

**12 Marzo 2019, Gaiole in Chianti**

# **LA SFIDA DEL CLIMATE CHANGE IN VIGNETO: STRATEGIE PER GESTIRE STRESS ABIOTICI E IRRIGAZIONE**

**Le influenze del clima e delle pratiche  
agronomiche sulle vie di sintesi dei  
polifenoli in Sangiovese**

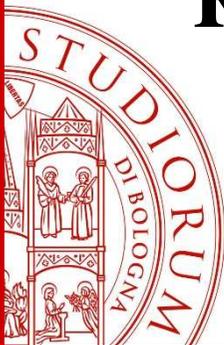
**Ilaria Filippetti e Chiara Pastore**

**Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari – Università di Bologna**

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI

# Ricerche del gruppo di viticoltura UniBO



- **Studio di nuovi sistemi di allevamento meccanizzabili.**
- **Miglioramento genetico tradizionale e selezione clonale.**
- **Identificazione varietale attraverso tecniche ampelografiche e di biologia molecolare per il recupero del germoplasma viticolo e la conservazione della biodiversità.**
- **Effetti del cambiamento climatico sulla maturazione e composizione delle uve.**
- **Tecniche di gestione della chioma per migliorare la composizione delle uve.**



# Composizione della bacca rossa

## Buccia

### Flavonoidi

#### Tannini

catechine, epicatechine...

#### Antociani

Derivati di cianidina e delphinidina in forma metilata, acetata, cumarata

#### Flavonoli

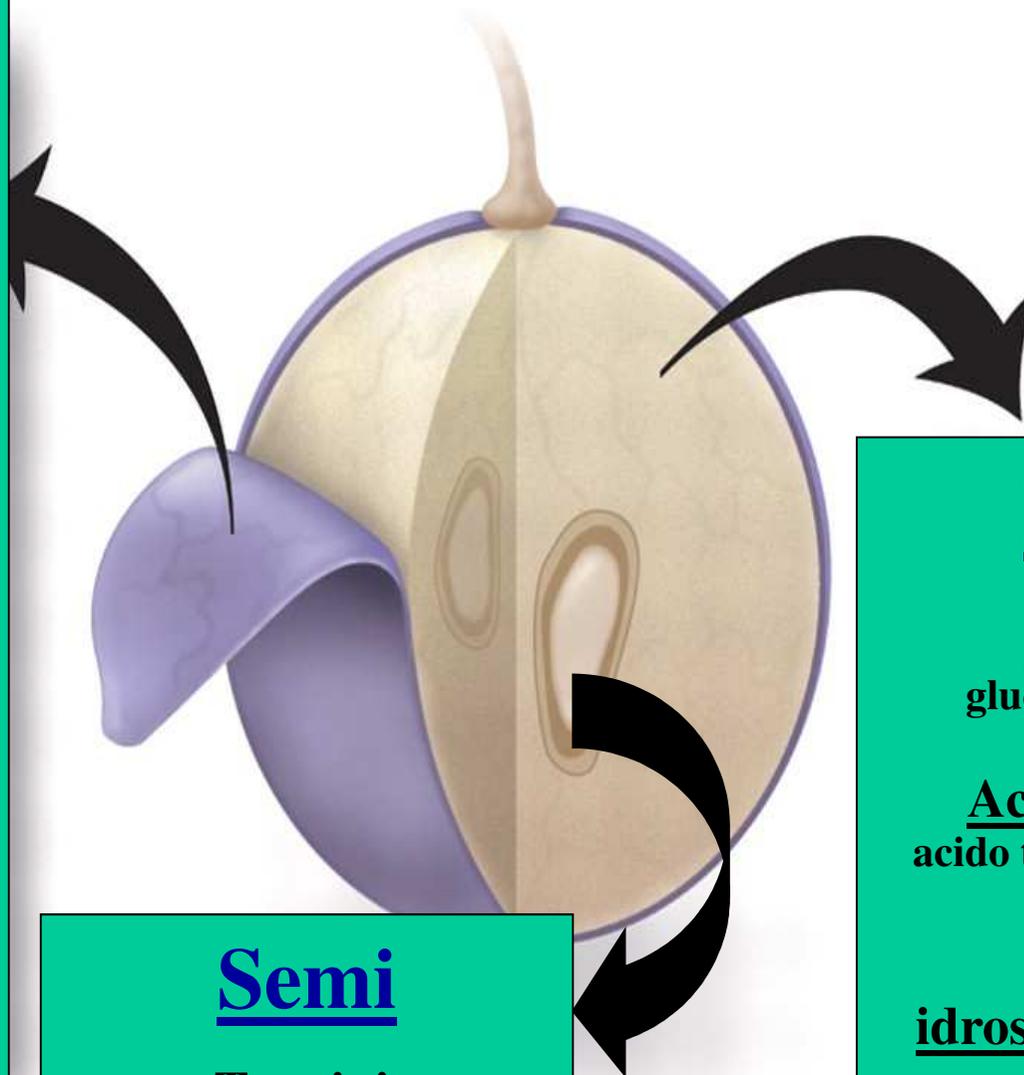
quercetina, miricetina, campferolo

### Composti aromatici

#### Terpeni

Norisoprenoidi, ecc.

Acidi idrossicinnamici...



## Polpa

### Zuccheri

glucosio, fruttosio

### Acidi organici

acido tartarico e malico

### Acidi

idrossicinnamici...

## Semi

### Tannini

catechine  
epicatechine

# Per comprendere gli effetti sulla maturazione e composizione dell'uva del **CAMBIAMENTO CLIMATICO** e di **TECNICHE AGRONOMICHE** utilizziamo un approccio integrato agronomico, biochimico e molecolare.

The grapevine VviPrx31 peroxidase as a candidate gene involved in anthocyanin degradation in ripening berries under high temperature

Nooshin Movahed<sup>1</sup> · Chiara Pastore<sup>1</sup> · Antonio Cellini<sup>1</sup> · Gianluca Allegro<sup>1</sup> · Gabriele Valentini<sup>1</sup> · Sara Zenoni<sup>2</sup> · Erika Cavallini<sup>2</sup> · Erica D'Inca<sup>2</sup> · Giovanni Battista Tornielli<sup>2</sup> · Ilaria Filippetti<sup>1</sup>

Pastore et al. *BMC Genomics* 2011, 12:631  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/631>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Increasing the source/sink ratio in *Vitis vinifera* (cv Sangiovese) induces extensive transcriptome reprogramming and modifies berry ripening

Chiara Pastore<sup>1†</sup>, Sara Zenoni<sup>2†</sup>, Giovanni Battista Tornielli<sup>2</sup>, Gianluca Allegro<sup>1</sup>, Silvia Dal Santo<sup>2</sup>, Gabriele Valentini<sup>1</sup>, Cesare Intrièri<sup>1</sup>, Mario Pezzotti<sup>2\*</sup> and Ilaria Filippetti<sup>1</sup>



ORIGINAL RESEARCH  
published: 06 June 2017  
doi: 10.3389/fpls.2017.00929



## Whole Plant Temperature Manipulation Affects Flavonoid Metabolism and the Transcriptome of Grapevine Berries

Chiara Pastore<sup>1†</sup>, Silvia Dal Santo<sup>2†</sup>, Sara Zenoni<sup>2</sup>, Nooshin Movahed<sup>1</sup>, Gianluca Allegro<sup>1</sup>, Gabriele Valentini<sup>1</sup>, Ilaria Filippetti<sup>1\*</sup> and Giovanni Battista Tornielli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy, <sup>2</sup> Department of Biotechnology, University of Verona, Verona, Italy

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Low night temperature at veraison enhances the accumulation of anthocyanins in Corvina grapes (*Vitis Vinifera* L.)

Federica Gaiotti<sup>1</sup>, Chiara Pastore<sup>2\*</sup>, Ilaria Filippetti<sup>2</sup>, Lorenzo Lovat<sup>1</sup>, Nicola Belfiore<sup>1</sup> & Diego Tomasi<sup>1</sup>

Received: 16 February 2018  
Accepted: 15 May 2018  
Published online: 07 June 2018

BMC Plant Biology

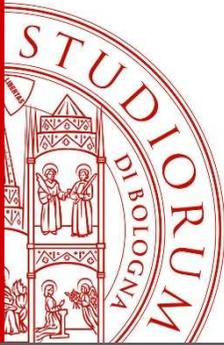


This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

### Selective defoliation affects plant growth, fruit transcriptional ripening program and flavonoid metabolism in grapevine

*BMC Plant Biology* 2013, 13:30 doi:10.1186/1471-2229-13-30

Chiara Pastore ([chiara.pastore3@unibo.it](mailto:chiara.pastore3@unibo.it))  
Sara Zenoni ([sara.zenoni@univr.it](mailto:sara.zenoni@univr.it))  
Marianna Fasoli ([marianna.fasoli@univr.it](mailto:marianna.fasoli@univr.it))  
Mario Pezzotti ([mario.pezzotti@univr.it](mailto:mario.pezzotti@univr.it))  
Giovanni Battista Tornielli ([giovannibattista.tornielli@univr.it](mailto:giovannibattista.tornielli@univr.it))  
Ilaria Filippetti ([ilaria.filippetti@unibo.it](mailto:ilaria.filippetti@unibo.it))



# **Approccio MULTIDISCIPLINARE utilizzato nelle nostre ricerche**

## **AGRONOMICO**

**Analisi dati vegeto-produttivi durante la maturazione e alla vendemmia, misura dell'area fogliare e della fotosintesi...**

## **BIOCHIMICO**

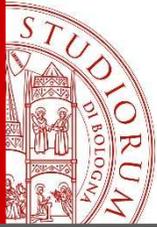
**Monitoraggio della maturazione della bacca, accumulo di solidi solubili, analisi del pH e acidità titolabile.**

**Analisi quanti- e qualitativa di antociani e flavonoli via HPLC.**

**Attività di enzimi coinvolti nella sintesi e/o degradazione degli antociani.**

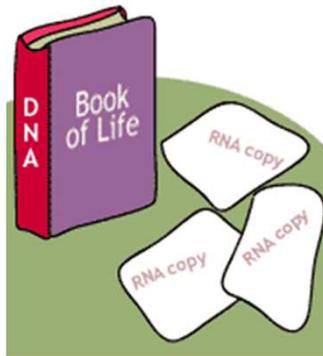
## **MOLECOLARE**

**Analisi di espressione genica su larga scala o di geni specifici**



# APPROCCIO MOLECOLARE

## Sequenziamento del genoma di vite



**Table 1 | Global statistics on the genome of *Vitis vinifera***

(a) Assembly						
	Status	Number	N <sub>50</sub> (kb)	Longest (kb)	Size (Mb)	Percentage of the assembly
Contigs	All	19,577	65.9	557	467.5	-
Supercontigs	All	3,514	2,065	12,675	487.1	100
	Anchored on chromosomes	191	3,189	12,675	335.6	68.9
	Anchored on chromosomes and oriented	143	3,827	12,675	296.9	60.9
(b) Annotation						
	Number	Median size (bp)	Total length (Mb)	Percentage of the genome	%GC	
Gene	30,434	3,399	225.6	46.3	36.2	
Exons CDS	149,351	130	33.6	6.9	44.5	
Introns CDS	118,917	213	178.6	36.7	34.7	
Intergenic	30,453	3,544	261.5	34.7	33.0	
tRNA*	600	73	0.04	NS	43.0	
miRNA†	164	103.5	0.002	NS	35.9	
(c) Orthology						
	Number of orthologous proteins	Mean identity (%)				
<i>P. trichocarpa</i>	12,996	72.7				
<i>A. thaliana</i>	11,404	65.5				
<i>O. sativa</i>	9,731	59.8				
Common to eudicotyledons‡	10,547					
Common to Magnoliophyta§	8,121					

**Il genoma di Pinot Nero comprende circa 30000 geni.**

\* Transfer RNA (tRNA) values were computed on exons.  
 † Micro RNAs (miRNAs) are members of known conserved miRNA families.  
 ‡ Eudicotyledons are represented by *P. trichocarpa* and *A. thaliana*.  
 § Magnoliophyta (most flowering plants) are represented by *P. trichocarpa*, *A. thaliana* and *O. sativa*.

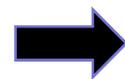
**Jaillon et al., 2007**

La conoscenza della sequenza nucleotidica di un gene di nostro interesse permette di ➡  
 estrarre l'RNA e ➡ verificare il suo grado di espressione in un determinato organo o  
 tessuto, in una specifica fase di maturazione.

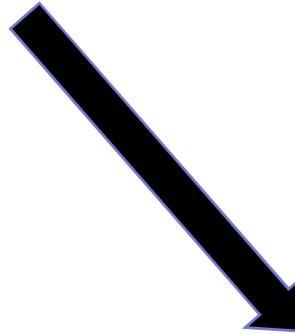
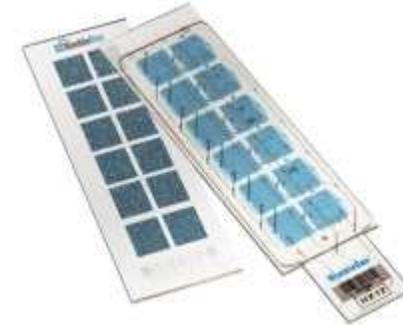
**DNA → RNA → espressione del gene**

**Studi di espressione genica su larga scala**  
**(“Whole genome” approach)**

permettono di analizzare **l’espressione dell’intero trascrittoma** di un tessuto o organo in una specifica condizione sperimentale



**Microarray Analyses**



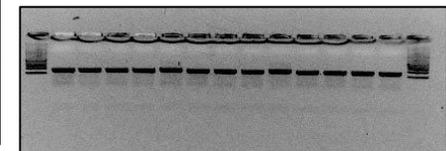
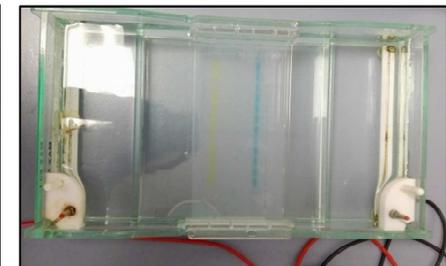
**RNA Seq**

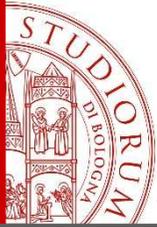
**Studi di espressione di geni specifici**  
**(“One-gene approach”)**

permettono di analizzare l’espressione di **geni candidati specifici** in un tessuto o organo in una specifica condizione



**Real Time PCR**



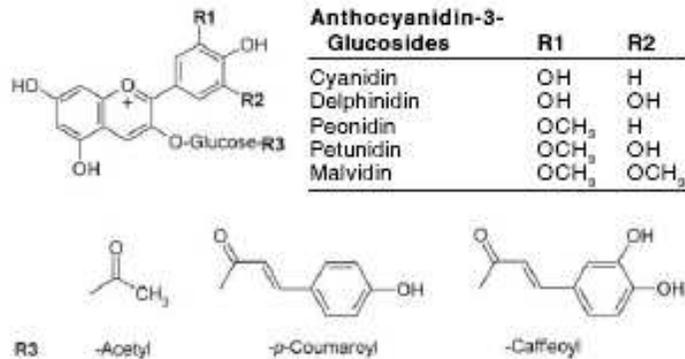


# Biosintesi dei flavonoidi

## Antociani

## Flavonoli

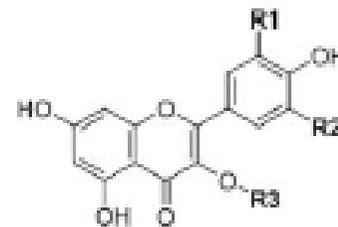
Gli antociani sono i pigmenti presenti nella buccia delle varietà a bacca rossa, responsabili del colore del vino.



Gli antociani derivano dalle antocianidine in seguito alla condensazione di uno o più gruppi glicosidici e alla esterificazione con acidi (acetico o cumarico). In posizione R1 e/o R2 dell'anello benzoico possono essere presenti gruppi ossidrilici o metilici.

**I flavonoidi sono metaboliti secondari che intervengono nella risposta della pianta a stress di tipo biotico e abiotico. Sono sintetizzati nella via di sintesi dei fenilpropanoidi da un precursore comune: la fenilalanina.**

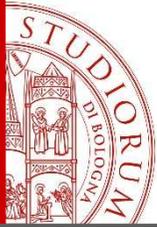
Sebbene incolori, i flavonoli contribuiscono alla stabilità del vino fungendo da copigmenti per gli antociani.



Flavonols	R1	R2	R3
Kaempferol	H	H	H
Quercetin	OH	H	H
Myricetin	OH	OH	H
Isorhamnetin	OCH <sub>3</sub>	H	H

I flavonoli si trovano nella vite in forma di glucosidi, galattosidi e glucuronidi a seconda che in posizione R3 si trovino glucosio, galattosio o acido glucuronico, rispettivamente.





# Le influenze del clima e delle pratiche agronomiche sulle vie di sintesi dei polifenoli in Sangiovese

## *Influenze del clima*

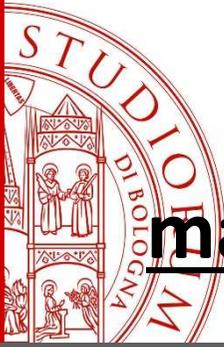
- Temperature dell'aria
- Stress idrico



## *Influenze delle tecniche agronomiche*

- Defogliazione intorno ai grappoli
- Utilizzo di elicitori





# Effetti dell'innalzamento termico diurno dall'invasatura alla vendemmia sulla maturazione e il colore delle uve in Sangiovese

10 piante adulte in vaso uniformate per il numero di germogli e dei grappoli



2 trattamenti:

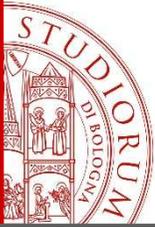
AT (alta temperatura, 6 piante)

BT (bassa temperatura, 6 piante)

2010

2012

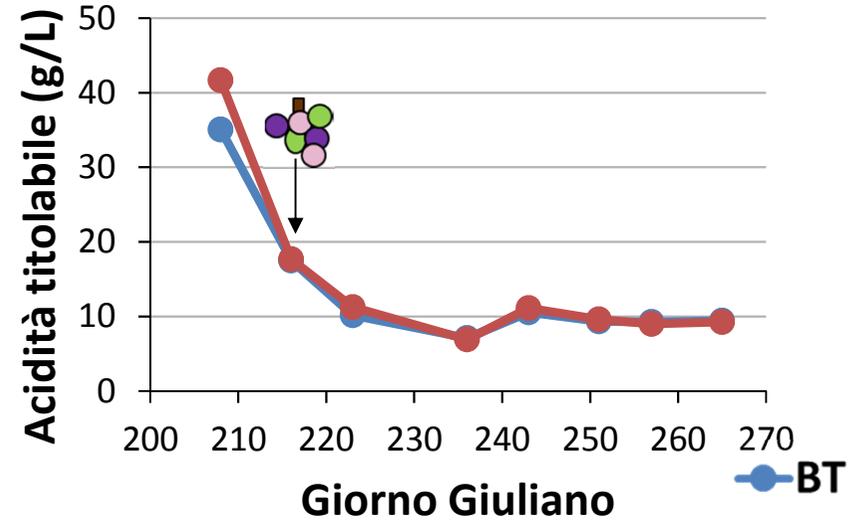
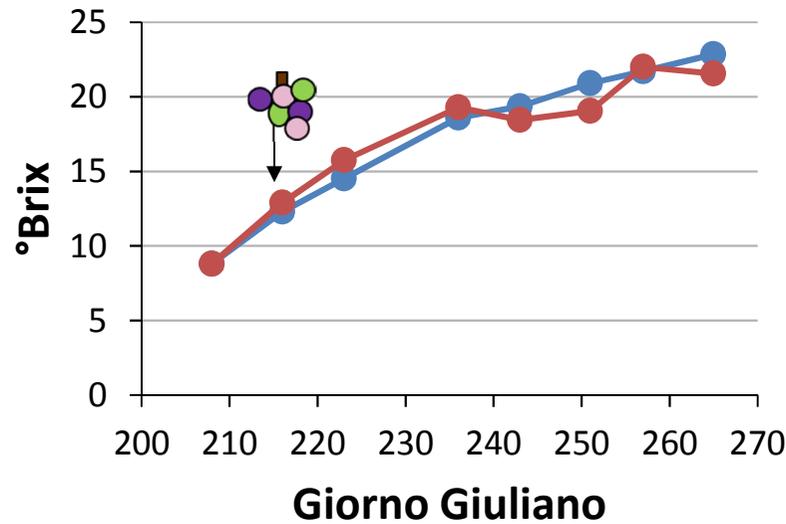
	T media aria (°C)	T max aria (°C)	T min aria (°C)
AT	22,2	36,0	8,2
BT	20,3	29,1	7,3
AT	26,4	41,7	11,8
BT	21,3	35,0	10,1



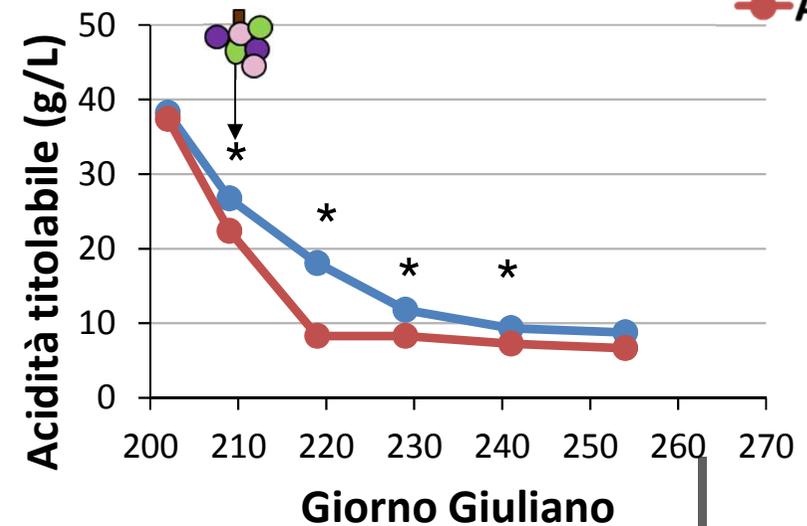
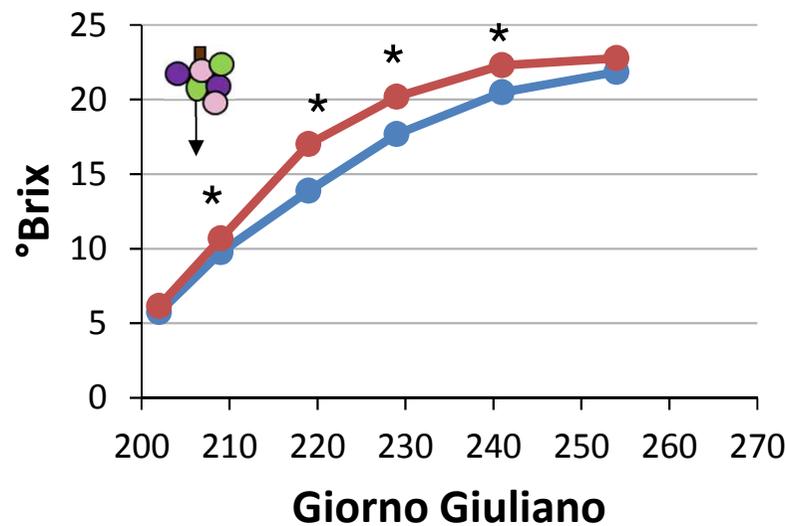
# ANALISI BIOCHIMICHE

## Monitoraggio della maturazione

2010



2012

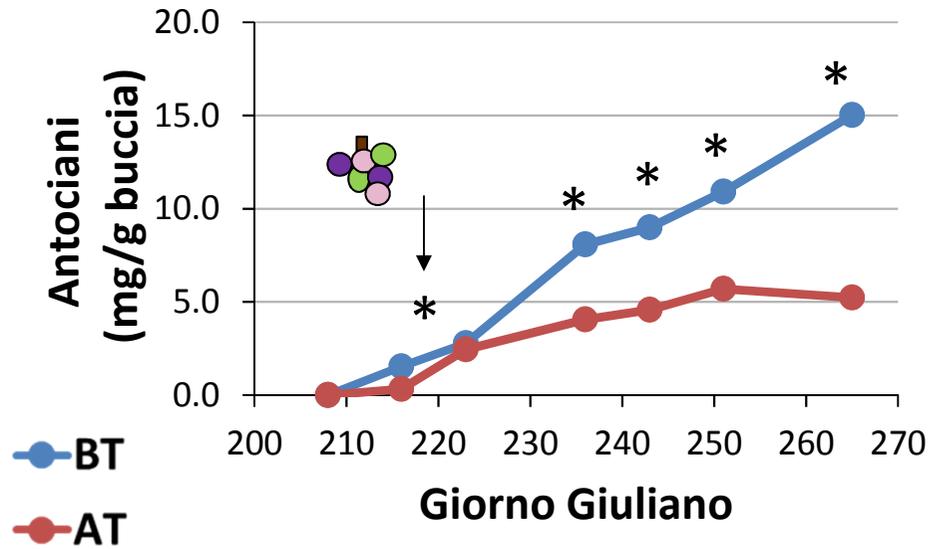




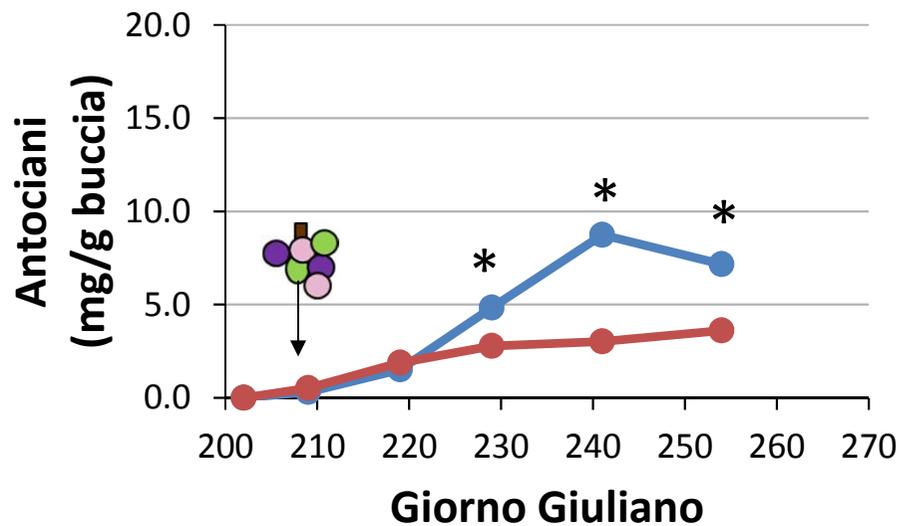
# ANALISI BIOCHIMICHE

## Accumulo e composizione antocianica via HPLC

2010



2012





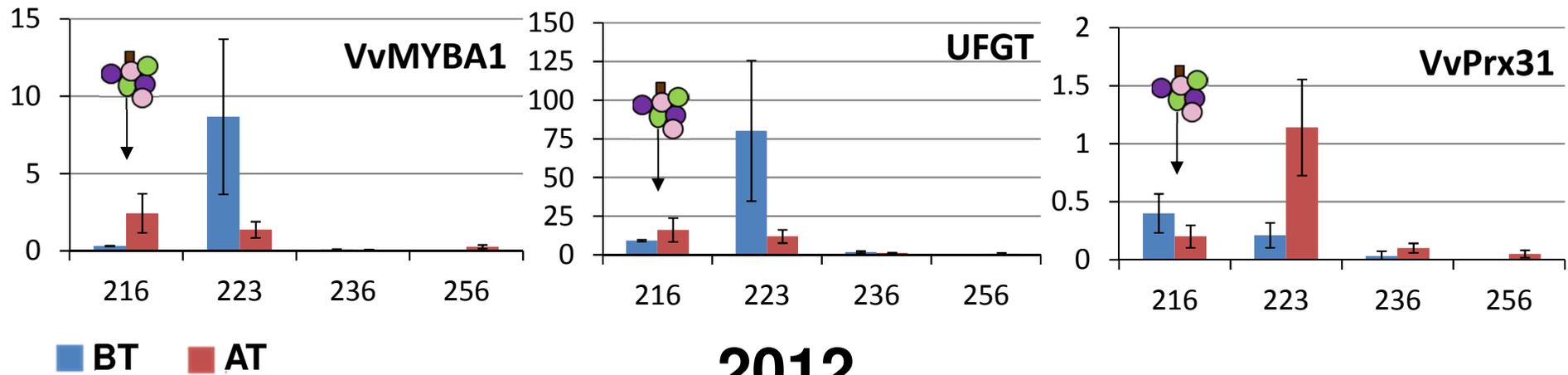


# ANALISI ESPRESSIONE GENICA

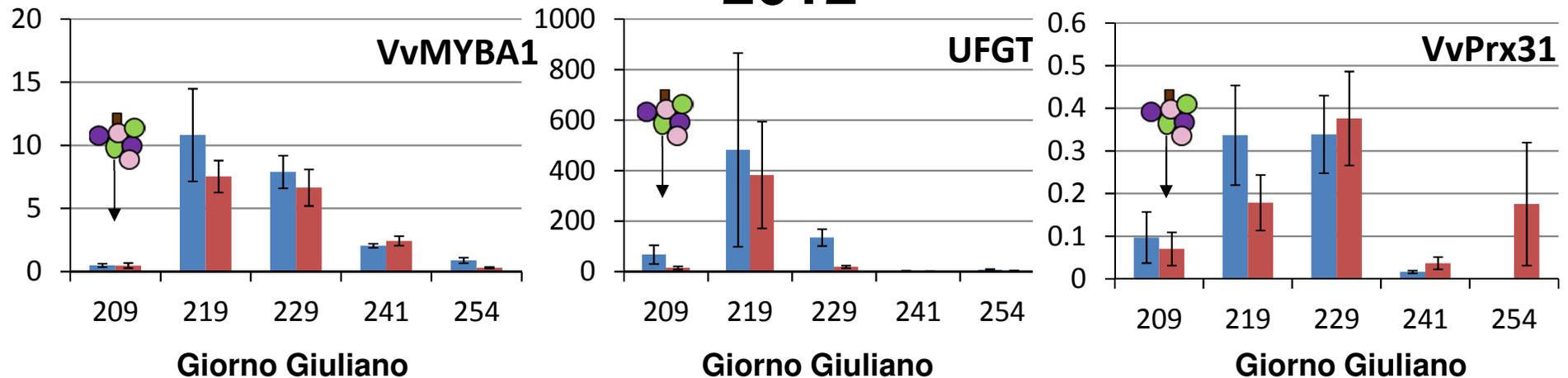
## Espressione nella buccia di VvMYBA, UFGT e VvPrx31 ( perossidasi)

(Mean Normalized Expression, rispetto al gene costitutivo actina)

### 2010



### 2012

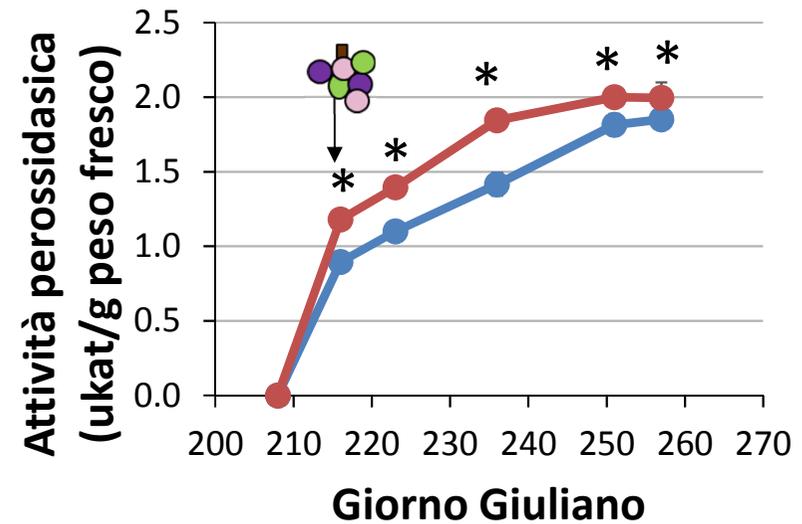
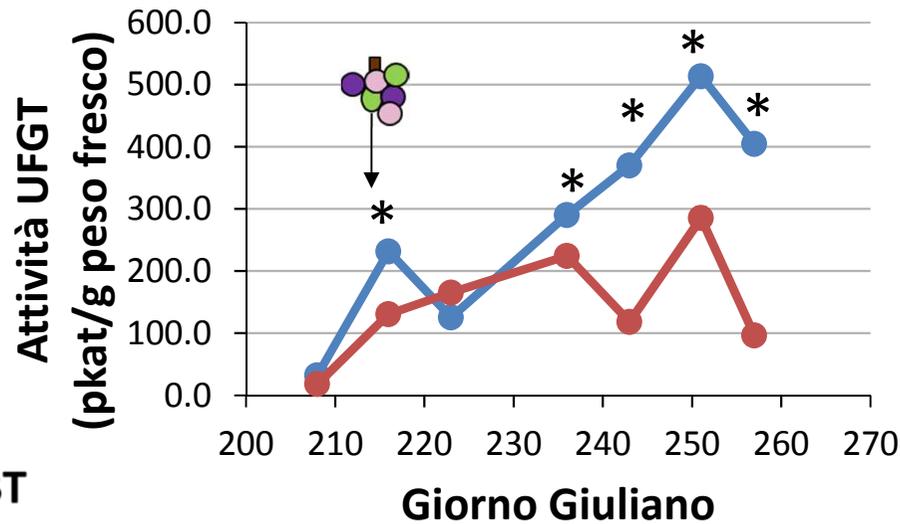




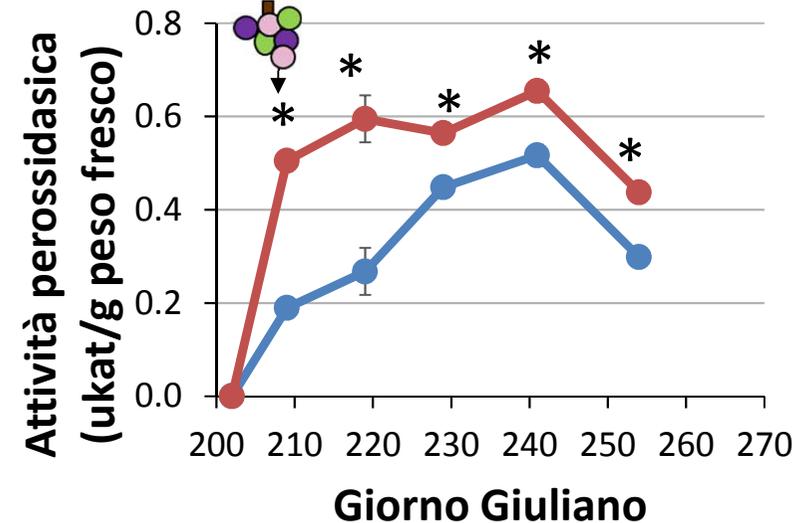
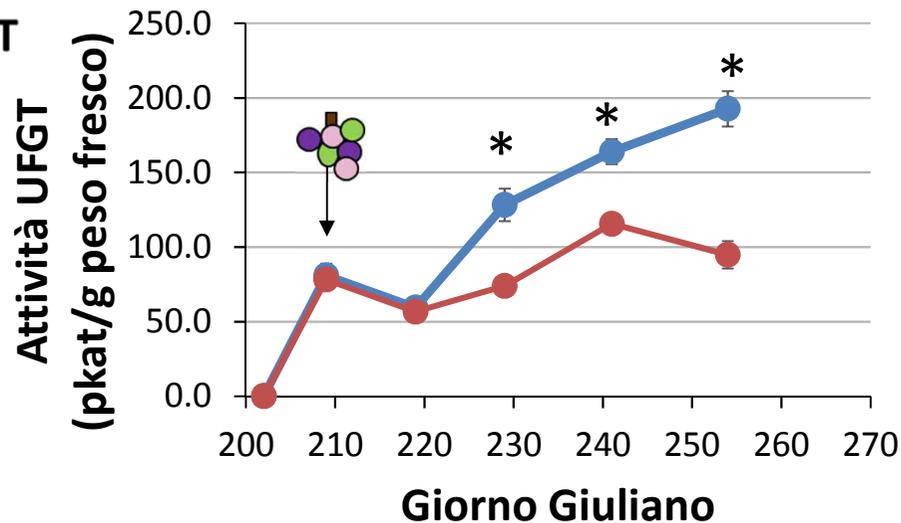
# ATTIVITA' ENZIMATICA

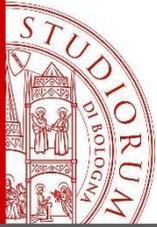
Attività enzimatica di UFGT (substrato: delfinidina) e delle perossidasi nella buccia

2010



2012



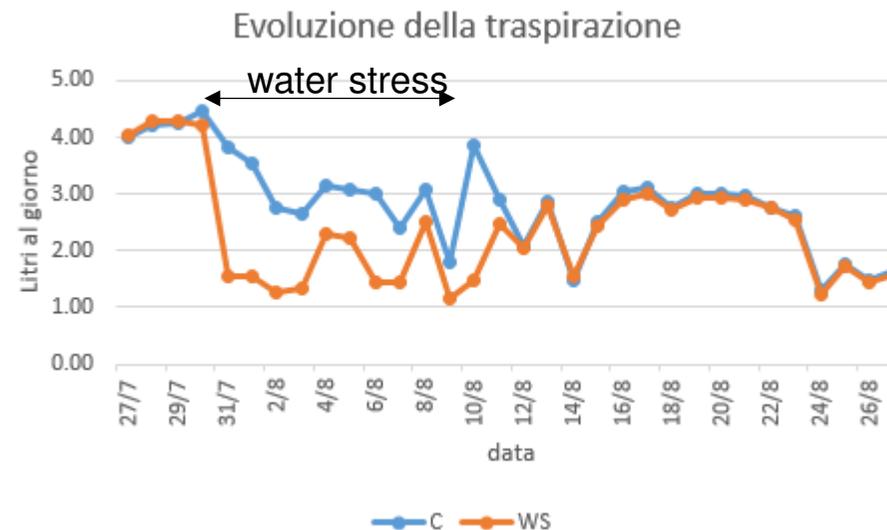


# Effetti di stress idrico in fase di invaiatura sulla maturazione e il colore delle uve in Sangiovese



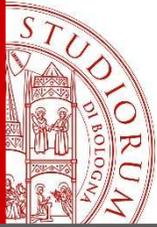
**C** (controllo)  $\longrightarrow$  **WS** (stress idrico)

**Stress idrico all'invaiatura**  
riduzione del 50% dell'apporto idrico  
(2L/g vs 4L/g) e successivo re-watering



Potenziale idrico del fusto C -0,7 Mpa

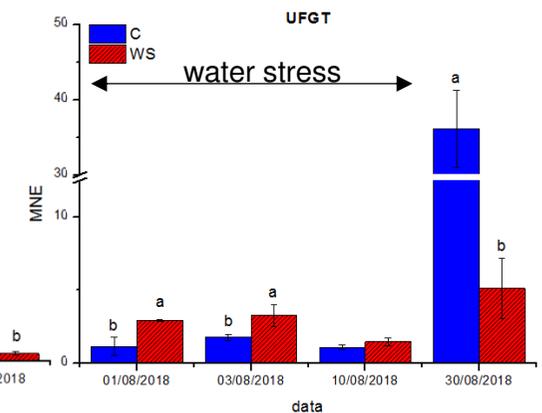
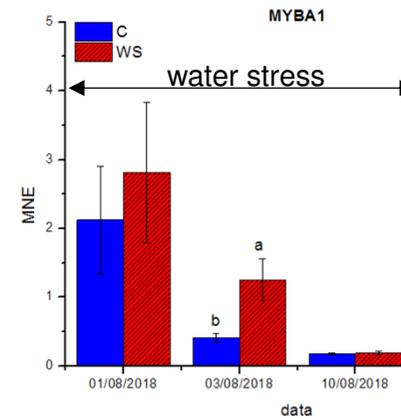
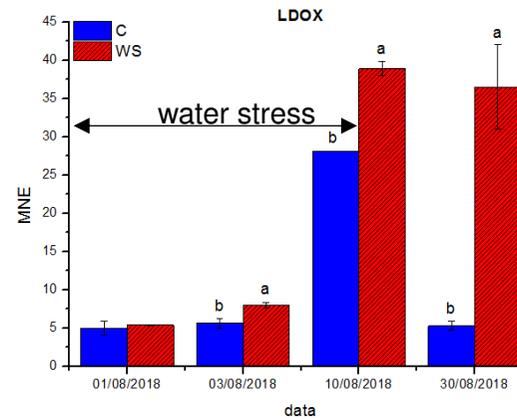
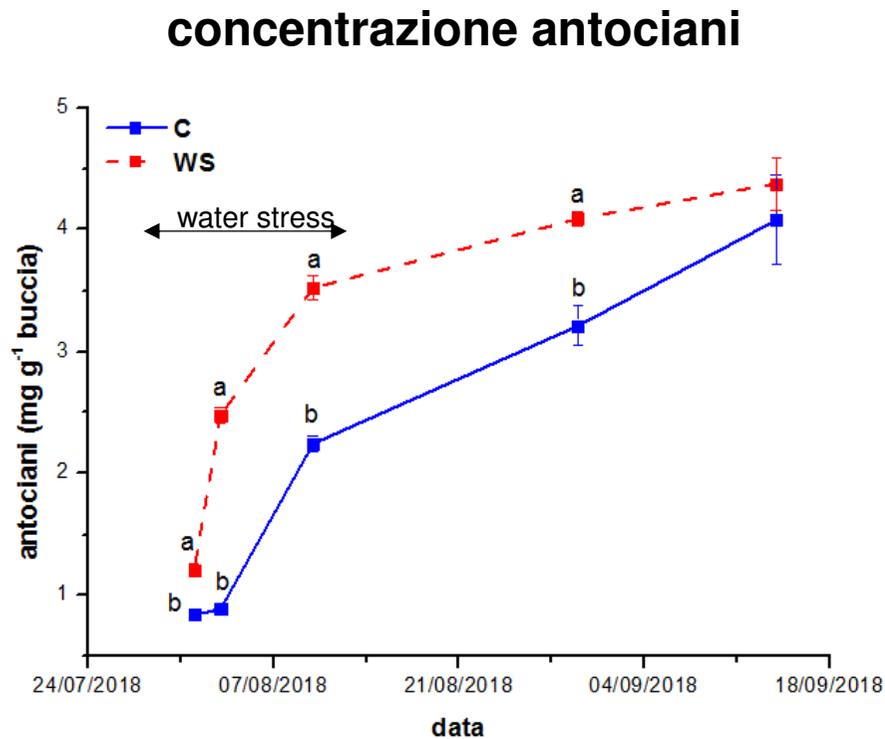
WS -1,6 Mpa

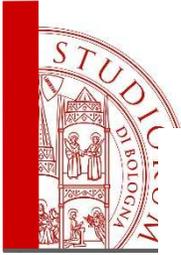


# Effetti di stress idrico in fase di invaiatura sulla maturazione e il colore delle uve in Sangiovese

## Risultati preliminari 2018

## Espressione dei principali geni coinvolti nella sintesi





# *Influenze delle tecniche agronomiche*

**Effetti della defogliazione basale del germoglio applicata in due fasi diverse sulla maturazione nella cv. Sangiovese**



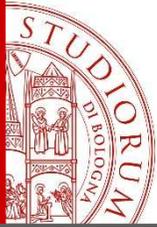
**Controllo (C)**



**Defogliazione pre-fioritura (DPF) -> rimozione delle 6 foglie basali di ogni germoglio in pre-fioritura**



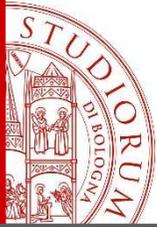
**Defogliazione all'invaiaatura (DI) → rimozione delle 6 foglie basali di ogni germoglio all'invaiaatura**



# Effetti della defogliazione in pre-fioritura (DPF) o all'invasitura (DI) sui componenti della produzione



	<b>C</b>	<b>DPF</b>	<b>DI</b>
Numero di grappoli/pianta	16	16	16
<b>Produzione/pianta (kg)</b>	<b>6,3 a</b>	<b>4,4 b</b>	<b>5,5 a</b>
<b>Peso del grappolo (g)</b>	<b>394 a</b>	<b>280 b</b>	<b>343 a</b>
Peso dell'acino (g)	2,37	2,26	2,33
<b>Numero di acini/grappolo</b>	<b>166 a</b>	<b>124 b</b>	<b>147 a</b>
<b>Danni da scottature</b> (% grappoli colpiti/pianta)	<b>0,36 b</b>	<b>1,24 b</b>	<b>6,45 a</b>
<b>Sup fogliare/prod (m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,6 b</b>	<b>0,8 a</b>	<b>0,5 b</b>
<b>Spessore della buccia (µm)</b>	<b>232,3 b</b>	<b>255,6 a</b>	<b>223,8 b</b>



# Effetti della defogliazione pre-fioritura (DPF) o all'invasitura (DI) su maturità tecnologica e concentrazione di antociani e flavonoli alla vendemmia



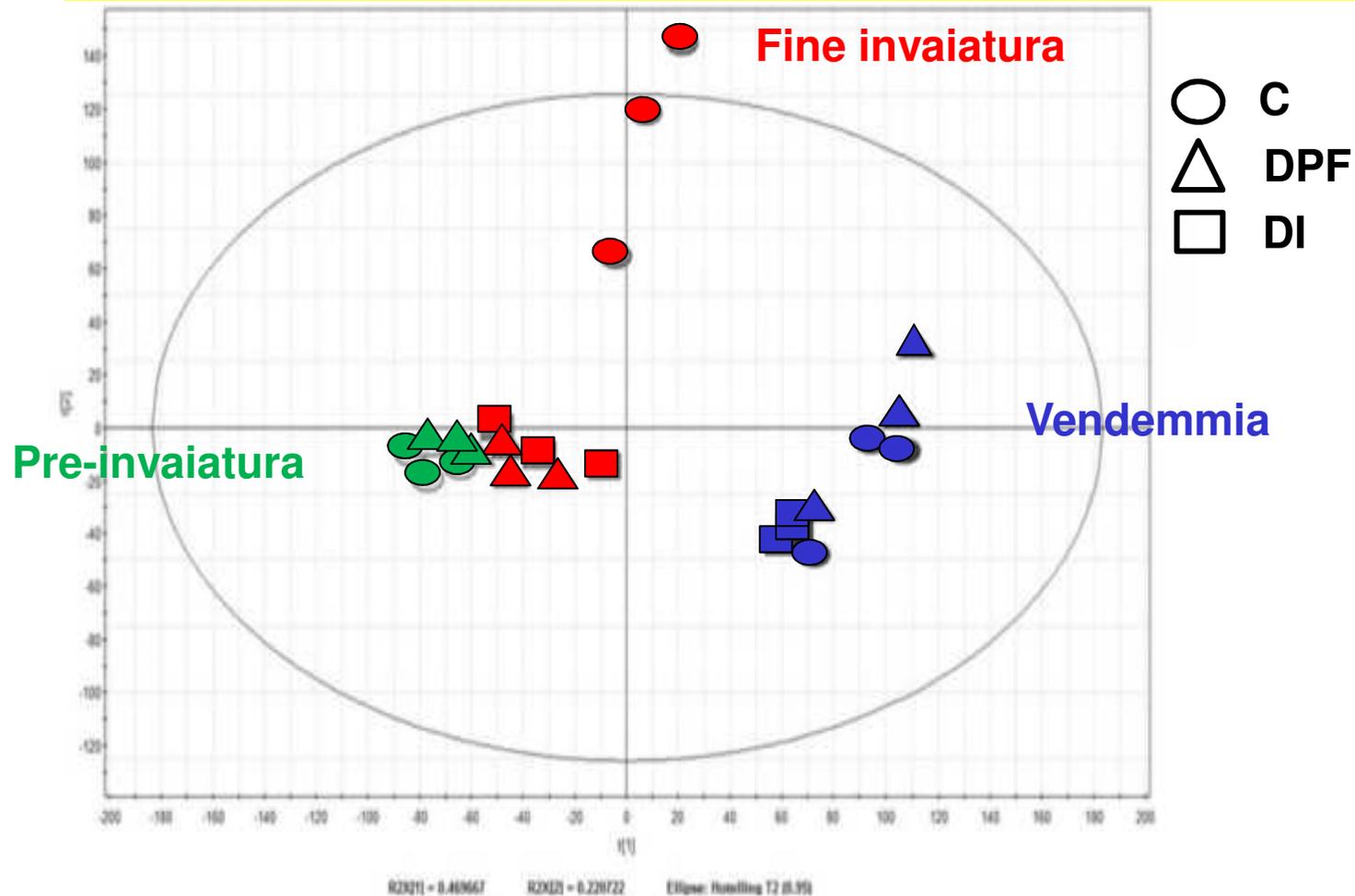
	<b>C</b>	<b>DPF</b>	<b>DI</b>
<b>°Brix</b>	20,8 b	22,2 a	20,7 b
<b>Acidità titolabile (g L<sup>-1</sup>)</b>	7,6 a	6,8 b	6,7 b
<b>pH</b>	3,38 b	3,45 a	3,45 a
<b>Flavonoli totali (mg g<sup>-1</sup> buccia)</b>	0,32 b	0,71 a	0,67 a
<b>Antociani totali (mg g<sup>-1</sup> buccia)</b>	4,87 ab	5,35 a	4,33 b



## Studi di espressione genica su larga scala (“Whole genome approach”)

Analisi del trascrittoma nelle bucce delle bacche di in C, DPF e DI in tre stadi di maturazione.

Analisi delle componenti principali su tutto il trascrittoma.

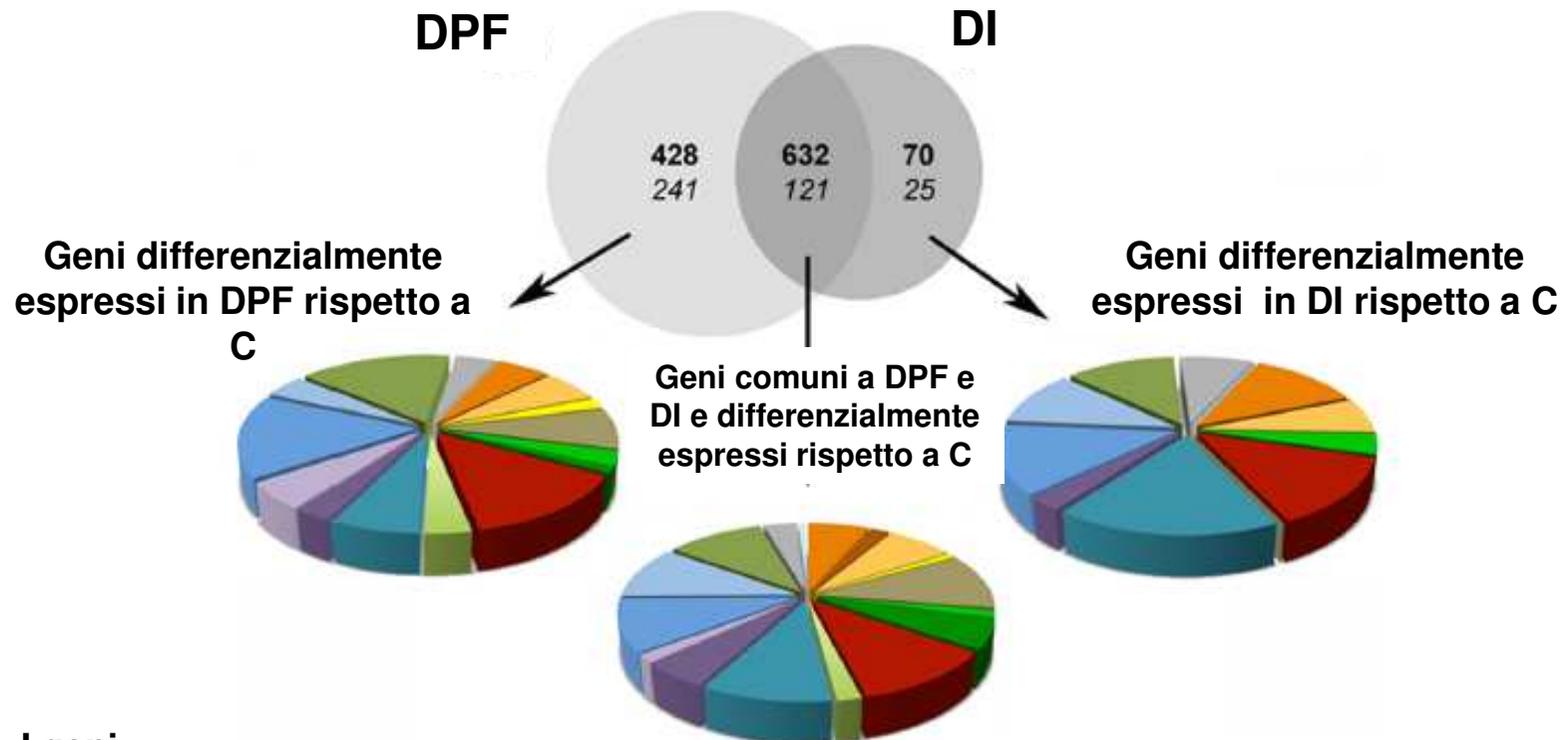


Lo stadio di fine invaiatura è risultato quello in cui vi è stato un maggiore riarrangiamento del trascrittoma in seguito ad entrambi i trattamenti di defogliazione, che hanno provocato un iniziale ritardo di maturazione.

# Studi di espressione genica su larga scala (“Whole genome approach”)

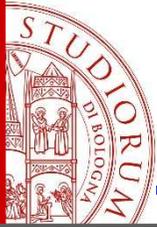


## Geni differenzialmente espressi in DPF e DI rispetto a C nello stadio di fine invaiatura .



I geni differenzialmente espressi sono stati suddivisi in categorie funzionali.

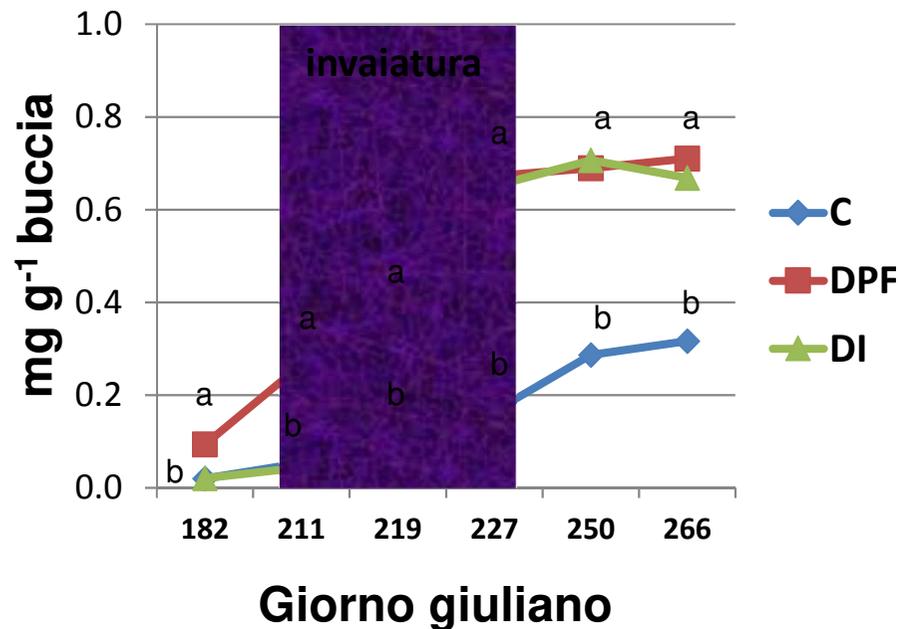
- carbohydrate metabolic process
- cellular amino acid and derivative metabolic process
- cellular process
- lipid metabolic process
- metabolic process
- nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
- photosynthesis
- protein metabolic process
- response to endogenous stimulus
- response to stress
- secondary metabolic process
- signal transduction
- transcription
- translation
- transport
- biological process
- reproduction



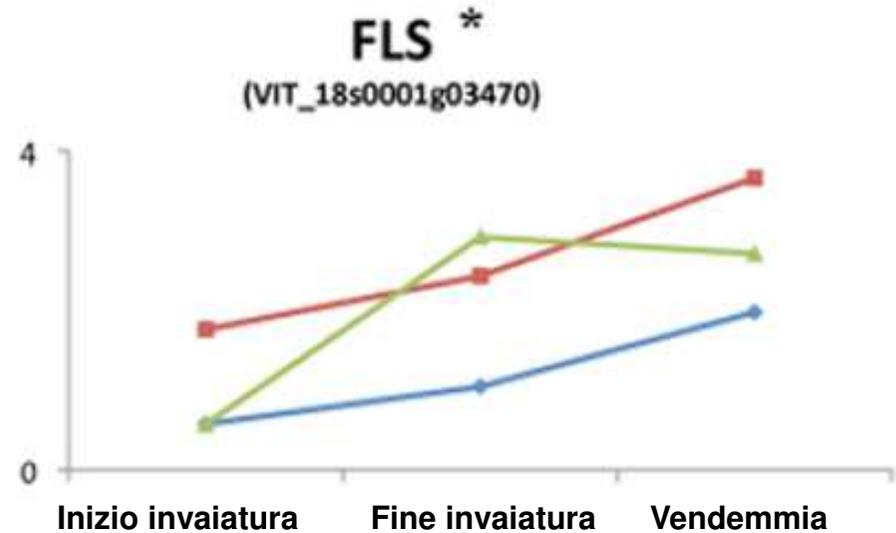
# Studi di espressione di geni specifici (“One-gene approach”) -> Real Time PCR



Le analisi Real Time hanno mostrato che in entrambi i trattamenti di defogliazione l'espressione del principale gene che presiede alla sintesi dei flavonoli (FLS) è stimolata → gene marker della defogliazione



Espressione normalizzata





# Effetto dell'applicazione di elicitori sulla maturazione e sull'accumulo di antociani e flavonoli in uve di Sangiovese

**LalVigne™ mature –**

**estratto 100% di lievito inattivato  
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

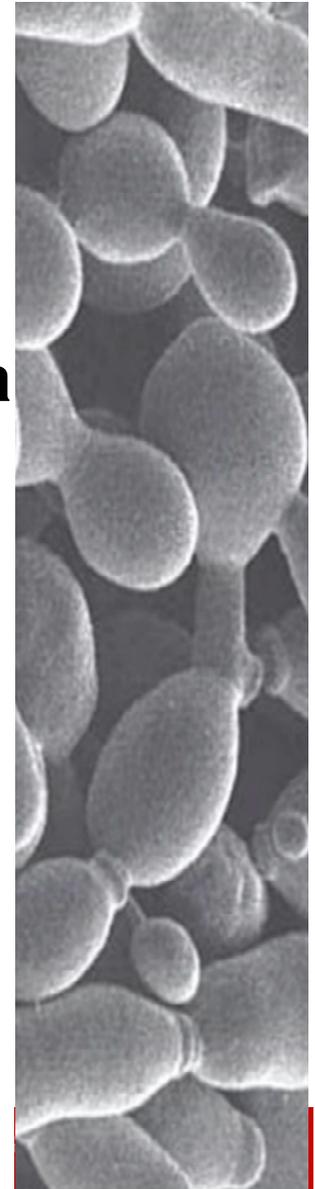


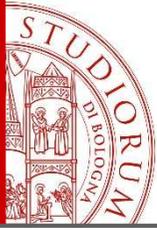
**contiene diversi composti che possono fungere da**

## **ELICITORI**

**composti della parete cellulare del lievito  
(mannoproteine,  $\beta$ -1,3- e  $\beta$ -1,6-glucani e chitina);  
composti della membrana plasmatica del lievito  
(lipidi, steroli e proteine)**

**molecole in grado di stimolare  
meccanismi di difesa della pianta attivando anche  
la biosintesi di metaboliti secondari, come i  
flavonoidi**





# Effetto dell'applicazione di LaVigne™ Mature

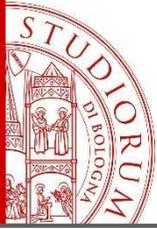
## MATERIALE E METODI

La prova è stata condotta nel 2016 su piante di 7 anni appartenenti alla cv. Sangiovese (clone 12T innestato su SO4) uniformate per numero di germogli e di grappoli.

Le 2 tesi a confronto sono state:

- **C: controllo, non trattato**
- **LVM: doppio trattamento con LaVigne™ Mature a livello della chioma e dei grappoli ad inizio invaiatura e quando l'invaiatura aveva raggiunto circa il 70%**





# Effetto dell'applicazione di LaVigne™ Mature

## CAMPIONAMENTO DEGLI ACINI

Le bacche sono state campionate dall'inizio dell'invasatura alla vendemmia

-T0, subito prima del primo trattamento (**A1**) bacche verdi

-T1, +48 ore dopo il primo trattamento bacche verdi

-T2, +48 ore dopo il secondo trattamento (**A2**)

-T3, + 7 giorni dal secondo trattamento

-T4, + 14 giorni dal secondo trattamento

-T5, vendemmia (solo per analisi biochimiche)

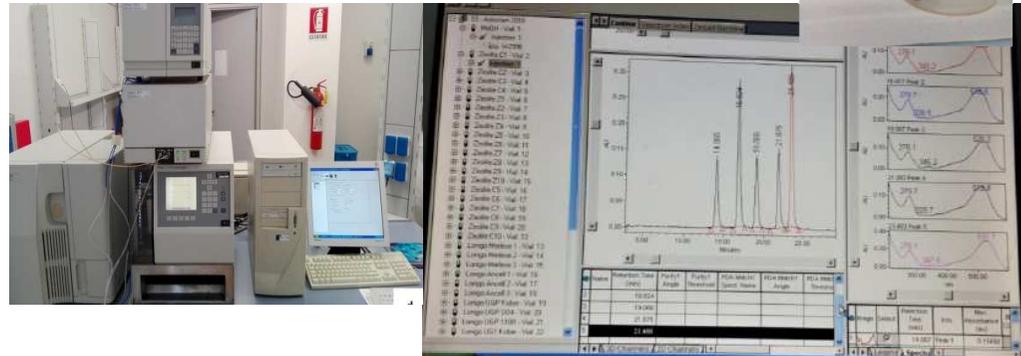
Concentrazione - 1kg/ha



# Effetto dell'applicazione di LaVigne™ Mature

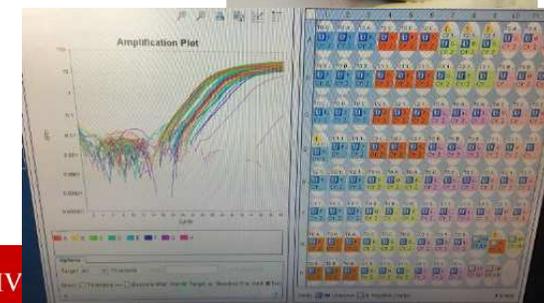
## ANALISI EFFETTUATE

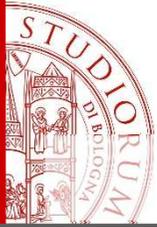
- ✓ Monitoraggio della maturità tecnologica (°Brix, pH, acidità)
- ✓ Estrazione ed analisi quantitativa degli antociani via HPLC



## Analisi molecolari → One gene- approach

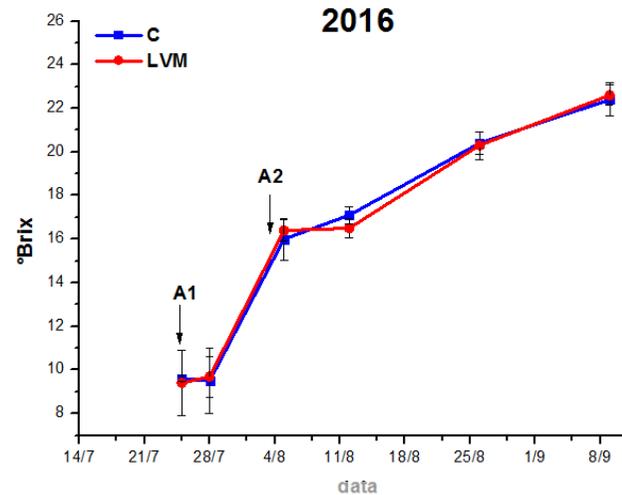
- ✓ Estrazione di RNA dalla buccia
- ✓ Analisi via Real Time PCR dei principali geni coinvolti nella biosintesi degli antociani



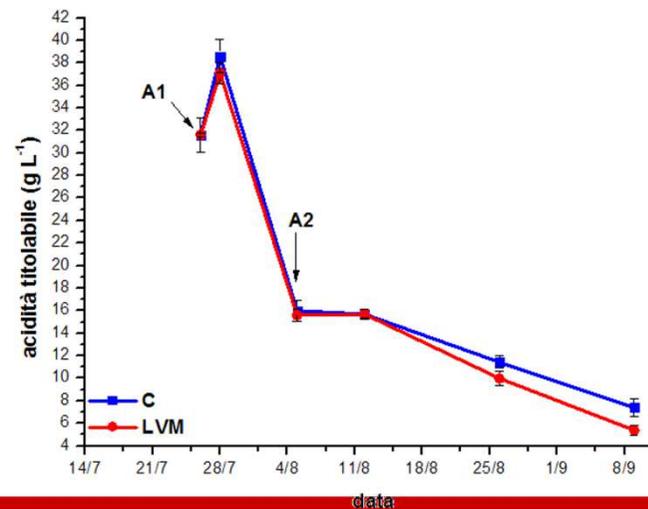


# Effetto di LaVigne™ Mature sulla maturità tecnologica

## Andamento solidi solubili (°Brix)



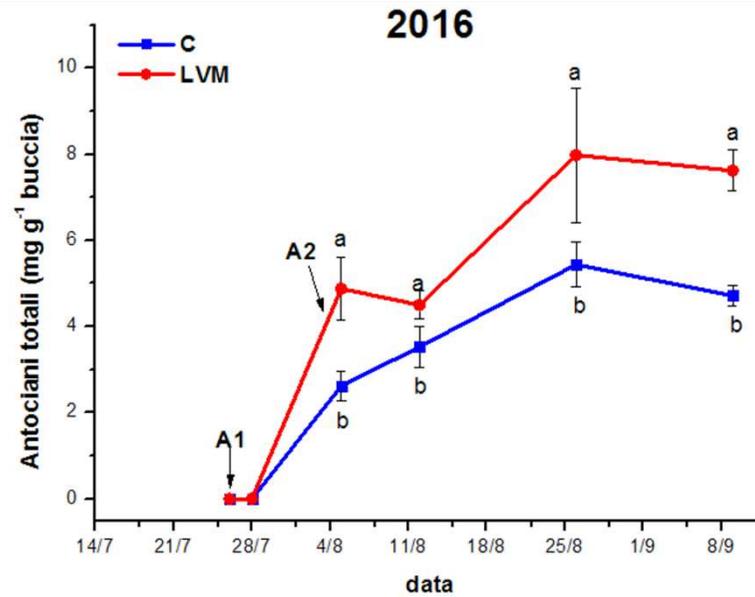
## Andamento acidità titolabile





# Effetto di LaVigne™ Mature

## Accumulo di antociani durante la maturazione



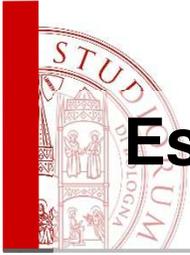
30 luglio 2016



LVM

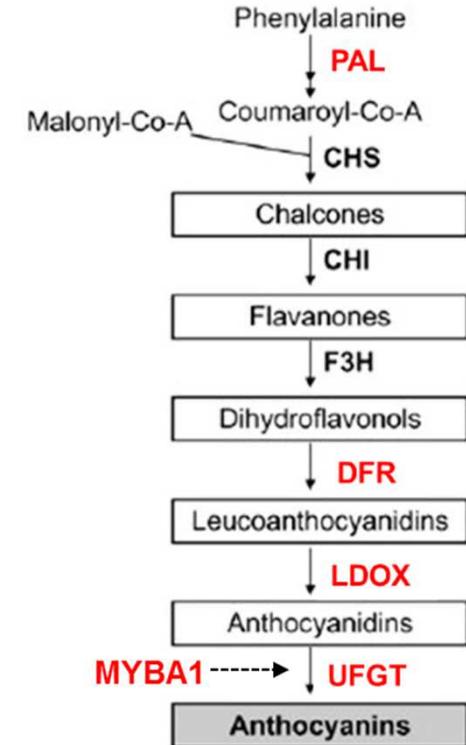
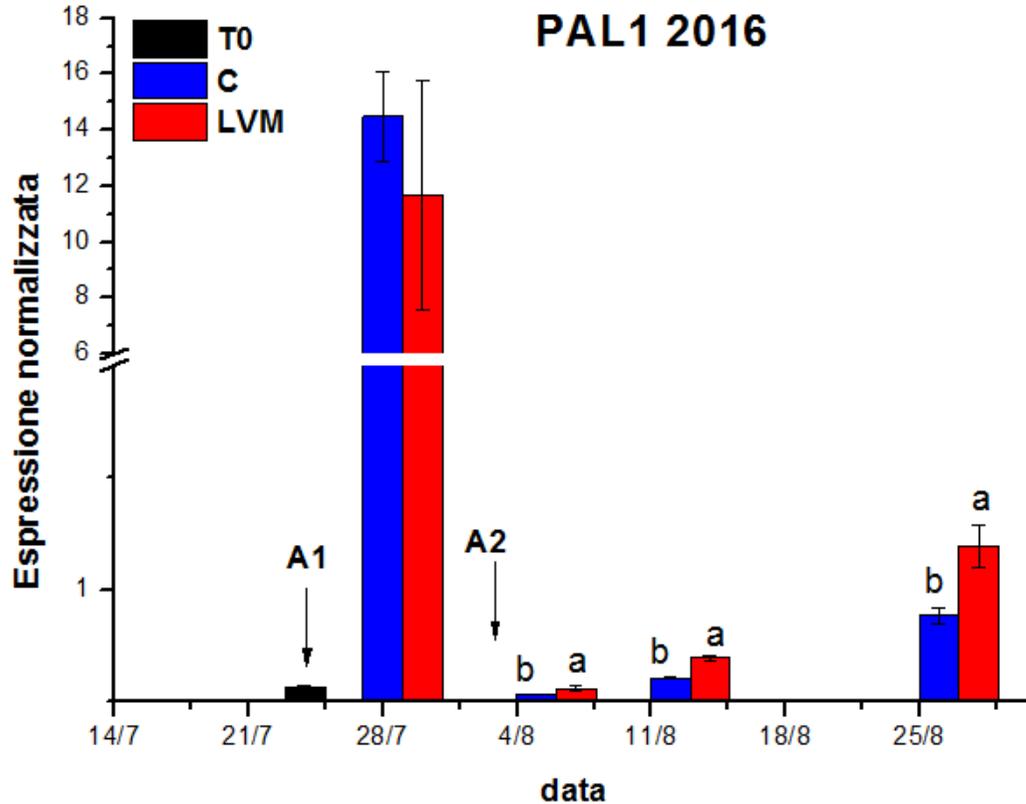


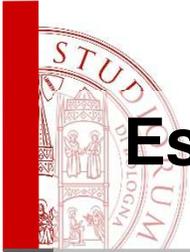
C



## Effetto di LaVigne™ Mature

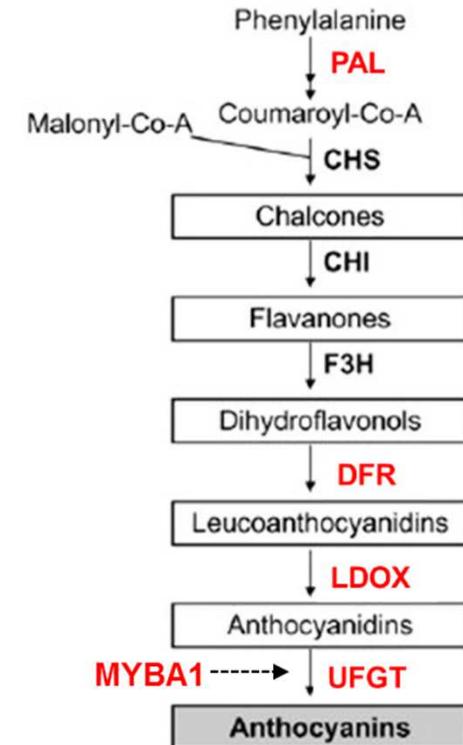
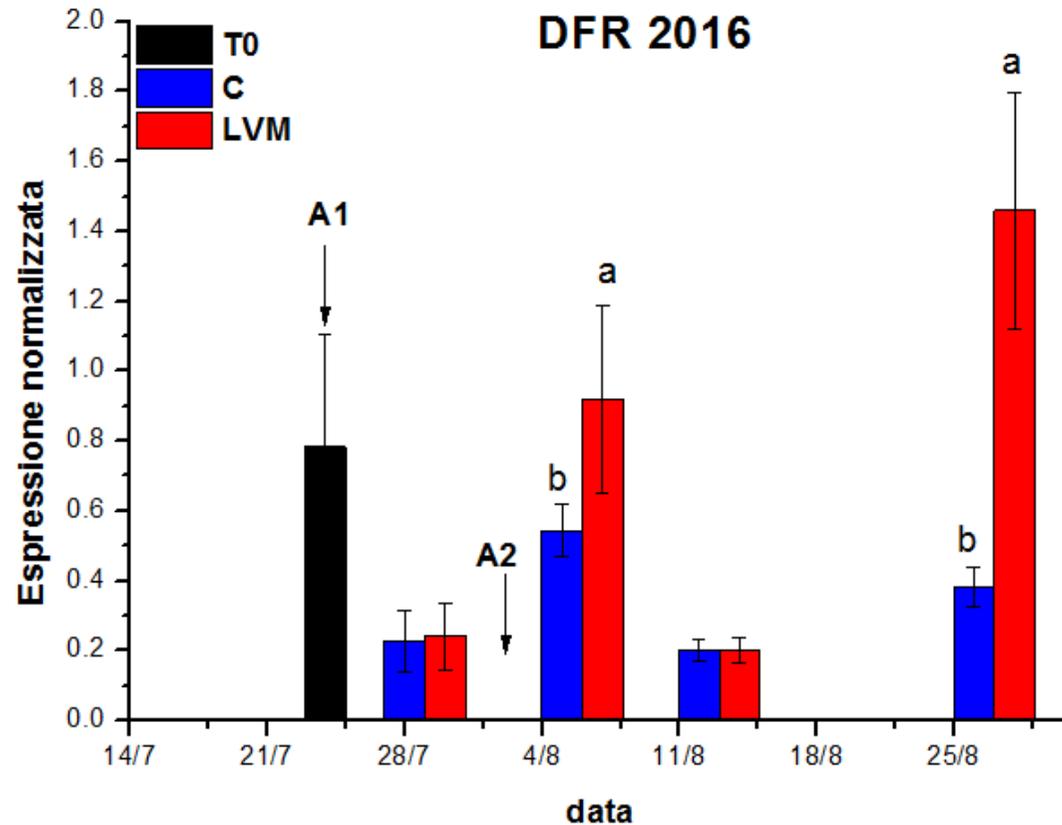
# Espressione dei principali geni coinvolti nella biosintesi degli antociani

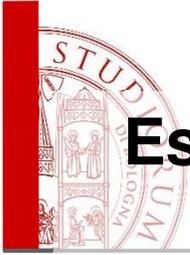




## Effetto dell'applicazione di LaVigne™ Mature

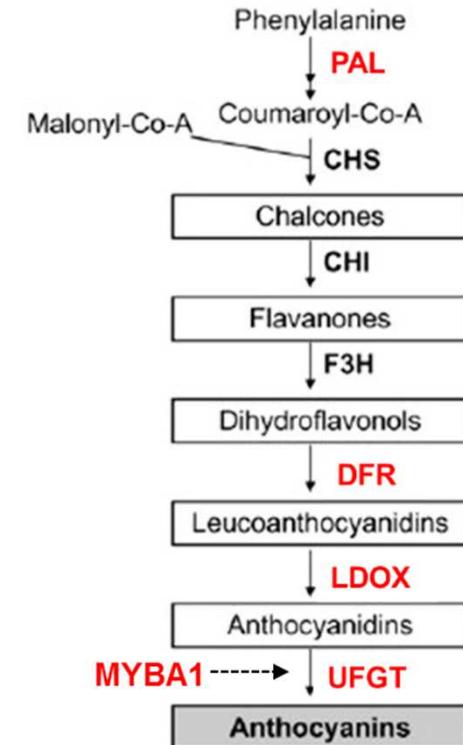
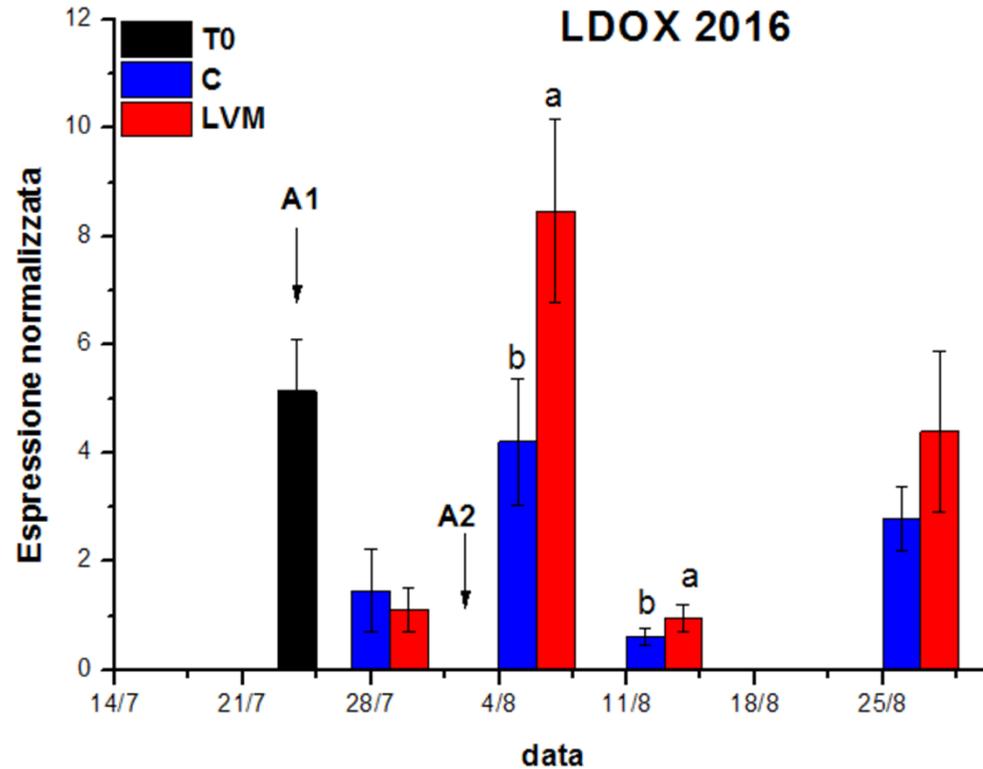
# Espressione dei principali geni coinvolti nella biosintesi degli antociani

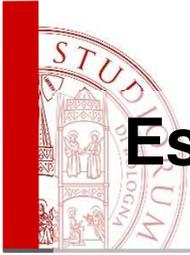




## Effetto dell'applicazione di LaVigne™ Mature

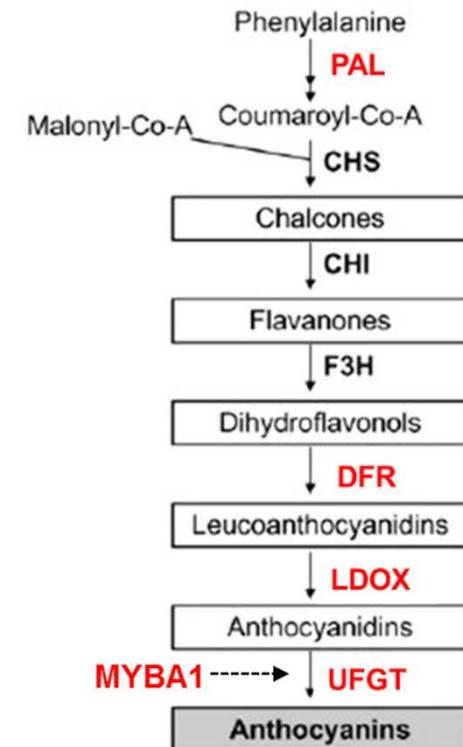
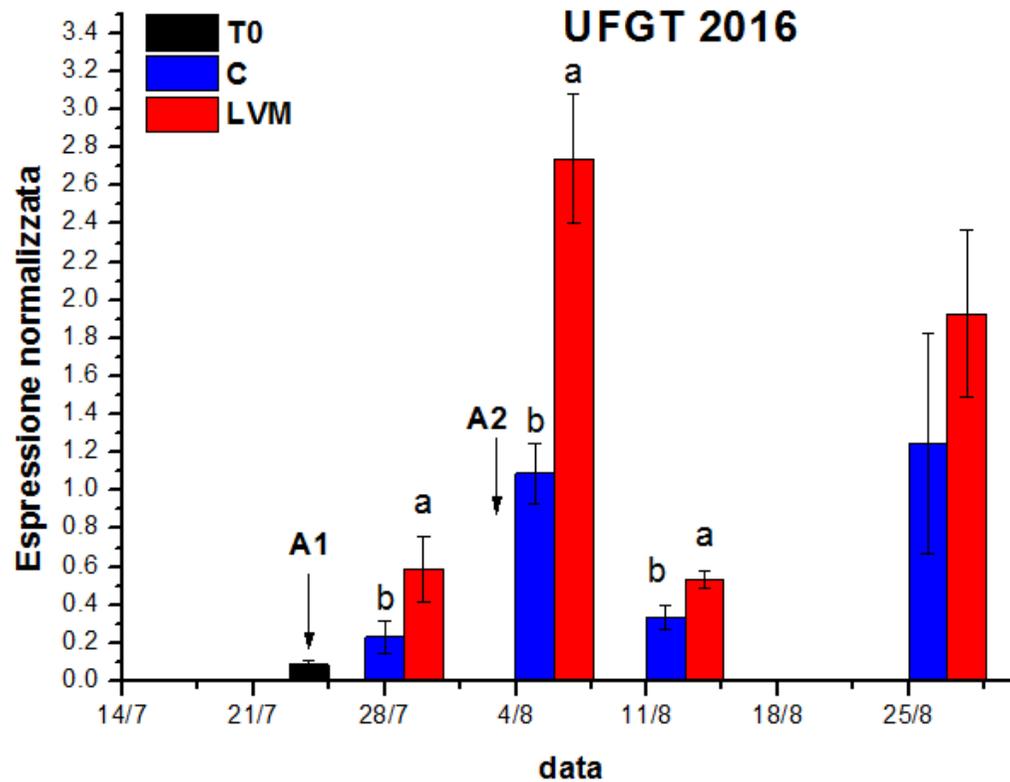
# Espressione dei principali geni coinvolti nella biosintesi degli antociani

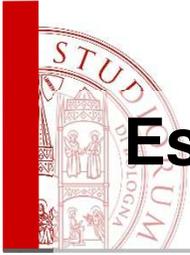




## Effetto dell'applicazione di LaVigne™ Mature

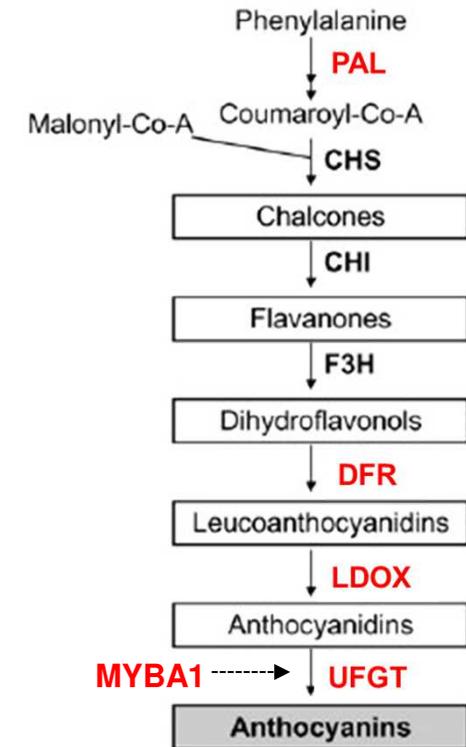
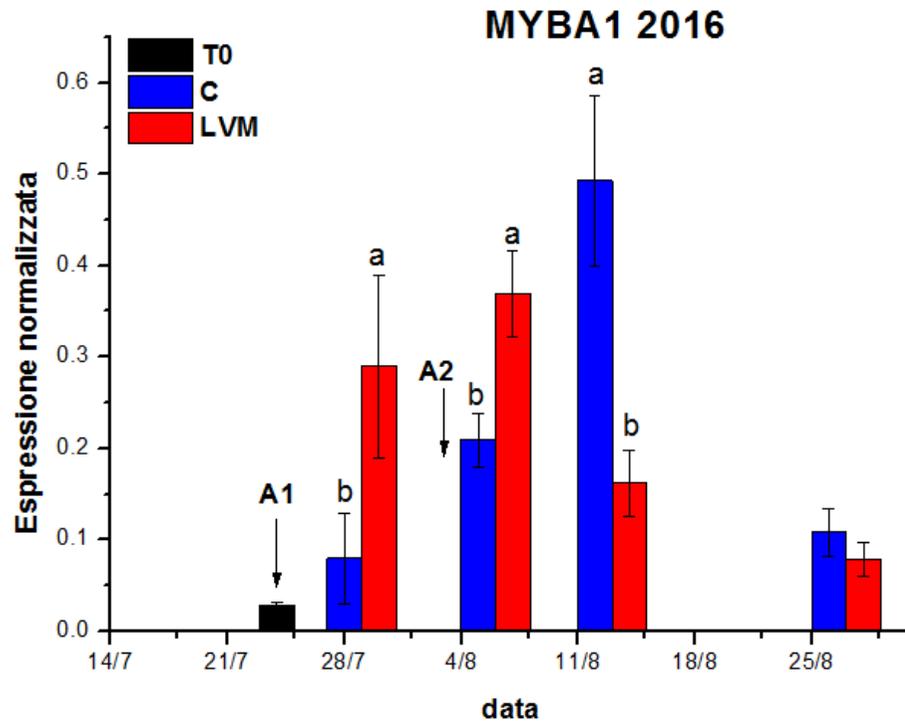
# Espressione dei principali geni coinvolti nella biosintesi degli antociani

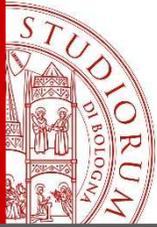




## Effetto dell'applicazione di LaVigne™ Mature

# Espressione dei principali geni coinvolti nella biosintesi degli antociani





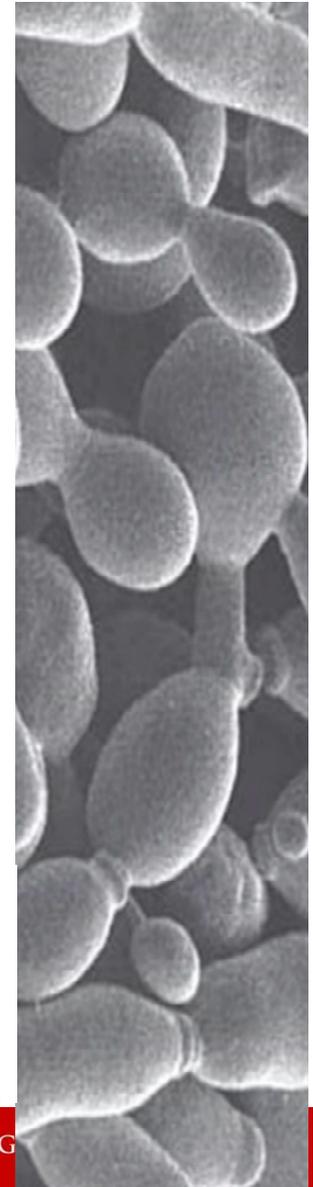
**Effetto dell'applicazione di LalVigne™ Mature**

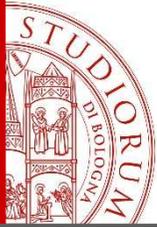
## **Conclusioni**

**La prova ha mostrato che l'applicazione di LalVigne™ Mature  
è in grado di incrementare la sintesi degli antociani in  
Sangiovese**

**in correlazione con una maggiore espressione dei geni che  
intervengono nella loro biosintesi,**

**senza influenzare la maturità tecnologica.**





**Tecniche  
colturali**

**Co**  **ali**

**Tecniche  
colturali  
innovative**

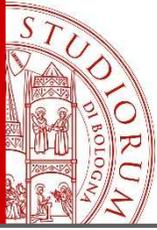


**composizione della  
bacca e sintesi dei  
polifenoli**



**Strategie di  
adattamento al  
cambiamento climatico**





# Grazie a



**Chiara Pastore  
Emilia Colucci  
Gianluca Allegro  
Gabriele Valentini**

**e a tutti per l'attenzione !**