

LE RISPOSTE DI DIFESA DI DUE VARIETÀ DIVERSAMENTE SENSIBILI ALLA FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE: STUDI RECENTI E PROSPETTIVE

N. BERTAZZON, V. FORTE, L. FILIPPIN, S. CASARIN, E. ANGELINI
 CREA -Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia-Via XXVIII Aprile, 26,
 31015 Conegliano (TV)
 nadia.bertazzon@crea.gov.it

RIASSUNTO

Le varietà di *Vitis vinifera* manifestano una diversa suscettibilità alla Flavescenza dorata (FD) della vite, suggerendo l'esistenza di specifici tratti genetici associati alla resistenza a questa malattia. Nel presente studio vengono investigate, a livello di espressione genica, le modalità con cui due varietà diversamente suscettibili alla malattia, Chardonnay e Tocai friulano, rispondono all'attacco da parte dell'insetto vettore, *Scaphoideus titanus*, e del fitoplasma agente causale di FD. Ne è risultato innanzitutto che esiste una differenza di base nelle vie di attivazione delle difese delle due varietà, già prima che l'insetto e il fitoplasma raggiungano la pianta, e che tali differenze vengono amplificate dall'infezione con il fitoplasma. Questi meccanismi molecolari suscitano nelle due varietà risposte di difesa diverse per tipologia e per tempistica, e ne definiscono la differente suscettibilità alla malattia. La ricerca dei tratti genici a monte di questi meccanismi molecolari è attualmente in corso attraverso lo studio di una popolazione derivante dall'incrocio fra Chardonnay e T. friulano.

Parole chiave: popolazione segregante, resistenza, RNA-Seq, *Scaphoideus titanus*, TROPICSAFE

SUMMARY

DEFENSE RESPONSES OF TWO GRAPEVINE CULTIVARS WITH DIFFERENT SUSCEPTIBILITY TO *FLAVESCENCE DORÉE*: RECENT STUDIES AND PERSPECTIVES

Grapevine varieties show differences in susceptibility to Flavescence dorée (FD), suggesting the existence of specific genetic traits associated with resistance to the disease. In the present study, the transcriptomic response induced by the FD phytoplasma and by its vector, *Scaphoideus titanus*, was investigated on two cultivars, Chardonnay and Tocai friulano, which display very different susceptibility to FD. Results showed that constitutive differences on defense strategies between the two varieties were amplified after the challenging with the insect or with the FD phytoplasma. Those molecular mechanisms caused defense responses different in the type, amplitude and kinetics of gene induction, thus defining the diverse susceptibility to FD of the two grapevine cultivars. The search for gene traits upstream of these molecular mechanisms is currently under way through the study of a population deriving from the cross between Chardonnay and T. friulano.

Keywords: segregating population, resistance, RNA-Seq, *Scaphoideus titanus*, TROPICSAFE

INTRODUZIONE

La flavescenza dorata (FD) è una delle malattie più dannose per i vigneti europei, con severe conseguenze economiche per i maggiori Paesi produttori viti-vinicoli. Causa infatti ingenti perdite di produzione, sia a livello quantitativo che qualitativo, nonché il progressivo declino e deterioramento delle piante. La lotta alla FD è basata principalmente sull'adozione di specifiche strategie di prevenzione e protezione fitosanitaria, fondate soprattutto sui trattamenti insetticidi per il contenimento del vettore, la cicalina *Scaphoideus titanus*. Nonostante le moltissime conoscenze acquisite finora e la lotta obbligatoria, la malattia e il suo vettore stanno

continuando ad espandersi. Permane una grave preoccupazione in certi areali e nelle aziende a conduzione biologica, che sono fra l'altro in crescita, perché i mezzi di lotta esistenti non vengono utilizzati adeguatamente o perché non sono abbastanza efficaci. Inoltre, nell'ottica di un'agricoltura più sostenibile, le tecniche tradizionalmente usate dovrebbero essere affiancate da approcci più moderni, consistenti ad esempio nell'uso di elicitatori delle difese della vite e / o nello sviluppo di piante resistenti alla malattia.

La presenza di differenze nella suscettibilità alla FD in diverse varietà di *Vitis vinifera* suggerisce l'esistenza di fattori genetici che influenzano la suscettibilità e la resistenza ai fitoplasmi nella vite (Schvester et al., 1967; Boudon-Padieu, 1996; Borgo e Angelini, 2002; Maixner et al., 2006; Pavan et al., 2012; Eveillard et al., 2016). Scopo del presente lavoro è la ricerca, mediante due approcci diversi, di geni associati alla resistenza/suscettibilità alla FD prendendo in considerazione due varietà, Chardonnay e Tocai friulano, portatrici di caratteri opposti, rispettivamente di suscettibilità e parziale resistenza alla FD. Il primo approccio consiste nell'esaminare la reazione della pianta nelle prime fasi dell'infezione da FD, sia in varietà suscettibili che resistenti, e quindi confrontarle. Vengono qui riportati i dati ottenuti da un esperimento in cui è stato sequenziato l'RNA totale (RNA-Seq) per confrontare i cambiamenti trascrizionali che avvengono in Chardonnay e T. friulano nel corso dell'interazione tritrofica "vite - fitoplasma della FD - *S. titanus*". Il secondo approccio, avviato nel 2011 e attualmente in corso nell'ambito del progetto europeo TROPICSAFE, si basa invece sullo studio della progenie derivante dall'incrocio di Chardonnay e T. friulano, segregante per gli specifici caratteri di suscettibilità/resistenza alla FD.

MATERIALI E METODI

Studio dei profili di espressione mediante RNA-Seq

Il piano sperimentale ha incluso 12 trattamenti, ciascuno dei quali riprodotto in tre repliche biologiche, per un totale di 36 campioni. Nel dettaglio, sono state considerate due varietà di vite caratterizzate da diversa suscettibilità ai giallumi: T. friulano clone ISV6 e Chardonnay clone R8. Le piantine micropropagate delle due varietà sono state esposte a vettore infettivo, a vettore sano o sono state mantenute in assenza di vettore (figura 1).

Negli esperimenti di trasmissione sono stati usati insetti allevati in condizioni controllate. I tralci raccolti durante il periodo invernale da un vigneto molto infestato da *S. titanus* sono stati posti in una gabbia di allevamento posta in una camera climatica (temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodo 16:8 h, umidità relativa 70-75%) in modo da favorire la schiusa delle uova. In ciascuna gabbia era stata aggiunta una foglia di vite fresca sopra i tralci di legno in modo da attrarre le larve di primo stadio, consentendo loro di alimentarsi. Un gruppo di larve è stato trasferito direttamente in germogli di viti sane, mentre un secondo gruppo è stato riposto nelle gabbie di allevamento in camera climatica e, una volta raggiunto il secondo-terzo stadio, è stato alimentato con foglie sintomatiche, raccolte da viti di Pinot grigio infette da FD, per circa 15-20 giorni (periodo di acquisizione), dopo i quali le ninfe sono state trasferite sulle foglie sane per circa un mese (periodo di latenza).

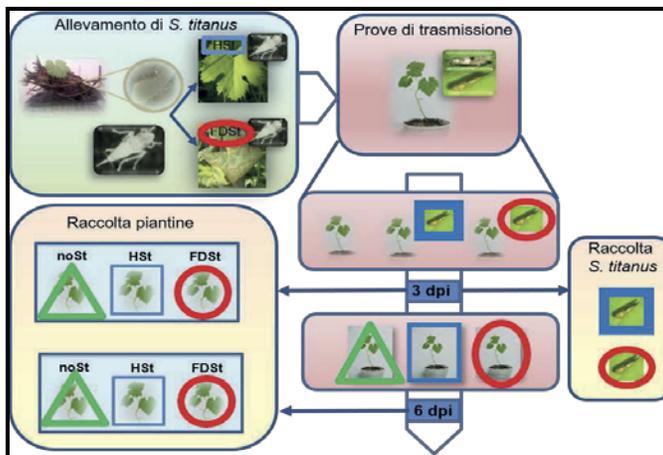
Le prove di trasmissione sono state eseguite utilizzando *S. titanus*, sani e infettivi, che erano al quinto stadio o adulti, età nelle quali si suppone che l'insetto, alimentato su foglie infette, abbia acquisito il fitoplasma e sia diventato infettivo (Chuche e Thiery, 2014). Le piantine micropropagate, di età e dimensioni simili, sono state disposte all'interno di box trasparenti, con coperchio traspirante e substrato bagnato per mantenere invariata l'umidità. In ogni box sono state posizionate sei piantine, che sono state separate a due a due mediante una parete trasparente, in modo da poter controllare quotidianamente i movimenti degli insetti. Due individui di *S. titanus* sono stati aggiunti su ogni coppia di piantine micropropagate, sulle quali

essi sono stati liberi di alimentarsi per tre giorni, nel corso dei quali venivano osservati giornalmente i movimenti degli insetti e venivano raccolti eventuali individui morti. Una parte delle piantine micropropagate è stata raccolta dopo tre giorni (trattamento 3 dpi) e un'altra parte dopo sei giorni (trattamento 6 dpi).

Dagli insetti e dalle piantine usati nella prova di trasmissione è stato estratto il DNA seguendo il protocollo che prevede l'uso del CTAB (cethyl-trimethyl-ammonium bromide) ed è stata effettuata la *real time* PCR per rilevare l'eventuale presenza del fitoplasma della FD (Bertazzon et al., 2019).

Dalle piantine usate nella prova di trasmissione è stato estratto anche l'RNA totale, mediante il kit commerciale Norgen, che è stato in seguito sottoposto a sequenziamento (RNA-Seq) tramite piattaforma "Illumina". Il sequenziamento ha generato una serie di corte sequenze, chiamate "read", di lunghezza media di 300 paia di basi, che sono state allineate sul genoma di *V. vinifera* di riferimento. Queste sono state utilizzate per costruire un profilo di espressione per ogni gene. L'analisi bioinformatica e la determinazione dei geni differenzialmente espressi (DEGs) tra trattamenti diversi è stata eseguita con il pacchetto DESeq2 ver. 1.2.8 (Bioconductor).

Figura 1. Diagramma illustrante l'allevamento e l'infezione di *S. titanus* (HSt: sani; FDSt: infettivi) in condizioni controllate e le prove di trasmissione. Vengono indicati le fasi di raccolta per l'analisi delle piantine e degli insetti durante l'esperienza (dpi: giorni post-infestazione)



Studio della popolazione d'incrocio tra Chardonnay e T. friulano

Per ottenere la popolazione segregante sono state svolte due campagne d'incrocio, una nella primavera del 2011 e la seconda nel 2017, usando come parentali T. friulano ISV6 e Chardonnay R8. Dalla campagna 2011 sono stati ottenuti 61 grappoli, da cui sono stati estratti in totale 1020 vinaccioli. Dai vinaccioli sono germogliate 169 piantine, che sono state coltivate prima in vaso e successivamente in campo. Tra queste, nell'inverno 2017 sono stati scelti 54 biotipi che sono stati moltiplicati in vivaio per produrre almeno 20 barbatelle ciascuna, innestate su portainnesto SO4. Le barbatelle di ciascun genotipo sono state suddivise in tre gruppi e piantate, secondo uno schema a blocchi randomizzati, in un campo sperimentale situato ad Alba (CN), zona ad alta incidenza di malattia, per l'infezione naturale tramite il vettore *S. titanus*. In aggiunta, nello stesso vigneto sono state piantate 40 barbatelle

di T. friulano ISV6 e Chardonnay R8, da usare come riferimenti durante la fenotipizzazione. Nella seconda campagna d'incrocio, eseguita con gli stessi parentali, sono stati ottenuti 52 grappoli e 1452 vinaccioli, da cui sono germogliate 600 piantine che, dopo una fase di accrescimento in fertirrigazione, verranno moltiplicate nell'inverno 2020.

Per la genotipizzazione, da 260 biotipi, scelti tra quelli ottenuti con le due campagne di incrocio, è stata prelevata una foglia giovane da cui è stato estratto il DNA genomico con un kit commerciale Qiagen. I genotipi derivati da autofecondazione sono stati rilevati grazie all'amplificazione di 10 microsatelliti (SSR) e verifica degli stessi con l'analizzatore genetico Genetic Analyzer 3130 XL.

RISULTATI

Le differenze di espressione costitutive tra Chardonnay e T. friulano

Mediante RNA-Seq sono stati determinati i profili dei geni espressi in piantine di Chardonnay e T. friulano, raccolte dopo tre e sei giorni dall'inizio dell'infestazione da parte di *S. titanus* sani o infettivi, e, come controllo, da piantine non infestate delle due varietà.

La comparazione a livello di espressione genica di piantine sane delle due varietà ha messo in evidenza un'elevata differenza costitutiva: sono stati individuati 6233 DEGs, dei quali circa la metà con un livello di espressione più alto in T. friulano (3046). Nonostante il numero così elevato di DEGs, l'analisi funzionale ha rivelato il coinvolgimento della maggior parte di questi geni in meccanismi di risposta agli stress e in vie del metabolismo secondario. T. friulano ha mostrato un livello di espressione costitutivamente più alto di molti geni codificanti per proteine coinvolte nel sistema di sorveglianza innescato dal riconoscimento dei patogeni e per proteine di difesa (PR-protein). Inoltre, numerosi geni del metabolismo secondario, in particolare quelli coinvolti nel metabolismo fenolico e soprattutto nella biosintesi di monolignoli e stilbeni, erano maggiormente espressi in T. friulano. Questi comprendevano alcuni geni della via generale dei fenilpropanoidi, come la *fenilalanina ammonio liasi* (PAL) e la *4-cumarato-CoA ligasi* (4CL), molti geni dedicati alla produzione dei precursori dei monolignoli, *cinnamoil-CoA reduttasi* (CCR), *ferulato 5-idrossilasi* (F5H), *caffeoil-CoA 3-O-metiltransferasi* (CCoAOMT) e *cinnamil-alcol deidrogenasi* (CAD)) e vari geni codificanti per le laccasi, enzimi coinvolti nel processo di polimerizzazione della lignina. Anche numerosi geni della stilbene sintasi (STS), enzima che catalizza la sintesi di stilbeni partendo dagli intermedi della via generale dei fenilpropanoidi, erano più espressi in T. friulano. Numerosi DEGs sono stati osservati anche nella via del metabolismo fenolico che porta alla biosintesi dei flavonoidi, coinvolti in particolare nella produzione di flavoni, flavonoli e antocianine, con profili di espressione divergenti nelle due varietà. Differenze significative tra Chardonnay e T. friulano sono state osservate nei profili dei trascritti di geni coinvolti nel metabolismo dei terpenoidi: 64 geni della via dell'acetato/mevalonato, che porta alla sintesi di isopentenil pirofosfato, precursore fondamentale di tutti i terpenoidi, e 16 geni annotati come terpene sintasi (TPS), specificamente coinvolte nella produzione di monoterpene, sesquiterpene e triterpene. Infine, sono state osservate differenze trascrizionali significative tra le tesi controllo di Chardonnay e T. friulano per un gruppo di geni coinvolti nella biosintesi degli ormoni, nella loro mobilitazione e nella trasduzione di segnali. In particolare, molti geni coinvolti nella biosintesi dell'acido jasmonico (JA) erano più espressi in T. friulano: otto geni codificanti per lipossigenasi (LOX), enzima chiave della prima parte generale della via degli ottodecanoidi, che porta alla produzione di jasmonati e di un gruppo di ossilipine chiamate "green leaf volatiles" (GLV), e due geni per acido osso-fitodienoico reduttasi (OPR), enzima specifico per la sintesi di jasmonato.

Le risposte di Chardonnay e T. friulano all'attacco del fitoplasma della FD e del suo vettore *S. titanus*

Per studiare la risposta messa in atto dalla vite all'attacco di *S. titanus* sani o infettivi, per ciascuna varietà e per ciascun prelievo, i profili dei trascritti ottenuti dalle piante infestate con insetti sani sono stati confrontati con quelli ottenuti dai controlli, in modo da identificare i cambiamenti trascrizionali dovuti all'interazione pianta-insetto (HSt). Sono stati inoltre confrontati i trascritti di piante infestate con il fitoplasma FD e i trascritti dei controlli per studiare i cambiamenti di espressione genica che si verificano nell'interazione tri-trofica tra pianta-insetto-fitoplasma (FDSSt). I DEGs ottenuti sono stati raggruppati in base all'appartenenza a categorie funzionali (GO) con frequenza superiore a quella attesa. Nella tabella 1 vengono indicati il numero di DEGs individuati e il numero di processi biologici modulati in modo statisticamente significativo.

I profili dei trascritti individuati in risposta ad HSt e FDSSt sono stati molto diversi fra le due varietà. La risposta di Chardonnay all'infestazione di HSt è stata molto elevata a 3 dpi ma ha subito una drastica riduzione a 6 dpi, mentre è stato osservato un aumento nel tempo del numero di termini GO arricchiti. Al contrario, si è verificato un significativo aumento nel tempo sia di DEGs che di termini GO arricchiti in risposta a infezioni di FDSSt. In entrambi i casi, il numero di DEGs condivisi a 3 e 6 dpi è stato molto basso (70 per HSt e 80 per FDSSt). In T. friulano, nonostante sia stato osservato un numero molto simile di DEGs a 3 e 6 giorni dopo l'attacco di HSt, l'analisi funzionale di questi geni ha rilevato solo 2 termini GO comuni tra i due tempi. Anche la risposta all'infezione di FDSSt è rimasta costante nel tempo, ma sono stati individuati solo 254 DEGs e 39 termini GO comuni a 3 e 6 dpi.

Tabella 1. Numero di geni modulati (DEGs), sovra-regolati o sotto-regolati, e di processi biologici (GO) arricchiti, nella risposta di Chardonnay e Tocai friulano dopo tre o sei giorni (dpi) dall'attacco di *S. titanus* sani (HSt) o infettivi (FDSSt)

	HSt				FDSSt			
	Chardonnay		Tocai friulano		Chardonnay		Tocai friulano	
	3 dpi	6 dpi	3 dpi	6 dpi	3 dpi	6 dpi	3 dpi	6 dpi
n. DEGs	1656	526	815	949	460	1471	1735	1713
n. DEGs up-regolati	977	160	446	467	242	795	799	853
n. DEGs sotto-regolati	679	366	369	482	218	676	936	860
n. GO arricchiti	57	119	8	11	17	121	118	68

Diversi geni coinvolti in vie di percezione e trasduzione degli stimoli ambientali per l'avvio della risposta di difesa basale della pianta sono risultati sovraespressi in Chardonnay dopo l'attacco di HSt. Tra questi, 81 geni per "receptor-like kinases" (RLK) e 40 geni codificanti per proteine leganti il Ca^{2+} , come la calmodulina o proteine simili (CML) e proteine chinasiche dipendenti dal Ca^{2+} . Una risposta della stessa tipologia, ma quantitativamente molto più attenuata, è stata osservata anche in T. friulano. Al contrario, in entrambe le varietà, dopo sei giorni dall'infezione di FDSSt è stata rilevata una generale sottoespressione di RLK e di geni coinvolti nella trasduzione del segnale mediata dal Ca^{2+} (figura 2).

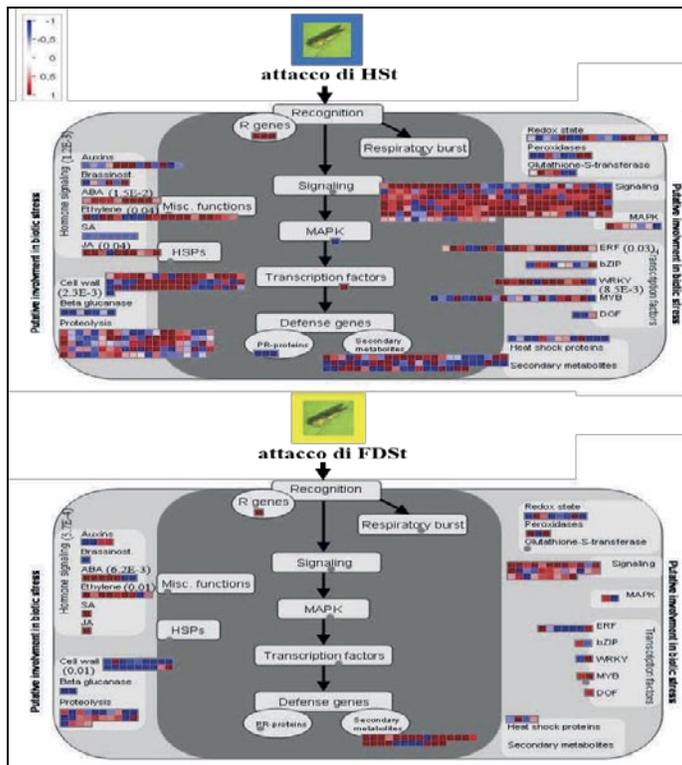
In Chardonnay, l'attacco di HSt ha indotto la trascrizione di molti geni coinvolti nella sintesi di tre ormoni, JA, etilene (ET) e acido abscissico (ABA) e nelle risposte mediate da questi ormoni, coinvolte nella regolazione degli stress e della risposta ai patogeni. Geni della via degli otodecanoidi, implicati nella biosintesi di JA, sono risultati fortemente sovra-regolati: tre

LOX, due *OPR* e una *JA metil transferasi (JAMT)*. Inoltre, è stata osservata la sovraespressione di due geni codificanti per due enzimi chiave nella biosintesi di ET, l'acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (*ACC*) sintasi e l'*ACC* ossidasi (*ACO*), e di 27 geni codificanti per fattori di trascrizione della famiglia *APETALA2/ET-responsive factors (AP2/ERF)*. La puntura di HSt in Chardonnay ha indotto anche l'espressione di numerosi geni della via biosintetica dell'ABA e di geni coinvolti nella risposta mediata da questo ormone, come la 9-cis-epossicarotenoide diossigenasi (*NCED*) e l'ABA-aldeide ossidasi (*AAO*). Al contrario, nella risposta di Chardonnay all'infezione di FDSt è stato osservato un numero molto più basso di DEGs coinvolti nelle vie di trasduzione di ET e JA (figura 2). Per esempio, tra i geni coinvolti nella risposta di difesa mediata da JA, 10 erano differenzialmente espressi in seguito all'infestazione di HSt, mentre solo un gene *LOX* era modulato dopo l'infezione di FDSt. Similmente, tra i geni implicati nella difesa mediata da ET, rispettivamente 20 e nove geni sono risultati modulati dopo l'infestazione di HSt e FDSt. In T. friulano l'infestazione di HSt ha modificato poco l'espressione dei geni coinvolti nelle vie di trasduzione mediate da ormoni. In particolare, la trascrizione di sette su nove geni implicati nella via di biosintesi e di risposta dell'ABA è risultata depressa. In maniera simile, nella risposta della stessa varietà all'infezione di FDSt, l'espressione di geni indotti dall'ABA è risultata repressa, come anche quella di alcuni geni della via degli ottodecanoidi (due *LOX*, tre *OPR* e una *JAMT*).

La trascrizione di molti geni coinvolti nel metabolismo della parete cellulare è stata modificata dall'attacco di FDSt soprattutto in T. friulano: dopo sei giorni nove geni codificanti enzimi per la biosintesi di elementi di parete, in particolare cellulosa sintasi, e 28 geni implicati nella degradazione/modificazione della parete cellulare, come *XTH* e *pectina liasi*, sono risultati sottoespressi.

Tra le vie del metabolismo secondario, quella dei fenilpropanoidi è risultata modulata in modo significativo in Chardonnay a sei giorni dall'infezione di FDSt: tre geni codificanti per la *PAL* e la *C4H* erano sovraespressi, come anche 22 *STS* e 11 laccasi. In T. friulano è stata osservata l'induzione nella trascrizione di alcuni geni del metabolismo dei flavonoidi, come la flavonoide reduttasi e l'ossoglutarato ossigenasi, tre giorni dopo l'infestazione di HSt. Anche l'espressione di alcuni geni implicati nel metabolismo dei terpenoidi è stata modificata in seguito all'attacco di HSt o FDSt nelle due varietà. In Chardonnay, la puntura di HSt, dopo tre giorni, ha elicitato la trascrizione della *3 (+)-delta-cadinene sintasi*, che produce un enzima che catalizza la reazione di sintesi del terpenoide delta-cadine, costituente importante di oli essenziali. La risposta di T. friulano all'infezione di FDSt è stata caratterizzata in entrambi i tempi dalla sovraespressione di geni coinvolti a vari livelli nella sintesi dei terpenoidi.

Figura 2. Modulazione di geni coinvolti in meccanismi di risposta a stress biotici a tre giorni dall'attacco di *S. titanus* sani (HSt) o infetti (FDS) in Chardonnay. Sono illustrate le principali vie di percezione e trasduzione del segnale e alcune risposte di difesa. Il colore rosso indica i geni sovraespressi e il blu i geni sottoespressi



Risultati preliminari nella ricerca dei tratti genetici responsabili dei diversi gradi di suscettibilità alla FD nelle varietà T. friulano e Chardonnay

L'individuazione dei QTL (*Quantitative trait loci*) responsabili della suscettibilità/resistenza alla FD richiede la fenotipizzazione di ciascun genotipo della popolazione segregante utilizzando una scala di suscettibilità alla malattia. A causa della bassa popolazione di *S. titanus*, rilevata nella primavera-estate 2018 nel vigneto sperimentale in Piemonte, è stato necessario l'utilizzo di un metodo di fenotipizzazione controllata, diverso dall'infezione spontanea. Per la trasmissione controllata di FD, su ogni pianta, all'interno di manicotti in rete, sono stati posizionati 20 individui di *S. titanus*, prelevati da vigneti della zona con elevata incidenza di FD. Durante l'estate 2018 sono stati posizionati 120 manicotti, 20 per ogni genotipo, e ulteriori 20 manicotti sui riferimenti parentali. Nel 2021 inizierà anche la fenotipizzazione dei genotipi ottenuti con la seconda campagna d'incrocio (2017), che verranno moltiplicati e piantati in Veneto. Al fine di individuare i vigneti in cui verranno raccolti gli insetti, nell'estate 2018 è stato svolto un monitoraggio che ha coinvolto 89 aziende del Veneto, di cui 49 con una percentuale di giallume maggiore del 30%.

Per la genotipizzazione della popolazione d'incrocio, è stato estratto il DNA di 260 biotipi, (60 della campagna del 2011 e 200 di quella del 2017). L'analisi dei microsatelliti ha evidenziato un numero di autofecondati pari al 6% nella prima campagna d'incrocio e al 25 % nella seconda campagna, che sono stati scartati. I rimanenti 200 biotipi verranno genotipizzati con il metodo GBS (*genotyping-by-sequencing*). Questa tecnologia basata sul sequenziamento di nuova generazione (NGS) consente di individuare e genotipizzare un elevatissimo numero di polimorfismi genetici (SNP) in un singolo passaggio, permettendo un'efficiente analisi della diversità del materiale segregante, in un modo veloce e non troppo costoso, grazie all'uso di enzimi di restrizione (Elshire et al., 2011).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro, i meccanismi coinvolti nella suscettibilità e nella resistenza alla FD di Chardonnay e T. friulano, sono stati investigati prendendo in considerazione le risposte trascrizionali messe in atto dalle due varietà in seguito all'infezione.

In generale, le piante possiedono due tipi principali di strategia di difesa: meccanismi passivi o preesistenti, che coinvolgono barriere strutturali, quali cuticole spesse o riserve di composti antimicrobici, e meccanismi di difesa attivi, che vengono indotti in seguito al superamento delle barriere strutturali da parte dei patogeni.

La presenza di meccanismi di difesa passivi è stata studiata nelle due varietà di vite mediante la comparazione di piante non infette cresciute e mantenute in condizioni controllate identiche. L'analisi comparativa dei profili dei trascritti costitutivi ha rivelato che Chardonnay e T. friulano possiedono un *background* genetico molto diverso, comprendente molti DEGs coinvolti in vie del metabolismo secondario. Vari geni potenzialmente associati con meccanismi di difesa delle piante contro stress biotici e abiotici hanno mostrato un'espressione preferenziale in T. friulano, suggerendo per questa varietà il possibile coinvolgimento di strategie di difesa costitutive contro *S. titanus* e/o il fitoplasma della FD. Infatti, è emerso un più elevato livello di espressione di geni putativamente coinvolti in varie vie di percezione e traduzione del segnale, attive contro attacchi di patogeni o di insetti, e di numerosi geni associati alla produzione di composti antimicrobici, come vari composti fenolici, tra cui gli stilbeni, e le proteine PR, la maggior parte dei quali costituiscono meccanismi di difesa tipicamente messi in atto contro gli insetti (War et al., 2012). Inoltre, anche geni coinvolti nella via biosintetica del JA sono risultati maggiormente espressi in T. friulano. Il JA viene considerato uno dei più importanti elicitori della risposta di difesa della pianta contro gli insetti, inducendo la produzione di diversi composti di difesa (Shivaji et al., 2010). Il suo ruolo è stato dimostrato anche in relazione ad alcune fitoplasmosi: il successo del vettore del fitoplasma *Aster Yellow* nell'infestazione di *Arabidopsis* è fortemente dipendente dalla riduzione dei livelli di JA (Sugio et al., 2011); inoltre, l'attivazione delle difese mediate da JA è stata osservata nel corso del risanamento spontaneo di viti che avevano sintomi di giallumi (Paolacci et al., 2017).

L'attivazione di meccanismi di difesa attivi indotti dall'infestazione di *S. titanus* sani o infetti è stata comparata nelle due varietà con diversa suscettibilità alla FD. La difesa attiva consiste nell'erezione di una serie altamente coordinata di barriere a livello molecolare, cellulare e tissutale, che si verifica in seguito ad un complesso scambio di segnali innescato dall'interazione pianta-patogeno. In questo lavoro T. friulano e Chardonnay hanno mostrato delle ampie differenze nell'ampiezza e nella tipologia di cambiamenti trascrizionali indotti dall'infezione. In particolare, l'infezione di FD causa nella varietà parzialmente resistente rapidi e ampi cambiamenti dei trascritti, che portano all'erezione di difese attive sin dalle

prime fasi di infezione, basate soprattutto sul rimodellamento della parete cellulare. All'opposto, la varietà suscettibile è caratterizzata da un'attivazione ritardata di strategie di difesa, consistenti principalmente nell'induzione della sintesi di fitoalessine, tipica reazione di difesa riportata per ospiti suscettibili (Kuc, 2006).

Il piano sperimentale utilizzato in questo studio che includeva tre trattamenti (vettore infettivo, vettore sano e assenza di vettore) ha consentito di ottenere i profili dei trascritti delle diverse risposte della vite. Questo approccio ha consentito di indagare per la prima volta la modulazione dell'espressione genica della vite elicitata dalla puntura di *S. titanus* infetti e sani e poi, in aggiunta, l'effetto indotto dal fitoplasma della FD nei primi stadi di infezione, permettendo quindi la dissezione dell'interazione pianta-patogeno-vettore a livello molecolare. In Chardonnay, a tre giorni dall'infezione, sono avvenuti ampi cambiamenti dei trascritti in risposta all'insetto sano, mentre la risposta di difesa a *S. titanus* infetto, risultante dall'interazione tra pianta-patogeno-insetto, è apparsa molto più limitata. In particolare, la chiara attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale, osservata in risposta all'insetto sano, mediate dal calcio e dagli ormoni JA, ET ed ABA, e non è più stata osservata dopo l'infezione di FDSt. Nel complesso i dati riportati in questo lavoro indicano che nella varietà suscettibile, il fitoplasma della FD induce un'inibizione della via di difesa del JA, garantendosi in questo modo il successo nell'infezione.

Mediante RNA-Seq sono stati individuati i meccanismi che possono essere coinvolti nella suscettibilità e parziale resistenza di queste due varietà, ma non i sovrastanti caratteri genici specifici. Il primo passo per l'identificazione dei geni associati alla resistenza alla FD passa per la ricerca di QTL nelle popolazioni segreganti ottenute tramite incrocio. Le metodiche di genotipizzazione e di fenotipizzazione della popolazione derivata da Chardonnay e T. friulano sono già state definite e avviate. Una volta ottenuti, i dati genotipici e fenotipici saranno integrati in una mappa genetica per circoscrivere i tratti cromosomici contenenti i geni di interesse per la resistenza alla malattia. Questo lavoro sarà facilitato anche dall'unione di questi ultimi dati di mappa con i risultati relativi ai geni differenzialmente espressi nelle due varietà.

I risultati di queste sperimentazioni hanno già avuto delle ricadute scientifiche. Dal presente lavoro è emerso che la via di difesa mediata dal JA sembra avere un ruolo cruciale nella protezione nei confronti di sintomi di giallumi in vite. Sulla base di questa informazione è nato il progetto regionale MIDIFENDO, che prevede l'utilizzo di composti organici volatili microbici (mVOC) capaci di attivare la via di difesa del JA, con lo scopo di indurre nella vite le vie di difesa necessarie per proteggersi contro l'infezione del fitoplasma responsabile di FD.

Ringraziamenti

Si ringraziano il Dr. Paolo Bagnaresi, la Dr.ssa Elisabetta Mazzucotelli, il Dr. Davide Guerra, la Dr.ssa Antonella Zechini e il Dr. Luigi Cattivelli, del CREA - Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica, per il loro contributo nel lavoro di RNA-Seq.

Si ringraziano la Dr.ssa Manna Crespan e il Dr. Daniele Migliaro per la collaborazione nel progetto TROPICSAFE.

Si ringraziano l'Associazione Vivaisti Veronesi (Viviver), il Dr. Lorenzo Calorio e l'Az. Agr. Rigo di Alba (CN) per il loro contributo nelle attività in vigneto.

Questo lavoro è stato in parte supportato dal progetto europeo TROPICSAFE H2020 (contratto N. 727459).

LAVORI CITATI

- Bertazzon N., Bagnaresi P., Forte V., Mazzucotelli E., Filippin L., Guerra D., Zechini A., Cattivelli L., Angelini E., 2019. Grapevine comparative early transcriptomic profiling suggests that *Flavescence dorée* phytoplasma represses plant responses induced by vector feeding in susceptible varieties. *BMC Genomics*, 20, 526.
- Borgo M., Angelini E., 2002. Diffusione della flavescenza dorata della vite in Italia e relazioni con vitigni, pratiche agronomiche e materiali di propagazione. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1, 35–50.
- Boudon-Padieu E., 1996. Grapevine yellows induced by phytoplasmas. Diagnosis, epidemiology and research. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 82, 5–20.
- Chuche J., Thiéry D., 2014. Biology and ecology of the flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34, 381–403.
- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Bucklern E.S., Mitchell S.E., 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE*, 6, e19379.
- Eveillard S., Jollard C., Labroussaa F., Khalil D., Perrin M., Desqué D., Salar P., Razan F., Hevin C., Bordenave L., Foissac X., Masson J.E. Malembic-Maher S., 2016. Contrasting susceptibilities to Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*, rootstocks and wild *Vitis* species. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–12.
- Kuc J., 2006. What's old and what's new in concepts of induced systemic resistance in plants, and its application. In: Multigenic and induced systemic resistance in plants. Tuzun S, Bent E, editors. Springer New York. 9–20.
- Maixner M., Langer M., Gerhard Y., 2006. Epidemiological characteristics of *Bois noir* type I. Atti del XV Meeting ICVG, 86–7.
- Paolacci A.R., Catarcione G., Ederli L., Zadra C., Pasqualini S., Badiani M., Musetti R., Santi S., Ciaffi M., 2017. Jasmonate-mediated defence responses, unlike salicylate-mediated responses, are involved in the recovery of grapevine from *bois noir* disease. *BMC Plant Biology*, 17, 1–19.
- Pavan F., Mori N., Bressan S., Mutton P., 2012. Control strategies for grapevine phytoplasma diseases: factors influencing the profitability of replacing symptomatic plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 2012; 51:11–22.
- Schvester D., Carle P., Moutous G., 1967. Essais de sensibilité de cépages à la flavescence dorée par inoculation avec *Scaphoideus littoralis* Ball. *Ann Epiphyties*, 18, 143–50.
- Shivaji R., Camas A., Ankala A., Engelberth J., Tumlinson J.H., Williams W.P., Wilkinson J.R., Luthe D.S., 2010. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 179–91.
- Sugio A., Kingdom H.N., MacLean A.M., Grieve V.M., Hogenhout S.A., 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 1254–63.
- War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H.C., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behaviour*, 7, 1306–20.