

Effetto di elicitori sul metabolismo secondario della vite

Fabiola Matarese*, Angela Cuzzola, Giancarlo Scalabrelli, Claudio D'Onofrio

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa

Effect of elicitors on grapevine secondary metabolis

Abstract. In this work the elicitor methyl jasmonate (MeJA) was applied in a vineyard to test its ability to stimulate the production of aromas and to identify the main genes involved in the biosynthetic pathways switched-on by the elicitor. Leaves and grape clusters of cv Sangiovese were sprayed before véraison (E-L stage 34) and 5 and 10 days after the first application. During berry ripening, several samples were collected for real-time RT-PCR expression experiments of specific genes involved in aroma compound biosynthesis. At harvest, glycosylated aroma compounds were analyzed by GC-MS. The elicitor application caused a 7-10 days delay of the maturation of treated berries. At harvest, aroma analyses showed that in berries treated with MeJA there has been a significant increase in concentration of all the main classes of aromas. Among these, monoterpenes showed the most important rise. The analysis of the expression of the principal terpene synthase genes confirmed how MeJA application has activated the related biosynthetic pathway. The expression of all the genes analyzed so far, in fact, was higher in samples treated with MeJA in all sampling dates from véraison up to harvest.

Key words: aroma, gene expression, methyl jasmonate, Sangiovese.

Introduzione

Il potenziale tecnologico di un vitigno dipende dai composti derivanti dal metabolismo secondario, che determinano le caratteristiche chimiche e organolettiche delle uve e dei vini e contribuiscono alle proprietà salutistiche. Le piante producono una vasta gamma di metaboliti secondari attraverso le diverse vie biosintetiche e la loro produzione rappresenta, a volte, una risposta a stimoli esterni (Gil *et al.* 2013). L'induzione della produzione di metaboliti secondari è, infatti, un'importante risposta agli stress che può essere indot-

ta da elicitori biotici o abiotici in virtù della loro capacità di coordinare ed attivare l'espressione di numerosi geni biosintetici. I vantaggi nell'utilizzo di questi elicitori includono un aumento della resistenza a stress biotici e abiotici ed un aumento della sintesi di fenoli e aromi. Nella vite, ad esempio, è stato visto che le colture cellulari rispondono al metil-jasmonato (MeJA), un fitormone legato alla risposta agli stress, con un aumento nei livelli di aromi (D'Onofrio *et al.* 2009) o stilbeni (Vezzulli *et al.* 2007). In questo lavoro è stato valutato l'effetto del MeJA su piante in vigneto al fine di stimolare la produzione di varie classi di composti che concorrono a determinare gli aromi delle uve ed individuare i principali geni coinvolti nelle vie biosintetiche attivate dagli elicitori.

Materiali e metodi

Nel 2014 è stato testato l'uso dell'elicitore metil jasmonato (MeJA) su piante di *Vitis vinifera* L. cv Sangiovese presenti nel vigneto sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa. L'applicazione, effettuata tramite spray direttamente sui grappoli e sulle foglie, è stata effettuata per la prima volta poco prima dell'invasatura (stadio Eichorn-Lorenz, EL 34) ed è stata ripetuta due volte a distanza di 5 e 10 giorni. Nel corso della maturazione sono stati prelevati campioni di acini da piante controllo e trattate. Gli acini prelevati sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e stoccati a -80°C per l'estrazione dell'RNA. L'estrazione dell'RNA totale, la sintesi del cDNA e l'analisi dell'espressione genica relativa tramite real-time RT-PCR sono state effettuate seguendo il protocollo riportato da Matarese *et al.* (2013). A vendemmia, quando cioè entrambe le tesi hanno raggiunto un grado zuccherino di circa 20° Brix, sono state eseguite anche l'estrazione e l'analisi degli aromi seguendo il metodo riportato in D'Onofrio *et al.* (2012).

Risultati e discussioni

L'applicazione dell'elicitore ha provocato un rallentamento dell'invasatura rispetto al controllo ed un

* fabiola.matarese@for.unipi.it

conseguente ritardo di 7 giorni nel raggiungimento della maturazione tecnologica, passando dal 15 al 23 Ottobre, quando è stato raggiunto un contenuto in solidi solubili di circa 20° Brix. Non sono state riscontrate differenze ($P>0.05$) tra le tesi nei valori di pH ed acidità totale dei campioni delle rispettive date di vendemmia.

L'analisi degli aromi glicosilati ha evidenziato che, nelle uve trattate con MeJA, la concentrazione di aromi totali è stata circa il doppio (17.5 µg/acino) rispetto al controllo (8.2 µg/acino): questo significativo aumento di concentrazione ha coinvolto la maggior parte delle classi di aromi (fig. 1). Tra queste, i monoterpeni hanno mostrato l'incremento più rilevante (+322%). Il risultato concorda con quanto riportato in lavori precedenti su piante (Gomez-Plaza *et al.* 2012) e colture cellulari (D'Onofrio *et al.* 2009) di vite. Solo i fenoli volatili e i C_{13} -norisoprenoidi non sembrano essere stati influenzati positivamente dal trattamento.

I monoterpeni maggiormente stimolati dal MeJA sono alcuni derivati del linalolo (ossidi piranici e furanici, hotrienolo, diolo 1 e 2) con un incremento fino oltre il 5000% rispetto al controllo. Anche α -terpineolo (+649%), linalolo (+500%) e geraniolo (+95%) sono risultati molto più concentrati negli acini trattati.

L'analisi dell'espressione delle principali terpene sintasi ha confermato come l'applicazione dell'elicitore abbia attivato la relativa via biosintetica.

L'espressione di tutti i geni analizzati è risultata superiore nei campioni trattati con MeJA in tutte le date di prelievo dall'invaiaura (E-L 35) a vendemmia (E-L 38). Tra le linalolo sintasi, *VvPNLinNer1* si è confermata la più espressa negli acini dopo l'invaiaura (Matarese *et al.* 2013) ed è quella più influenzata dal MeJA (fig. 2). Anche la geraniolo sintasi (*VvPNGer*) e la α -terpineolo sintasi (*VvTer*) hanno mostrato un con-

siderevole aumento di espressione. L'incremento maggiore per tutti questi geni è stato rilevato nel primo campione dopo l'ultimo trattamento (stadio E-L 35) (fig. 2). Per quanto riguarda i geni del catabolismo dei carotenoidi (*carotenoid cleavage dioxygenases*, *CCD*), precursori dei C_{13} -norisoprenoidi, non sono state riscontrate differenze nell'espressione di *VvCCD1* e *VvCCD4a* tra acini trattati e controllo.

Conclusioni

I risultati mostrano che il metil jasmonato ha incrementato significativamente la maggior parte delle principali classi di aromi. L'effetto positivo del trattamento indica che potrebbe essere considerato uno strumento per migliorare la qualità delle uve.

Bibliografia

- D'ONOFRIO C., BEZZO G., DE LORENZIS G., EBERLE D., FILIPPETTI I., SCALABRELLI G., DI STEFANO R., 2012. *Effetto della defogliazione sulla componente aromatica delle uve*. Italus Hortus, 3: 108-114.
- D'ONOFRIO C., COX A., DAVIES C., BOSS P., 2009. *Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates*. Functional Plant Biology, 36: 323-338.
- GIL M., BOTTINI R., BERLI F., PONTIN M., SILVA M.F. AND PICCOLI P. 2013. *Volatile organic compounds characterized from grapevine (Vitis vinifera L. cv. Malbec) berries increase at pre-harvest and in response to UV-B radiation*. Phytochemistry, 96: 148-157.
- GÓMEZ-PLAZA E., MESTRE-ORTUÑO L., RUIZ-GARCÍA Y., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ J.I., LÓPEZ-ROCA J.M., 2012. *Effect of benzothiadiazole and methyl jasmonate on the volatile compound composition of Vitis vinifera L. Monastrell grapes and wines*. Am. J. Enol. Vitic., 63: 394-401.
- MATARESE F., SCALABRELLI G., D'ONOFRIO C., 2013. *Analysis of the expression of terpene synthase genes in relation to aroma content in two aromatic Vitis vinifera varieties*. Functional Plant Biology, 40: 552-565.
- VEZZULLI S., CIVARDI S., FERRARI F., BAVARESCO L., 2007. *Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine*. Am. J. Enol. Vitic., 58: 530-533.

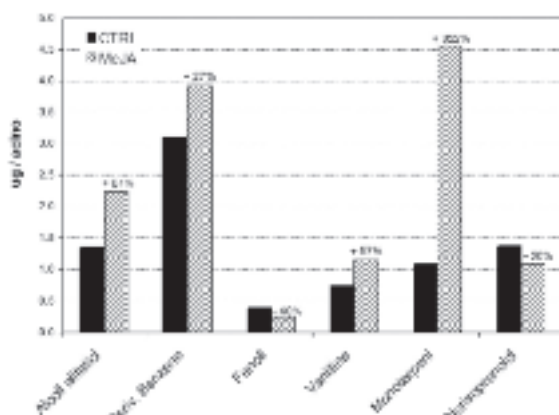


Fig. 1 - Concentrazioni totali delle principali classi di aromi, espresse come µg per acino, di acini trattati (MeJA) e non trattati (CTRL) raccolti a vendemmia.

Fig. 1 - Total concentrations (µg per berry) of the main classes of aroma in berries, treated with the elicitor (MeJA) or not (CTRL) and picked at harvest.

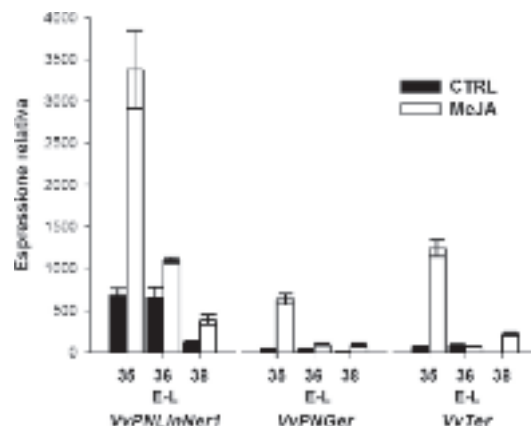


Fig. 2 - Espressione genica relativa di linalolo (*VvPNLinNer1*), geraniolo (*VvPNGer*) e α -terpineolo (*VvTer*) sintasi in acini raccolti in tre diversi stadi fenologici (E-L).

Fig. 2 - Relative expression pattern of linalol (*VvPNLinNer1*), geraniol (*VvPNGer*) and α -terpineol (*VvTer*) synthase in berries at different phenological stages (E-L).