D.M., Walker, M.A., Dry, I.B., Reisch, B. and Cadle-Davidson, L. (2015) Strategies for *RUN1* deployment using *RUN2* and *REN2* to manage grapevine powdery mildew informed by studies of race specificity. *Phytopathology* 105: 1104-1113.
- Fekete, C., Fung, R.W.M., Szabó, Z., Qiu, W., Chang, L., Schachtman, D.P. and Kovács, L.G. (2009) Up-regulated transcripts in a compatible powdery mildew-grapevine interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 732-738.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S.S., Picarra-Pereira, M.A. and Teixeira, A.R. (2004) Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends in Biotechnology* 22: 168-173.
- Figueiredo, A., Monteiro, F., Fortes, A.M., Bonow-Rex, M., Zyprian, E., Sousa, L. and Pais, M.S. (2012) Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. *Functional and Integrative Genomics* 12: 379-386.
- Fiorilli, V., Catoni, M., Miozzi, L., Novero, M., Accotto, G.P. and Lanfranco, L. (2009) Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 184: 975-987.
- Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology* 9: 275-296.
- Fung, R.W., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L.G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L.M., Schachtman, D.P. and Qiu, W. (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology* 146: 236-249.
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J. and Waterhouse, P.M. (2006) RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Reports* 7: 1168-1175.
- Gadoury, D.M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W.F., Dry, I.B., Seem, R.C. and Milgroom, M.G. (2012) Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology* 13: 1-16.
- Galbraith, D.W. and Birnbaum, K. (2006) Global studies of cell type-specific gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 451-475.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Gamm, M., Heloir, M.C., Bligny, R., Vaillant-Gaveau, N., Trouvelot, S., Alcaraz, G., Frettinger, P., Clement, C., Pugin, A., Wendehenne, D. and Adrian, M. (2011) Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1061-1073.
- Gao, F., Dai, R., Pike, S.M., Qiu, W. and Gassmann, W. (2014) Functions of *EDS1*-like and *PAD4* genes in grapevine defenses against powdery mildew. *Plant Molecular Biology* 86: 381-393.
- Gaude, N., Bortfeld, S., Duensing, N., Lohse, M. and Krajinski, F. (2012) Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal* 69: 510-528.
- Gessler, C., Pertot, I. and Perazzolli, M. (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 3-44.
- Giannakis, C., Bucheli, C.S., Skene, K.G.M., Robinson, S.P. and Scott, N.S. (1998) Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 14-22.
- Gindro, K., Lecoultre, N., Molino, L., de Joffrey, J.P., Schnee, S., Voinesco, F., Alonso-Villaverde, V., Viret, O. and Dubuis, P.H. (2014) Development of rapid direct PCR assays to identify downy and powdery mildew and grey mould in *Vitis vinifera* tissue. *Journal International des Science de la Vigne et du Vin* 48: 261-268.
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O. and Gindro, K. (2009) Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 827-837.
- Godfrey, D., Able, A.J. and Dry, I.B. (2007) Induction of a grapevine germin-like protein (*VvGlp3*) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: A possible role in defense? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1112-1125.
- Guan, X., Buchholz, G. and Nick, P. (2014) Actin marker lines in grapevine reveal a gatekeeper function of guard cells. *Journal of Plant Physiology* 171: 1164-1173.
- Guo, C., Guo, R., Xu, X., Gao, M., Li, X., Song, J., Zheng, Y. and Wang, X. (2014) Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) *WRKY* gene family. *Journal of Experimental Botany* 65: 1513-1528.

- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K. and Park, S.W. (2012) Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78: 51-65.
- Hacquard, S., Delaruelle, C., Legué, V., Tisserant, E., Kohler, A., Frey, P., Martin, F. and Duplessis, S. (2010) Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 1275-1286.
- Hacquard, S., Tisserant, E., Brun, A., Legué, V., Martin, F. and Kohler, A. (2013) Laser microdissection and microarray analysis of *Tuber melanosporum* ectomycorrhizas reveal functional heterogeneity between mantle and Hartig net compartments. *Environmental Microbiology* 15: 1853-1869.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.M. and Mauch-Mani, B. (2005) β -aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 819-829.
- Hammond-Kosack, K.E. and Parker, J.E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 177-193.
- He, M., Xu, Y., Cao, J., Zhu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Guan, X., Yang, Y., Xu, W. and Fu, Z. (2013) Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma* 250: 129-140.
- Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 315-319.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8: R19.
- Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovacs, L., Howard, S., Kiss, E., Galbacs, Z., Testolin, R. and Kozma, P. (2008) Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 427-438.
- Hood, M.E. and Shew, H.D. (1996) Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* 86: 704-708.
- Horiguchi, G. (2004) RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. *Differentiation* 72: 65-73.
- Hueckelhoven, R. (2014) The effective papilla hypothesis. *New Phytologist* 204: 438-440.
- Iriti, M., Vitalini, S., Di Tommaso, G., D'Amico, S., Borgo, M. and Faoro, F. (2011) New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17: 263-269.
- ISTAT (2010): Istituto nazionale di statistica. <http://www.istat.it/it/censimento-agricoltura/agricoltura-2010>.
- Jacobs, A.K., Dry, I.B. and Robinson, S.P. (1999) Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology* 48: 325-336.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pe, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wincker, P. and French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome, C. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467.
- Jarosch, B., Kogel, K.H. and Schaffrath, U. (1999) The ambivalence of the barley *Mlo* locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 508-514.
- Jaulneau, V., Lafitte, C., Corio-Costet, M.F., Stadnik, M.J., Salamagne, S., Briand, X., Esquerre-Tugaye, M.T. and Dumas, B. (2011) An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 131: 393-401.
- Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., Esquerre-Tugaye, M.T. and Dumas, B. (2010) Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 525291.
- Jeger, M.J. and Viljanen-Rollinson, S.L.H. (2001) The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 32-40.
- Jiwan, D., Roalson, E.H., Main, D. and Dhingra, A. (2013) Antisense expression of peach mildew resistance locus O (*PpMlo1*) gene confers cross-species resistance to powdery mildew in *Fragaria x ananassa*. *Transgenic Research* 22: 1119-1131.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.

- Jørgensen, J.H. (1992) Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63: 141-152.
- Jürges, G., Kassemeyer, H.H., Duerrenberger, M., Dueggelin, M. and Nick, P. (2009) The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology* 11: 886-898.
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T. and Helm, J.M. (2008) RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell* 100: 13-26.
- Kamoun, S. (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 44: 41-60.
- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A. (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193-195.
- Karrer, E.E., Lincoln, J.E., Hogenhout, S., Bennett, A.B., Bostock, R.M., Martineau, B., Lucas, W.J., Gilchrist, D.G. and Alexander, D. (1995) In situ isolation of mRNA from individual plant-cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 3814-3818.
- Kerk, N.M., Ceserani, T., Tausta, S.L., Sussex, I.M. and Nelson, T.M. (2003) Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiology* 132: 27-35.
- Kessler, S.A., Shimosato-Asano, H., Keinath, N.F., Wuest, S.E., Ingram, G., Panstruga, R. and Grossniklaus, U. (2010) Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science* 330: 968-971.
- Kiefer, B., Riemann, M., Buche, C., Kassemeyer, H.H. and Nick, P. (2002) The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* 215: 387-393.
- Kikkert, J.R., Vidal, J.R. and Reisch, B.I. (2005) Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Transgenic Plants: Methods and Protocols* 286: 61-78.
- Kim, D.S. and Hwang, B.K. (2012) The pepper *MLO* gene, *CaMLO2*, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation. *The Plant Journal* 72: 843-855.
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J. and Schulze-Lefert, P. (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447-450.
- Klug, K., Hogeckamp, C., Specht, A., Myint, S.S., Blöink, D., Küster, H. and Horst, W.J. (2015) Spatial gene expression analysis in tomato hypocotyls suggests cysteine as key precursor of vascular sulfur accumulation implicated in *Verticillium dahliae* defense. *Physiologia Plantarum* 153: 253-268.
- Konishi, S., Sasakuma, T. and Sasanuma, T. (2010) Identification of novel *Mlo* family members in wheat and their genetic characterization. *Genes and Genetic Systems* 85: 167-175.
- Koornneef, A. and Pieterse, C.M. (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839-844.
- Kortekamp, A. (2006) Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 58-67.
- Kumar, J., Huckelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S. and Kogel, K.H. (2001) A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* 91: 127-133.
- Lachhab, N., Sanzani, S.M., Adrian, M., Chiltz, A., Balacey, S., Boselli, M., Ippolito, A. and Poinssot, B. (2014) Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science* 5: 716.
- Le Henanff, G., Profizi, C., Courteaux, B., Rabenoelina, F., Gerard, C., Clement, C., Baillieux, F., Cordelier, S. and Dhondt-Cordelier, S. (2013) Grapevine NAC1 transcription factor as a convergent node in developmental processes, abiotic stresses, and necrotrophic/biotrophic pathogen tolerance. *Journal of Experimental Botany* 64: 4877-4893.
- Legay, G., Marouf, E., Berger, D., Neuhaus, J.M., Mauch-Mani, B. and Slaughter, A. (2010) Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). *European Journal of Plant Pathology* 129: 281-301.
- Lessard, P.A., Kulaveerasingam, H., York, G.M., Strong, A. and Sinskey, A.J. (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engineering* 4: 67-79.
- Li, X., Wu, J., Yin, L., Zhang, Y., Qu, J. and Lu, J. (2015) Comparative transcriptome analysis reveals defense-related genes and pathways against downy mildew in *Vitis amurensis* grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry* 95: 1-14.
- Lim, C.W. and Lee, S.C. (2014) Functional roles of the pepper MLO protein gene, *CaMLO2*, in abscisic acid signaling and drought sensitivity. *Plant Molecular Biology* 85: 1-10.
- Ling, D. and Salvaterra, P.M. (2011) Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. *PLoS One* 6: e17762.

- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S. and Schulze-Lefert, P. (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310: 1180-1183.
- Liu, Q. and Zhu, H. (2008) Molecular evolution of the *MLO* gene family in *Oryza sativa* and their functional divergence. *Gene* 409: 1-10.
- Liu, R., Wang, L., Zhu, J., Chen, T., Wang, Y. and Xu, Y. (2015) Histological responses to downy mildew in resistant and susceptible grapevines. *Protoplasma* 252: 259-270.
- Lyngkjær, M.F., Newton, A.C., Atzema, J.L. and Baker, S.J. (2000) The Barley *mlo*-gene: an important powdery mildew resistance source. *Agronomie* 20: 745-756.
- Malacarne, G., Vrhovsek, U., Zulini, L., Cestaro, A., Stefanini, M., Mattivi, F., Delledonne, M., Velasco, R. and Moser, C. (2011) Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biology* 11: 114.
- Marguerit, E., Boury, C., Manicki, A., Donnart, M., Butterlin, G., Nemorin, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Ollat, N. and Decroocq, S. (2009) Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1261-1278.
- Marino, R., Sevini, F., Madini, A., Vecchione, A., Pertot, M., Serra, A.D., Versini, G., Velasco, R. and Grandò, M.S. (2003) QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. In *Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2*: 527-533.
- Márquez, S.S., Bills, G.F. and Zabalgoagezcoa, I. (2007) The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 27: 171-195.
- Martinelli, L., Gribaudo, I., Bertoldi, D., Candioli, E. and Poletti, V. (2001) High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cultivars Chardonnay and Brachetto a grappolo lungo. *Vitis* 40: 111-115.
- Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Coste, P., Dumas, V., Haetty, S., Butterlin, G. and Greif, C. (2003) Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. In *Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2*: 451-456.
- Merz, P.R., Moser, T., Höll, J., Kortekamp, A., Buchholz, G., Zyprian, E. and Bogs, J. (2015) The transcription factor VvWRKY33 is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defense against the oomycete pathogen *Plasmopara viticola*. *Physiologia Plantarum* 153: 365-380.
- Mestre, P., Piron, M.C. and Merdinoglu, D. (2012) Identification of effector genes from the phytopathogenic oomycete *Plasmopara viticola* through the analysis of gene expression in germinated zoospores. *Fungal Biology* 116: 825-835.
- Mezzetti, B. and Gentile, A. (2005) Trasformazione genetica delle piante da frutto: risultati, applicazioni e sperimentazione. *Review n. 2 – Italus Hortus* 12: 79-92.
- Miklis, M., Consonni, C., Bhat, R.A., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. (2007) Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. *Plant Physiology* 144: 1132-1143.
- Milli, A., Cecconi, D., Bortesi, L., Persi, A., Rinalducci, S., Zamboni, A., Zoccatelli, G., Lovato, A., Zolla, L. and Polverari, A. (2012) Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. *Journal of Proteomics* 75: 1284-1302.
- Monteiro, S., Barakat, M., Piçarra-Pereira, M.A., Teixeira, A.R. and Ferreira, R.B. (2003) Osmotin and thaumatin from grape: A putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 93: 1505-1512.
- Mueller, M.J. (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100: 653-663.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Mysore, K.S. and Ryu, C.M. (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* 9: 97-104.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene *in trans*. *The Plant Cell* 2: 279-289.
- Nelson, T., Tausta, S.L., Gandotra, N. and Liu, T. (2006) Laser microdissection of plant tissue: what you see is what you get. *Annual Review of Plant Biology* 57: 181-201.
- Nesler, A., Perazzolli, M., Puopolo, G., Giovannini, O., Elad, Y. and Pertot, I. (2015) A complex protein derivative acts as biogenic elicitor of grapevine resistance against powdery mildew under field conditions. *Frontiers in Plant Science* 6: 715.
- Nie, J., Wang, Y., He, H., Guo, C., Zhu, W., Pan, J., Li, D., Lian, H., Pan, J. and Cai, R. (2015) Loss-of-function mutations in *CsMLO1* confer durable powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in Plant Science* 6: 1155.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.

- Nurnberger, T. and Lipka, V. (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6: 335-345.
- Panstruga, R. (2005a) Discovery of novel conserved peptide domains by ortholog comparison within plant multi-protein families. *Plant Molecular Biology* 59: 485-500.
- Panstruga, R. (2005b) Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochemical Society Transactions* 33: 389-392.
- Papadopolou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 12923-12928.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J. and Flors, V. (2013) Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany* 94: 46-56.
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. and Bai, Y. (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* 25: 1-12.
- Pavan, S., Schiavulli, A., Appiano, M., Marcotrigiano, A.R., Cillo, F., Visser, R.G.F., Bai, Y., Lotti, C. and Ricciardi, L. (2011) Pea powdery mildew *er1* resistance is associated to loss-of-function mutations at a *MLO* homologous locus. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 1425-1431.
- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. and Pertot, I. (2008) Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control* 47: 228-234.
- Perazzolli, M., Moretto, M., Fontana, P., Ferrarini, A., Velasco, R., Moser, C., Delledonne, M. and Pertot, I. (2012) Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics* 13: 660.
- Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E. and Pertot, I. (2011) *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biological Control* 58: 74-82.
- Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D. and Mestre, P. (2010) Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology* 10: 147.
- Pertot, I., Gobbin, D., Dagostin, S., Ferrari, A. and Gessler, C. (2005) La peronospora della vite. Istituto Agrario di San Michele. www.environmentchange.eu/download/free_publications/peronospora_2nd_ed_interno.pdf
- Pessina, S., Pavan, S., Catalano, D., Gallotta, A., Visser, R.G., Bai, Y., Malnoy, M. and Schouten, H.J. (2014) Characterization of the *MLO* gene family in Rosaceae and gene expression analysis in *Malus domestica*. *BMC Genomics* 15: 1-12.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S.C. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Pieterse, C.M., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C. and Bakker, P.A. (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347-375.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N.C., Panstruga, R. and Schulze-Lefert, P. (2002) The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology* 129: 1076-1085.
- Pike, S., Gao, F., Kim, M.J., Kim, S.H., Schachtman, D.P. and Gassmann, W. (2014) Members of the NPF3 transporter subfamily encode pathogen-inducible nitrate/nitrite transporters in grapevine and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 55: 162-170.
- Polesani, M., Bortesi, L., Ferrarini, A., Zamboni, A., Fasoli, M., Zadra, C., Lovato, A., Pezzotti, M., Delledonne, M. and Polverari, A. (2010) General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics* 11: 117.
- Polesani, M., Desario, F., Ferrarini, A., Zamboni, A., Pezzotti, M., Kortekamp, A. and Polverari, A. (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9: 142.
- Puopolo, G., Giovannini, O. and Pertot, I. (2014) *Lysobacter capsici* AZ78 can be combined with copper to effectively control *Plasmopara viticola* on grapevine. *Microbiological Research* 169: 633-642.
- Qiu, W., Feechan, A. and Dry, I. (2015) Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture Research* 2: 15020.
- Ramming, D.W., Gabler, F., Smilanick, J., Cadle-Davidson, M., Barba, P., Mahanil, S. and Cadle-Davidson, L. (2011) A single dominant locus, *Ren4*, confers rapid non-race-specific resistance to grapevine powdery mildew. *Phytopathology* 101: 502-508.

- Raps, A., Kehr, J., Gugerli, P., Moar, W.J., Bigler, F. and Hilbeck, A. (2001) Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Molecular Ecology* 10: 525-533.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. and Lund, S.T. (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6: 27.
- Romano, N., Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6: 3343-3353.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrere, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C. and Gamas, P. (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal* 77: 817-837.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B. and Moorman, A.F. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37: e45.
- Santi, S., Grisan, S., Pierasco, A., De Marco, F. and Musetti, R. (2013) Laser microdissection of grapevine leaf phloem infected by stolbur reveals site-specific gene responses associated to sucrose transport and metabolism. *Plant, Cell and Environment* 36: 343-355.
- Sato, F. (2005) RNAi and functional genomics. *Plant Biotechnology* 22: 431-442
- Schnable, P.S., Hochholdinger, F. and Nakazono, M. (2004) Global expression profiling applied to plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 50-56.
- Schnee, S., Viret, O. and Gindro, K. (2008) Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 128-133.
- Senthil-Kumar, M. and Mysore, K.S. (2011) New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in Plant Science* 16: 656-665.
- Slaughter, A.R., Hamiduzzaman, M.M., Gindro, K., Neuhaus, J.M. and Mauch-Mani, B. (2008) β -aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology* 122: 185-195.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. and Waterhouse, P.M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.
- Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M. and Daire, X. (2012) Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 89-96.
- Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V. and Somerville, S. (2006) *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *The Plant Cell* 18: 731-746.
- Strube, C., Buschbaum, S., Wolken, S. and Schnieder, T. (2008) Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate protein disulfide isomerase transcription pattern in the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Gene* 425: 36-43.
- Swart, S., Logman, T.J.J., Smit, G., Lugtenberg, B.J.J. and Kijne, J.W. (1994) Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of rhizobiaceae. *Plant Molecular Biology* 24: 171-183.
- Tang, W., Coughlan, S., Crane, E., Beatty, M. and Duvick, J. (2006) The application of laser microdissection to in planta gene expression profiling of the maize anthracnose stalk rot fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1240-1250.
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P. and Singh, K.B. (2005) Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32: 1-19.
- Thomma, B., Penninckx, I., Broekaert, W.F. and Cammue, B.P.A. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13: 63-68.
- Thordal-Christensen, H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 351-357.
- Thuerig, B., Binder, A., Boller, T., Guyer, U., Jimenez, S., Rentsch, C. and Tamm, L. (2006) An aqueous extract of the dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces resistance in several crops under controlled and field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 114: 185-197.
- Trouvelot, S., Varnier, A.L., Allegre, M., Mercier, L., Baillieux, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.M., Pugin, A. and Daire, X. (2008) A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 232-243.

- Tsuba, M., Katagiri, C., Takeuchi, Y., Takada, Y. and Yamaoka, N. (2002) Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 51-57.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes and Development* 13: 3191-3197.
- Underwood, W. and Somerville, S.C. (2008) Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *Journal of Experimental Botany* 59: 3501-3508.
- Unger, S., Büche, C., Boso, S. and Kassemeyer, H.H. (2007) The course of colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen interactions. *Phytopathology* 97: 780-786.
- Unver, T. and Budak, H. (2009) Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *International Journal of Plant Genomics* 2009: 198680 doi:10.1155/2009/198680.
- Urso, S., Zottini, M., Ruberti, C., Lo Schiavo, F., Stanca, A.M., Cattivelli, L. and Valè, G. (2013) An *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene silencing system for functional analysis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114: 49-60.
- van Aubel, G., Buonatesta, R. and Van Cutsem, P. (2014) COS-OGA: A novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. *Crop Protection* 65: 129-137.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M. and Pieterse, C.M.J. (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588.
- Van Hiel, M.B., Van Wielendaele, P., Temmerman, L., Van Soest, S., Vuerinckx, K., Huybrechts, R., Broeck, J.V. and Simonet, G. (2009) Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Molecular Biology* 10: 56.
- van Hulst, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M. and Ton, J. (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 5602-5607.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W. and Foyer, C.H. (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* 123: 1289-1300.
- Vance, V. and Vaucheret, H. (2001) RNA silencing in plants - Defense and counterdefense. *Science* 292: 2277-2280.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 7
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzoli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Dematte, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, S.M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Fontana, P., Gutin, A., Van de Peer, Y., Salamini, F. and Viola, R. (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2: e1326.
- Vitha, S. and Osteryoung, K.W. (2011) Immunofluorescence microscopy for localization of *Arabidopsis* chloroplast proteins. *Methods in Molecular Biology* 774: 33-58.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F. and Park, S.W. (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11: 436-442.
- Voegele, R.T. and Mendgen, K. (2003) Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist* 159: 93-100.
- Walters, D.R., Ratsep, J. and Havis, N.D. (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64: 1263-1280.
- Wang, N., Zheng, Y., Xin, H., Fang, L. and Li, S. (2013) Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports* 32: 61-75.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. and Qiu, J.L. (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* 32: 947-951.
- Waterhouse, P.M. and Helliwell, C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics* 4: 29-38.

- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V. and Thordal-Christensen, H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 36: 101-112.
- Welter, L.J., Gokturk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Toepfer, R. and Zyprian, E.M. (2007) Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding* 20: 359-374.
- Wiermer, M., Feys, B.J. and Parker, J.E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 383-389.
- Winterhagen, P., Howard, S.F., Qiu, W. and Kovacs, L.G. (2008) Transcriptional up-regulation of grapevine *MLO* genes in response to powdery mildew infection. *American Journal of Enology and Viticulture* 59: 159-168.
- Wu, J., Zhang, Y., Zhang, H., Huang, H., Folta, K.M. and Lu, J. (2010) Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biology* 10: 234.
- Yu, Y., Zhang, Y., Yin, L. and Lu, J. (2012) The mode of host resistance to *Plasmopara viticola* infection of grapevines. *Phytopathology* 102: 1094-1101.
- Yun, B.W., Atkinson, H.A., Gaborit, C., Greenland, A., Read, N.D., Pallas, J.A. and Loake, G.J. (2003) Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *The Plant Journal* 34: 768-777.
- Zheng, Z., Nonomura, T., Appiano, M., Pavan, S., Matsuda, Y., Toyoda, H., Wolters, A.M.A., Visser, R.G.F. and Bai, Y. (2013) Loss of function in *Mlo* orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. *PLoS One* 8: e70723.
- Zhou, S.J., Jing, Z. and Shi, J.L. (2013) Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the *MLO* gene family in *Cucumis sativus*. *Genetics and Molecular Research* 12: 6565-6578.
- Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F. and Lo Schiavo, F. (2008) Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Reports* 27: 845-853.

RINGRAZIAMENTI