

Sommario

INTRODUZIONE	4
LA VITE.....	4
DESCRIZIONE DELLA PIANTA.....	4
LA BACCA.....	5
LA MATURAZIONE DELLA BACCA: ASPETTI FISIOLGICI, BIOCHIMICI E MOLECOLARI	6
L'APPASSIMENTO	11
IL PROCESSO.....	11
ASPETTI BIOCHIMICI	11
MODIFICAZIONI DELLA PARETE CELLULARE DURANTE LO SVILUPPO DELLA BACCA	13
ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA DIFFERENZIALE	14
L'ANALISI MICROARRAY.....	14
TECNOLOGIE MICROARRAY	15
MATERIALI E METODI.....	16
Materiale vegetale relativo all'analisi Microarray	16
Estrazione dell'RNA totale mediante il metodo (modificato) del perclorato di sodio	16
Elettroforesi dell'RNA totale su gel di agarosio	17
Quantificazione dell'RNA totale	18
Preparazione dell'RNA, ibridazione del microarray ed analisi dei dati	18
Il "Grape array 1.2"	18
Determinazione della qualità dell'RNA.....	19
Protocollo di ibridazione ed acquisizione delle immagini.....	20
Assemblaggio del CustomArray™ 90K	20
Preparazione per l'ibridazione.....	22
Pre-ibridazione	22
Frammentazione dell'RNA.....	23
Ibridazione.....	24
Lavaggio del chip ibridato	24
Lavaggio finale	25
Acquisizione delle immagini del CUSTOMARRAY™90K.....	25
Analisi di Real-time RT PCR.....	26
Eliminazione del DNA	26
Real Time RT-PCR	27
Primers	28

Primers utilizzati nelle reazioni di Real time RT PCR.....	28
Preparazione della reazione di PCR	29
Esecuzione e monitoraggio della reazione	30
Acquisizione dei dati.....	30
Analisi e rappresentazione dei dati	30
Analisi dei risultati	31
SCOPO	32
RISULTATI	33
Caratterizzazione di famiglie geniche coinvolte nel metabolismo di parete e trasporto dell'acqua nel genoma di <i>Vitis vinifera</i> cv CORVINA.....	33
Pectinmetilesterasi	33
Poligalatturonasi.....	35
.....	36
Pectato liasi	36
Xiloglucano endotransglicosilasi.....	38
Acquaporine	39
Chitinasi.....	40
Cellulasi (endo-(1-4)- β -glucanasi).....	42
Cellulosa sintasi	43
Invertasi.....	44
Analisi di espressione delle famiglie geniche durante la maturazione e l'appassimento	46
Pectinmetilesterasi in vite	48
Poligalatturonasi in vite	52
Pectato liasi in vite.....	54
Xiloglucano endotransglicosilasi.....	56
Acquaporine in vite	58
Chitinasi in vite	60
Cellulasi (endo-(1-4)- β -glucanasi) in vite	63
Cellulosa sintasi in vite	65
Invertasi in vite	67
Conclusioni	70
Espansine in vite.....	75
Conclusioni	84
BIBLIOGRAFIA.....	103

INTRODUZIONE

LA VITE

Al genere *Vitis* appartengono specie diverse, tra cui la vite europea (*Vitis vinifera*), la vite dell'America settentrionale (*Vitis berlanderi*, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia*) e la vite dell'Asia orientale (*Vitis amurensis*). A sua volta il genere *Vitis* è incluso nella sottofamiglia delle *Ampelidae*, detta anche *Vitoideae*, che fanno capo alla famiglia delle *Vitaceae*, contenuta nell'ordine delle *Rhamnales*. In Italia per la produzione di vino possono essere usate solo uve appartenenti alla specie *V. vinifera*. La vite americana riveste tuttavia un ruolo importante in vigneto, dal momento che fa da porta innesto per la vite europea, in maniera diretta o attraverso gli ibridi. In questo modo la vite europea diventa resistente all'attacco di alcuni parassiti, dal momento che le radici delle viti americane ne sono resistenti. In particolare *Vitis berlanderi*, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* usate come porta innesto per *Vitis vinifera* costituiscono una forte difesa contro la fillossera (Mullins et al., 1992).

DESCRIZIONE DELLA PIANTA

La vite è una pianta poliennale arborea, ha radici fittonate con numerose ramificazioni laterali e fusto che normalmente non raggiunge quasi mai grandi dimensioni. Essa è una pianta rampicante che per crescere si attacca a dei sostegni (tutori) mediante i viticci. Il fusto è suddiviso nel ceppo (pochi decimetri immediatamente sopra il suolo), nelle branche (le prime ramificazioni che si dipartono dal fusto) e nei tralci che sono i rami di uno o due anni. Le foglie, dette pampini, palminervie, alterne sono semplici e costituite da cinque lobi principali più o meno tagliati con forma di cuore alla base. I fiori sono molto piccoli, di colore verdastro e raggruppati in infiorescenze a racemo. La vite selvatica è dioica (cioè con fiori unisessuali portati da individui diversi), le varietà coltivate sono state selezionate per portare fiori ermafroditi. I fiori hanno calice e corolla entrambi di 5 pezzi. I petali della corolla sono saldati in alto. Il gineceo è formato da 2 carpelli e porta 4 ovuli. Gli stami sono 5 alternati ai nettari. I frutti sono delle bacche (acini) di forma e colore variabile: bianchi, gialli, viola o neri, raggruppati in grappoli. Presentano un esocarpo spesso pruinoso (buccia), un mesocarpo con cellule piene di succo da cui si ricava il mosto (polpa) ed un endocarpo formato da uno strato di cellule che delimita le logge contenenti i semi (vinaccioli).

La pianta della vite (Figura 1) ha un ciclo biologico della durata di circa 40 anni; per i primi tre anni la pianta non è produttiva; il periodo migliore per la produzione va' dal quinto al venticinquesimo anno del ciclo.

L'apparato radicale della pianta può raggiungere i 5-6 metri di profondità. L'apparato epigeo della vite è invece formato da una serie di organi quali: pedale (regione basale del fusto), tronco (regione mediana del fusto), branche (rami di più anni che si originano dal fusto), tralci (rami di un anno che si originano dalle branche) e germogli (rami erbacei dell'annata in corso) (Mullins et al., 1992).



Figura 1. Pianta di vite con frutti

La morfologia della foglia di vite è molto semplice e presenta forme diverse a seconda della varietà; le foglie hanno dimensioni che variano da meno di 7cm a più di 27cm e sono alterne, vale a dire che è presente solo una foglia per nodo con un punto di inserzione alternante destra/sinistra. La pagina superiore è glabra e priva di stomi, ad eccezione delle nervature principali.

Le gemme della vite si trovano in posizione laterale rispetto all'asse del germoglio, sono inserite in corrispondenza di ogni nodo all'ascella della rispettiva foglia e si distinguono in pronte e dormienti. Le gemme pronte si formano in primavera-estate ai nodi dei germogli ed hanno origine a partire da un ramo anticipato detto femminella, che possiede un breve ciclo di vita. Le gemme dormienti si formano invece alla base delle gemme pronte, circa dieci giorni dopo di esse, ed hanno un ciclo vitale più lungo (365 giorni) in quanto schiudono l'anno successivo a quello della loro formazione, svernando protette da apposite perule. Con il processo di agostamento, i germogli prodotti dalle gemme dormienti lignificano.

I fiori della vite sono riuniti in una infiorescenza detta grappolo, inserita sul nodo in posizione opposta alla foglia. Il singolo fiore di vite si compone di un ricettacolo, un disco nettario (5 ghiandole alla base dell'ovario), un calice gamosepalo (sepalii concresciuti), una corolla gamopetala detta caliptra, un androceo e un gineceo. La sessualità della vite appare molto complessa in quanto sulla stessa pianta si possono trovare differenti tipi di fiori. La vite europea porta principalmente fiori ermafroditi e le piante sono generalmente autocompatibili (Mullins et al., 1992).

LA BACCA

Il singolo frutto della vite (acino) è una bacca (Figura 2). Essa si compone nella parte esterna di un esocarpo, ossia la buccia vera e propria, che a sua volta è formato da un'epidermide cutinizzata dotata di stomi che perdono funzionalità nel corso della maturazione. Sull'epidermide si forma la pruina, un estere di un alcol a lunga catena, che conferisce all'acino un aspetto vellutato, influisce sul colore del grappolo e impedisce l'evaporazione dell'acqua. Più internamente si trova il mesocarpo, la polpa dell'acino, che può essere a sua volta distinto in tre regioni concentriche: una esterna, una mediana e una interna. Questa ipotetica suddivisione viene fatta sulla base della distribuzione non omogenea di zuccheri e acidi. La regione della polpa più ricca in zuccheri è quella centrale, mentre la concentrazione degli acidi diminuisce passando dall'interno verso l'esterno. L'endocarpo invece è la regione carnosa più interna in cui sono contenuti i vinaccioli. Se si stacca la bacca dal pedicello, si osserva che a quest'ultimo resta adeso un gruppo di fasci vascolari, detto pennello. Questi fasci alimentano i vinaccioli, originando ramificazioni funicolari. I vinaccioli sono fondamentali per l'accrescimento della bacca, in quanto secernono ormoni di crescita in grado di diffondere verso la

polpa e verso la buccia. Bacche con un ridotto numero di vinaccioli, infatti, raggiungono normalmente dimensioni finali molto ridotte.

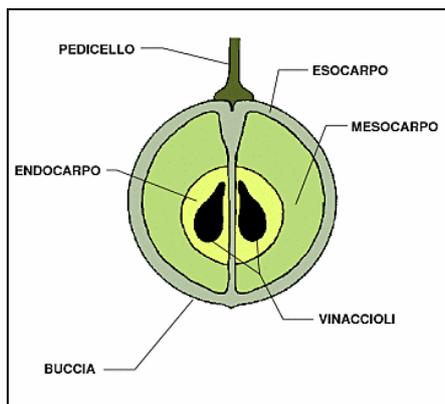


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'acino

LA MATURAZIONE DELLA BACCA: ASPETTI FISIOLGICI, BIOCHIMICI E MOLECOLARI

La maturazione è quel processo fisiologico tramite il quale cellule, organi ed apparati degli organismi viventi completano il differenziamento morfologico e assumono la piena capacità di svolgere le funzioni alle quali sono adibiti.

Nel caso dei frutti carnosi, il fenomeno più appariscente della maturazione è l'aumento di volume. Le cellule carpellari, che nelle prime fasi di sviluppo sono ricche di citoplasma denso, si vacuolizzano arricchendosi così di sostanze diverse (zuccheri e grassi) fino a raggiungere la composizione propria di ogni frutto. Varia anche la composizione dei pigmenti presenti nei tessuti più esterni: tipicamente si verifica la scomparsa della clorofilla e la comparsa di carotenoidi e/o di antociani che impartiscono ai frutti la loro colorazione. Sono note anche variazioni nell'attività respiratoria, che in alcuni frutti, detti climaterici, decresce fino a raggiungere un minimo, seguito poi da un brusco innalzamento in corrispondenza della fase di maturazione. Questo fenomeno, associato ad un aumento della produzione di etilene, non è presente nei frutti non climaterici, per i quali l'attività respiratoria decresce fino alla senescenza e l'ormone è presente a livelli basali per tutta la durata della maturazione.

L'uva è un frutto non-climaterico: la sua maturazione rappresenta la fase finale dello sviluppo fiorale che procede a partire dall'impollinazione e non coincide con brusche variazioni dell'attività respiratoria. Sebbene l'uva sia classificata come frutto non climaterico, gli studi sull'influenza dell'etilene sull'uva suggeriscono un suo ruolo nella maturazione; è stato osservato infatti un incremento nella produzione endogena di etilene immediatamente prima dell'invasatura. È chiaro inoltre che la vite possiede un "network funzionale" di segnalazione dell'etilene e che almeno una parte di esso è necessaria per la maturazione (Chervin et al., 2004).

Lo sviluppo della bacca d'uva consiste di due fasi di crescita sigmoidali: la prima è denominata "fase erbacea" mentre la seconda è detta "fase di maturazione" (Figura 3) (Coombe et al., 2000).

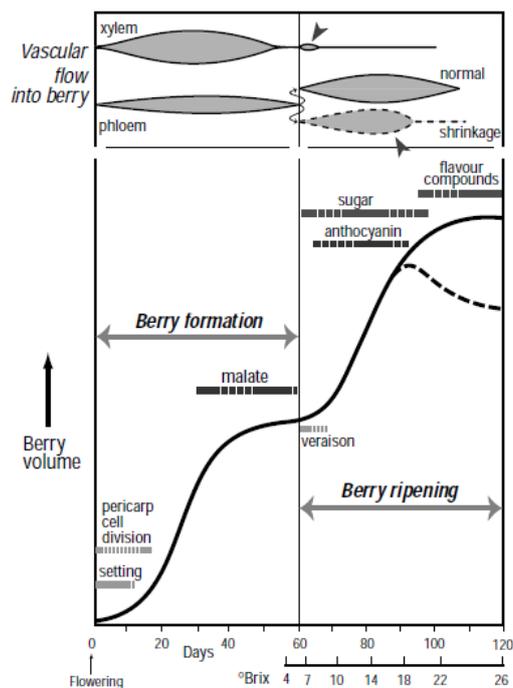


Figura 3. Descrizione dello sviluppo della bacca

Tra i composti di natura fenolica, gli acidi idrossicinnamici si accumulano durante il primo periodo di crescita sia nella polpa sia nella buccia e sono molto importanti per il loro coinvolgimento nelle reazioni di imbrunimento del vino (Licker et al., 1999).

In questa fase si accumulano anche i tannini (che derivano principalmente dalla polimerizzazione dei flavanoli) che sono presenti prevalentemente nella buccia e nei semi ma sono quasi assenti nella polpa (Kennedy et al., 2001; Kennedy et al., 1995). Essi hanno la capacità di legarsi alle proteine formando complessi fioccosi che inglobano le particelle sospese e lasciano il liquido limpido, svolgendo così l'importante funzione di chiarificanti nel vino. Essi inoltre conferiscono al vino sentori amari e ne influenzano corpo ed astringenza.

In questa fase vengono accumulati anche minerali, aminoacidi (Stines et al., 2000) ed alcuni composti dell'aroma (Allen et al., 1989; Allen et al., 1999).

La fase erbacea è seguita dall'invaiaitura, che segna il passaggio alla fase di maturazione, durante la quale la bacca va incontro ad una serie di cambiamenti fisici e biochimici. Fra le modifiche più evidenti si osservano ad esempio il rammollimento della polpa, l'aumento del volume e il cambiamento di colore del frutto. La perdita di consistenza è associata a cambiamenti della composizione in polisaccaridi e della struttura delle pareti cellulari del mesocarpo. In particolare è stata osservata una parziale depolimerizzazione della pectina e delle molecole di xiloglucano ed il decremento della quantità di emicellulosa e cellulosa (Yakushiji et al., 2001). Con l'invaiaitura il flusso verso la bacca da xilematico diventa prevalentemente di tipo floematico (Greenspan et al., 1994) con un consistente apporto di saccarosio che viene immediatamente scisso in fruttosio e glucosio. Questi zuccheri solubili richiamano acqua all'interno delle cellule, con conseguente aumento di volume dell'acino (fino a due volte quello dell'invaiaitura). Il cambiamento di colore è invece associato alla perdita di clorofilla e, nelle uve a bacca colorata, alla sintesi di antociani che generalmente si accumulano solo nelle cellule della buccia (Watson, 2003). La presenza negli acini di antociani con

caratteristiche lievemente diverse tra loro consente di raggruppare le varietà di *V. vinifera* in famiglie simili per composizione antocianica e ciò costituisce uno strumento di classificazione chemio-tassonomica. La biosintesi degli antociani inizia con l'invasatura e continua durante l'intero periodo di maturazione. Fattori quali la varietà, la zona di coltivazione e le condizioni di crescita possono influenzare il livello di antociani ed il profilo dei diversi pigmenti.

La maggior parte dei composti prodotti durante la fase erbacea dello sviluppo rimangono fino alla raccolta ma, dato l'aumento del volume della bacca durante la fase di maturazione, la loro concentrazione si riduce drasticamente. In particolare, la diminuzione della concentrazione degli acidi (principalmente malico e tartarico) causa la diminuzione dell'acidità della bacca.

Durante la seconda fase vengono inoltre accumulate sostanze odorose e precursori di aroma che influenzano direttamente le caratteristiche del vino.

Molti sono stati i progressi fatti negli ultimi anni circa l'identificazione e la comprensione dei cambiamenti a livello molecolare che si verificano durante la maturazione dei frutti e la maggior parte delle informazioni attualmente disponibili riguardano le specie cosiddette "modello", come il pomodoro (Giovannoni, 2004).

In vite, evidenze di una relazione diretta tra la maturazione dei frutti e cambiamenti nei livelli di alcuni mRNA sono state portate da Boss et al., (1996) i quali hanno mostrato che l'accumulo di trascritti di geni coinvolti nella via biosintetica dei flavonoidi (PAL, fenilalanina ammonio liasi; CHS, calcione sintasi; CHI, calcione isomerasi; F3H, flavanone-3-idrossilasi; DFR, diidroflavonolo-4-reduttasi; LDOX, leucoantocianidina diossigenasi; UFGT, UDP glucosio-flavonoide 3-o-glucosil transferasi) è correlato con la produzione di antocianine nella buccia dell'acino maturo.

Inoltre Castellarin et al., (2007b) hanno condotto studi sul controllo trascrizionale, durante la maturazione, sei geni strutturali per la biosintesi delle antocianine (*FRH*, *F3'H*, *F3'5'H*, *UFGT* ed *OMT*) e di quattro fattori di trascrizione (*MybA*, *MybB*, *MybC*, *MybD*) in funzione della cultivar.

Un altro studio di Castellarin et al., (2007a) ha preso in esame la regolazione dei geni per la sintesi delle antocianine in bacche di vite durante la maturazione, in condizioni di deficit idrico.

Bogs et al., (2007) hanno condotto la caratterizzazione molecolare di un fattore di trascrizione di tipo MYB di vite: *VvMYBPA1*. Esso controlla l'espressione dei geni della via biosintetica delle protoantocianidine (PA), compresi i geni *LAR* ed *ANR* ma non è in grado di attivare il promotore del gene *VvUFGT*, che codifica l'enzima UDP-glucosio:flavonoide-3-O-glucosyltransferase, specifico della via delle antocianine, indicando che *VvMYBPA1* è specifico per la regolazione della biosintesi delle PA.

Recentemente anche il fattore di trascrizione *VvMYBPA2* (avente elevata omologia con altri fattori di trascrizione di tipo MYB vegetali) è stato riconosciuto essere coinvolto nella regolazione dell'espressione dei geni per la biosintesi delle PA (Terrier et al., 2009) seppur con una localizzazione dell'espressione differente rispetto a *VvMYBPA1*.

Deluc et al., (2008) hanno clonato e caratterizzato il gene codificante per il fattore di trascrizione *VvMYB5b*. Quest'ultimo mostra una significativa similarità con *VvMYB5a*, altro fattore di trascrizione di tipo MYB, che è stato dimostrato essere in grado di regolare la sintesi dei flavonoidi in vite (Deluc et al., 2006). Come *VvMYB5a*, anche *VvMYB5b* attiva i promotori di numerosi geni strutturali della via dei flavonoidi.

Infine i risultati di Kobayashi et al., (2002) suggeriscono fortemente che, in vite, i geni *MybA* siano coinvolti nella regolazione della biosintesi delle antocianine per mezzo del controllo sull'espressione del gene *UFGT*.

Davies et al., (2000) hanno utilizzato un approccio differenziale per isolare, da librerie a cDNA di bacca, alcuni cDNA di *Vitis vinifera* associati alla maturazione. Essi hanno riscontrato, all'inizio della maturazione, un rapido incremento nei livelli di mRNA corrispondenti a tutta una serie di cDNA non presenti nel frutto immaturo. I putativi prodotti della traduzione di alcuni di questi cloni hanno, in altre specie, omologhi coinvolti nella struttura della parete cellulare e nella risposta a stress.

In uno studio, Ablett et al., (2000) hanno costruito delle librerie di EST a partire da diversi organi della vite, tra cui la foglia e la bacca. L'analisi delle EST ha permesso di riscontrare una piccola percentuale di omologia con proteine note di vite ed una elevata percentuale di omologia con proteine vegetali note appartenenti ad altre specie. Tra le EST di bacca con riconosciuta omologia, le classi funzionali che risultano più rappresentate sono quella i cui geni sono coinvolti nello sviluppo e nella struttura cellulare (15%), quella che raggruppa i geni coinvolti nella sintesi e nel processing delle proteine (24%) e quella i cui geni regolano la risposta di difesa e di resistenza alle malattie (18%). Nella prima delle classi citate, si possono segnalare i geni associati al metabolismo dei costituenti della parete cellulare (cellulosa, pectina, polisaccaridi, proteine di parete), la quale, nel corso dello sviluppo, subisce variazioni che portano al rammollimento associato alla maturazione. Si pensa che in questi processi, come è già stato dimostrato in pomodoro, siano coinvolti enzimi quali le endopoligalatturonasi (PG) e le pectin-metilesterasi (PME) (Nunan et al., 1998).

Per far luce sui meccanismi molecolari che presiedono al processo di maturazione nell'uva, mediante l'utilizzo dei dati di EST disponibili per la vite, è stata condotta un'analisi comparativa interspecifica con i geni noti in pomodoro. Ciò ha portato all'identificazione di fattori di trascrizione comuni non precedentemente associati alla maturazione (Giovannoni, 2004).

Analisi di trascrittomica sul larga scala, riguardanti lo sviluppo e la maturazione della bacca di *Vitis vinifera* sono state condotte, più recentemente, utilizzando la tecnica degli array.

Pilati et al., (2007) hanno utilizzato l'Affymetrix *Vitis* GeneChip per studiare l'espressione genica in bacche campionate prima e dopo l'invasatura in tre annate produttive. La loro analisi ha permesso di individuare un set di geni modulati in maniera simile durante la tre annate considerate e ha messo in luce un "burst" ossidativo, mai precedentemente osservato in vite, caratterizzato da un rapido accumulo di H_2O_2 a partire dall'invasatura e dalla modulazione di diversi enzimi "ROS scavenging". In particolare, hanno potuto distinguere una fase di ri-programmazione del metabolismo cellulare prima dell'invasatura ed una fase, dopo l'invasatura, caratterizzata dall'attivazione di un metabolismo "ripening specialized", responsabile dei tratti fenotipici della bacca matura.

Lo studio condotto da Deluc et al., (2007) su bacche di *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon prelevate a sette stadi di sviluppo fino alla completa maturazione, utilizzando il microarray Affymetrix *Vitis* GeneChip (14,470 Unigenes) ha rivelato che i tessuti del frutto esprimevano il 74,5% dei probe presenti sul chip: il 60% di questi risultava modulato in almeno due dei sette stadi di sviluppo considerati, rivelando così la natura altamente dinamica dei processi di sviluppo e maturazione.

Questi risultati sono in profondo accordo con quelli ottenuti da Grimplet et al., (2007) i quali, utilizzando lo stesso chip, hanno studiato i profili di espressione nei tre diversi tessuti che compongono la bacca (buccia, polpa e vinaccioli) della cultivar Cabernet Sauvignon. Essi hanno

mostrato le differenze nelle classi dei composti modulati nei tre tessuti, correlando tali differenze con il ruolo biologico attribuito a ciascuno, valutando, inoltre, i cambiamenti nella composizione di tali composti in risposta a stress idrico della pianta.

L'analisi dei profili di espressione in nove stadi di sviluppo condotta da Terrier et al., (2005) ha rivelato i numerosi cambiamenti nell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo primario e secondario durante la maturazione. In particolare Terrier et al., (2005) hanno ipotizzato il possibile ruolo di diversi ormoni sul controllo dei fattori di trascrizione.

L'analisi cDNA microarray condotta da Waters et al., (2005) su bacche di *V.vinifera* cv Shiraz ha permesso di individuare alcuni set di geni con profili di espressione specifici e simili tra loro nel corso dello sviluppo del frutto. Essi hanno potuto rilevare l'espressione coordinata di diverse categorie di cDNA, in particolare per quei geni aventi un ruolo nella fotosintesi, nella biosintesi dei flavonoidi e per quelli codificanti per proteine di parete.

Uno dei cambiamenti più significativi nelle bacche è l'incremento dell'attività dell'enzima ADH (alcohol dehydrogenase) all'inizio della maturazione, così come dei livelli trascrizionali del gene *VvADH2*.

Tra i geni che appaiono maggiormente espressi (circa il 19%) nelle bacche mature vi sono anche quelli codificanti prodotti appartenenti alla categoria funzionale delle proteine di difesa e di risposta agli stress.

Le proteine PR (Pathogenesis-Related) come le proteine TL (Thaumatococcus-like), le chitinasi, la β -1,3-glucanasi ed una proteina isoflavone-reduttasi-simile (coinvolta probabilmente nella biosintesi di fitoalessine) sono state riconosciute come proteine molto abbondanti nella bacca in fase di maturazione.

Durante la maturazione, oltre a composti determinanti l'aroma e il colore della bacca, vengono prodotte anche sostanze molto importanti per la difesa del frutto, tra cui una delle più note è il resveratrolo (*trans*-3,4,5 triidrossistilbene). Questa sostanza è un derivato fenolico appartenente alla classe delle fitoalessine che possono essere definite come sostanze anti-microbiche non specifiche a basso peso molecolare e lipofile. Esse vengono sintetizzate e accumulate nella pianta in risposta a elicitori biotici e abiotici (Smith, 1996; Langcake and Pryce, 1976; Langcake and Pryce, 1977) ed è stato ipotizzato che esse vengano sintetizzate all'interno di vescicole lipidiche e successivamente trasportate al sito di infezione dove bloccano la crescita del patogeno.

Il resveratrolo si trova in quantità apprezzabili in poche specie vegetali e grande interesse ha suscitato il fatto che si trovi nell'uva e nei suoi derivati, alla luce delle proprietà benefiche nei confronti della salute umana ad esso attribuite. Il resveratrolo, infatti, appare dotato di potente attività antiossidante, antitumorale, cardioprotettiva e possiede anche altre proprietà terapeutiche tra cui attività anti-ipertensiva, ipocolesterolemizzante e ipolipidemizzante, immunostimolante e di protezione della mucosa gastrica (Fremont, 2000; Bruno et al., 2003).

Grazie al contenuto nel vino di sostanze antiossidanti, tra cui il resveratrolo, è stato possibile associare al consumo quotidiano della bevanda, una minor incidenza di malattie cardiovascolari. Il resveratrolo e tutte le sostanze biochimicamente correlate vengono sintetizzate attraverso il metabolismo dei fenilpropanoidi, grazie all'azione dell'enzima stilbene sintasi (STS).

I livelli di trascrizione di STS appaiono correlati con il contenuto di resveratrolo nella buccia nel corso della maturazione (Versari et al., 2001; Bais et al., 2000).

L'APPASSIMENTO

IL PROCESSO

La surmaturazione è definita come il periodo che segue la maturazione propriamente detta e durante il quale l'uva è soggetta a trasformazioni di natura fisica, chimica, biochimica e biologica che modificano profondamente la sua composizione, influenzando in maniera decisiva le caratteristiche dei vini che ne derivano. Da sempre l'appassimento è utilizzato sia per la conservazione da consumo diretto sia per la produzione di vini liquorosi o passiti. Anche l'enologia italiana vanta numerosi vini di questo tipo, infatti ciascuna regione a vocazione viti-vinicola annovera tra i suoi prodotti di maggior pregio almeno un vino ottenuto da uve surmature. Per quanto riguarda il Veneto, spiccano il Recioto e l'Amarone della Valpolicella, ottenuti da uve che vengono sottoposte, dopo la raccolta, ad appassimento naturale su graticci posti in locali denominati fruttai, spesso ricavati all'interno di costruzioni rurali. Per una buona riuscita del processo di appassimento, è molto importante che questi locali siano ben arieggiati.

In genere il periodo di appassimento della uve varia tra 80 e 100 giorni e l'aspetto più evidente è la loro disidratazione ed il calo ponderale corrispondente, che di solito varia intorno al 30%.

Contemporaneamente si verifica un incremento della concentrazione di zuccheri, parametro (misurato in gradi Brix) molto importante per l'ottenimento di un vino ad elevate caratteristiche qualitative.

Molti sono i fattori che concorrono a determinare un buon andamento del processo di surmaturazione. Innanzitutto è necessario porre molta cura nella selezione dei grappoli al momento della raccolta, i quali devono poi essere disposti in un singolo strato nelle cassette e collocati nei fruttai. Durante l'appassimento vanno fatte verifiche periodiche circa lo stato di salute delle uve, in particolare in concomitanza di condizioni climatiche particolarmente sfavorevoli (precipitazioni ed umidità relative elevate, mancanza di vento, etc.); se si ritiene opportuno, si può procedere con un'ulteriore cernita, scartando i grappoli e gli acini che risultano visibilmente deteriorati.

ASPETTI BIOCHIMICI

La surmaturazione, oltre ad un fenomeno fisico di disidratazione, comporta anche cambiamenti biochimici, nei quali sono coinvolti una serie di composti (zuccheri, acidi organici, polialcoli, fenoli, etc.) che modificano il contenuto dell'acino dall'inizio alla fine di questo periodo.

L'acino, una volta raggiunta la maturazione, sia che permanga in pianta sia che venga raccolto, continua per un certo periodo la sua attività enzimatica, con conseguenti modificazioni del succo, non influenzate dagli apporti della pianta stessa.

Tra i composti maggiormente soggetti a fenomeni metabolici nel periodo di surmaturazione vi sono gli zuccheri; in particolare, un catabolismo maggiore a carico del glucosio rispetto al fruttosio comporta un passaggio del rapporto glucosio/fruttosio da un valore di 0,9-1,0 durante la maturazione ad un valore di 0,7-0,8 in seguito alla surmaturazione. La causa della variazione di tale rapporto potrebbe risiedere nella conversione enzimatica del glucosio a fruttosio con sorbitolo come intermediario, oppure in una metabolizzazione del glucosio nel ciclo dei pentosi. La modificazione di questo rapporto riveste una notevole importanza nella preparazione dei vini dolci, in quanto il fruttosio possiede un potere edulcorante due volte maggiore rispetto a quello del glucosio.

Nel corso della surmaturazione si assiste anche a forti modificazioni degli acidi organici, tra cui l'acido malico, che subisce un forte calo dovuto, probabilmente, al suo utilizzo come substrato nella respirazione cellulare.

Da un confronto tra l'evoluzione dell'acido malico in fruttai e in cella a 30°C, è stato osservato (Amati et al., 1983) come in entrambi i casi si assista ad un decremento di tale acido, che però risulta più intenso nel caso di uva posta in cella, come risultato di attivi fenomeni metabolici accentuati a quelle determinate temperature.

L'acido tartarico, che sembra possa formarsi a partire da zuccheri e da acido ascorbico, non subisce invece consistenti variazioni nel corso dell'appassimento e l'aumento del suo contenuto, che normalmente si registra, è dovuto solamente ad effetti di concentrazione del succo dell'acino.

Oggetto di forte catabolismo sono anche altri acidi minori, tra cui l'acido citrico, ascorbico e ossalico. Studi condotti in Valpolicella hanno evidenziato come l'acidità totale dei mosti ottenuti da uve fresche e surmaturate sia paragonabile, ma se si considera il fattore di concentrazione, l'acidità totale diminuisce anche del 36% (Amati et al., 1983).

Normalmente, la somma degli acidi malico e tartarico aumenta durante la surmaturazione, nonostante notevoli fenomeni respiratori, per effetto della concentrazione. In particolare in appassimenti effettuati in fruttai, il fenomeno è più evidente, grazie anche al contributo dato dall'acido malico, mentre è meno marcato l'effetto concentrativo osservato in cella riscaldata, dove i fenomeni respiratori a carico di questo acido influiscono maggiormente.

Anche il contenuto di sostanze polifenoli che dell'uva mostra un'evoluzione nel corso della surmaturazione. Se si esclude l'effetto di concentrazione dovuto alla disidratazione, si assiste ad una loro diminuzione, dovuta probabilmente a fenomeni di ossidazione. Inoltre, l'estraibilità di questi composti tende ad aumentare a causa della degenerazione a cui vanno incontro le cellule dei tessuti della bacca, favorita dalla temperatura e dalla durata del processo.

Contemporaneamente, l'attività polifenolossidasi causata dall'enzima tirosinasi, che si trova localizzato soprattutto nella buccia, comporta l'imbrunimento delle bacche e la produzione di acetaldeide. L'imbrunimento è anche favorito dalle radiazioni luminose che degradano la clorofilla eliminando la colorazione verde (tale fenomeno è avvertibile maggiormente nelle uve bianche, rispetto a quelle rosse). Nel corso dell'appassimento si registra inoltre un aumento del grado di polimerizzazione dei tannini.

Le sostanze pectiche subiscono in fase di surmaturazione un aumento della loro frazione solubile, mentre le protopectine diminuiscono. Questi fenomeni sono dovuti probabilmente all'idrolisi enzimatica, alla respirazione delle pectine e ad una ossidazione incompleta degli zuccheri e sono favoriti dalle alte temperature.

Le conoscenze da un punto di vista molecolare riguardanti l'appassimento delle uve sono piuttosto limitate, tuttavia alcuni studi si sono orientati in questa direzione. Ad esempio, Tornielli (1998) ha osservato, tramite analisi Northern blot, un consistente accumulo dell'mRNA dell'enzima STS (stilbene sintasi) responsabile della sintesi di resveratrolo durante il processo di appassimento; ciò risultato essere correlato con un maggior contenuto di resveratrolo nella buccia di uve appassite, rispetto a quello presente nello stesso tessuto alla raccolta. Questa osservazione suggerisce che le modificazioni biochimiche a cui va' incontro l'acino nel corso della surmaturazione siano, almeno in parte, controllate a livello trascrizionale.

Nelle bacche sottoposte a surmaturazione la velocità della perdita d'acqua induce l'attività degli enzimi di parete, fa aumentare la respirazione e la produzione di etilene e causa la perdita di composti volatili e cambiamenti nei livelli dei polifenoli, nel trasporto e nelle risposte allo stress (Hsiao, 1973; Bellincontro et al., 2004; Costantini et al., 2006; Rizzini et al., 2009).

Anche la disidratazione e la sua influenza sul turgore porta a sostanziali cambiamenti nella struttura e nella consistenza dei frutti, ossia all'ammorbidimento, a cambiamenti nell'architettura superficiale della cellula ed alla riduzione degli spazi intercellulari (Ramos et al., 2004).

Infine analisi molecolari dell'appassimento post raccolta effettuato in bacca mediante la tecnologia AFLP-TP hanno permesso di identificare una serie di trascritti modulati specificatamente durante la disidratazione della bacca e di descrivere in maniera globale gli eventi molecolari che sono alla base dell'appassimento post raccolta (Zamboni et al., 2008).

MODIFICAZIONI DELLA PARETE CELLULARE DURANTE LO SVILUPPO DELLA BACCA

La bacca dell'uva (*Vitis vinifera* L.) è un frutto non climaterico la cui crescita in volume segue un andamento rappresentabile da una curva a doppia sigmoide (Coombe, 1992; Boss et al., 1996). Dopo una prima fase caratterizzata da una moltiplicazione cellulare, la crescita si arresta in coincidenza dell'invaiaitura, per poi riprendere all'inizio della maturazione principalmente a seguito di una distensione cellulare.

La crescita del frutto dipende quindi sia dalla divisione, sia dall'espansione cellulare; lo sviluppo del frutto a livello cellulare è stato documentato in diverse specie, tra cui la mela (Blanpied and Wilde 1968, Steudle and Wieneke 1985, Goffinet et al., 1995), la pesca (Scorza et al., 1991, Zanchin et al., 1994), il cetriolo (Marcelis and Hofmanejer 1993), il kiwi (Hallett et al., 1992) ed il melone (Higashi et al., 1999).

Da questi studi si è evinto che il pericarpo della bacca d'uva consta di due diversi tipi di tessuti, che mostrano caratteristiche strutturali e citologiche esclusive durante lo sviluppo. Hardie et al., (1996), ad esempio, affermano che la buccia delle bacche Traminer e Sauvignon è costituita da cellule dell'epi e dell'ipoderma dalla parete spessa, contenenti plastidi, polifenoli, antocianine ed amido. Al contrario, le cellule del mesocarpo della polpa presentano pareti sottili e si impoveriscono in polifenoli man mano che procede lo sviluppo della bacca.

La parete cellulare primaria di una pianta è una struttura complessa di microfibrille di cellulosa, tenute insieme da emicellulose, ed è immersa in una matrice di polisaccaridi pectici. Nella bacca, sebbene ciascun gruppo di polisaccaridi sia presente in tutto il pericarpo, sono state osservate differenze composizionali tra i tessuti della polpa e della buccia. Doco et al., (2003) hanno notato che nella buccia e nella polpa varia la composizione degli xiloglucani, mentre Vidal et al., (2001) hanno trovato una concentrazione di ramnoglacturonani II (polisaccaridi pectici) tre volte maggiore nella buccia rispetto alla polpa.

L'espansione delle cellule richiede un'attività di "loosening" della parete cellulare primaria e la sintesi ed integrazione di nuovo materiale di parete; il "loosening" risulta dalla distruzione di legami chimici tra i componenti strutturali della parete, attraverso l'acidificazione e/o l'azione di enzimi idrolitici.

Nunan et al., (2001) hanno caratterizzato l'attività e l'espressione dell'mRNA di una serie di enzimi coinvolti nella modificazione della parete ed hanno osservato che l'espressione di α e β -galattosidasi, pectinmetil esterasi e pectato-liasi corrispondono ai cambiamenti nella composizione dei polisaccaridi pectici della parete del mesocarpo durante la maturazione della bacca.

Se si confrontano le caratteristiche fisico-chimiche di diverse varietà di uva al momento della raccolta, si può notare come cambi il livello di soluti solidi totali, la percentuale di buccia e polpa e la quantità di materiale di parete che può essere isolato (Ortega-Regules et al., 2008).

La composizione della parete può essere modulata, o essere una conseguenza, dell'azione di diversi enzimi,

tra cui poligalatturonasi, pectimetilesterasi, α e β galattosidasi, pectinliasi e cellulasi. Lo studio dell'attività enzimatica presente negli estratti proteici ottenuti dalle varietà Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Monastrell J. e Monastrell B (Ortega-Regules et al., 2008), ha mostrato che solamente le PME e le α e β galattosidasi venivano rilevate nei campioni analizzati, in accordo con Nunan et al., (2001). Poiché non è stata rilevata alcuna attività a carico delle poligalatturonasi, è stato suggerito che la solubilizzazione dei polisaccaridi pectici nella vite è attribuibile alla modificazione nella delicata struttura e nell'endoidrolisi della catena di acidi poligalatturonici. (Nunan et al, 2001).

L'attività delle PME, mediante il rilascio di siti accessibili alla successiva degradazione da parte di eso ed endo PG e pectinliasi, modificherebbe anche il pH e le proprietà di scambio cationico della parete (Ortega-Regules et al., 2008).

ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA DIFFERENZIALE

L'analisi di espressione differenziale su larga scala (Genome-wide expression analysis) consente di rivelare come i profili di espressione variano durante il differenziamento, la crescita o la risposta a particolari stress. Diverse sono le tecniche messe a punto per monitorare e quantificare i livelli di espressione di un gran numero di geni contemporaneamente.

L'ANALISI MICROARRAY

I microarray a DNA, noti anche come chip genici, sono un importante strumento delle cosiddette "nanotecnologie" e sono utili per lo studio dell'espressione genica. Sul mercato dal 1996, consentono di analizzare contemporaneamente l'attività di decine di migliaia di geni.

I chip sono formati da sonde a DNA depositate in una posizione nota su un supporto a formare una microgriglia che consente di identificarle in un modo univoco. Il supporto è normalmente rappresentato da un vetrino da microscopio. Ogni sonda è costituita da un segmento di DNA a singola elica di un gene; tutte le sonde di un DNA chip rappresentano, nel loro insieme, tutti o la maggior parte dei geni di un organismo.

I chip sfruttano l'appaiamento tra basi complementari proprio del DNA. Quando i geni sono attivamente espressi, cioè sono attivamente trascritti, nelle cellule di un dato tessuto sarà presente un elevato numero di molecole di RNA messaggero. Si estrae pertanto l'RNA dal tessuto, si converte l'mRNA nella copia più stabile a DNA (cDNA) e vi si lega un marcatore fluorescente. Si applicano infine i cDNA marcati al chip.

Quando il cDNA trova la sua sequenza di basi complementare tra le decine di migliaia di sonde depositate sul chip, vi si appaia. In quel punto del microarray si ha emissione di fluorescenza, indice dell'espressione di quel determinato gene. I chip vengono quindi analizzati con uno scanner, che

valuta il quadro di fluorescenza ed i risultati sono elaborati da un computer. Si ottiene come risposta una mappa a colori, ossia un profilo di espressione, che consente di confrontare i quadri di espressione genica in tessuti diversi o nello stesso tessuto in differenti condizioni oppure in cellule in diversi stadi di sviluppo.

Le applicazioni di queste tecnologie sono numerose, tuttavia i due gruppi principali sono le analisi su larga scala dell'espressione genica (a livello di RNA) e quelle sulle variazioni del DNA.

L'interesse principale della maggior parte degli attuali studi che utilizzano i microarray consiste nel controllo dei livelli di espressione dell'RNA, che può essere effettuato sia mediante l'utilizzo di microarray di cloni di cDNA sia mediante l'uso di microarray di oligonucleotidi di geni specifici. Nel caso di alcuni organismi le cui sequenze sono state completamente definite, come quelle del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è stato possibile effettuare l'analisi di espressione dell'intero genoma.

TECNOLOGIE MICROARRAY

L'analisi microarray è un metodo di indagine dei livelli di trascrizione di diverse migliaia di geni simultaneamente (Schena et al., 1995). Sono state sviluppate molte tecnologie, differenti per le modalità di disegno degli array, per la procedura di fabbricazione, per il disegno sperimentale (livello di espressione assoluto o relativo), per la lunghezza delle sequenze dell'oligonucleotide target, per l'analisi dell'ibridazione e dell'immagine. Le tecnologie più avanzate e più ampiamente utilizzate per studi di trascrizione genica ad elevata resa (definita come grande numero di campioni in un tempo molto ridotto) sono gli array Affymetrix® GeneChip® (Lockhart et al., 1996), Illumina® Sentrix® BeadChip (Kuhn et al., 2004) e quelli ottenuti dalla tecnologia Combimatrix (<http://www.combimatrix.com/>).

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale relativo all'analisi Microarray

I grappoli di *Vitis vinifera* cv Corvina (clone 48) utilizzati per questa analisi trascrittomica sono stati raccolti nel corso dell'annata 2006, nel vigneto dell'azienda Pasqua, situata in località Montorio (Vr), ad un'altitudine di 130 metri sopra il livello del mare, su un terreno mediamente argilloso e calcareo. Il campionamento è stato eseguito a partire dall'invasatura a distanza di circa 20 giorni l'uno dall'altro e, attraverso la fase di maturazione, fino al completo appassimento delle uve in fruttajo secondo il calendario mostrato in tabella 1.

Campionamenti	Giorni prima/dopo la maturazione
Annata	2006
Veraison; V (invasatura)	-41 d
Pre-ripening; PR (pre-maturazione)	-14 d
Ripening; R (maturazione)	0
Whithering I; WI (appassimento)	+35 d
Whithering II; WII (appassimento)	+56 d
Whithering III; WIII (appassimento)	+91 d

Tabella 1. Schema riassuntivo dei campionamenti eseguiti

Il fruttajo utilizzato per l'appassimento dei campioni è dotato di un sistema di ventilazioni forzata e si trova ad un'altitudine di circa 450 m sopra il livello del mare, dove le nebbie e l'umidità ad esse legata (che danneggerebbe il processo di appassimento) sono molto più rare. Tale fruttajo è dotato di sistemi per il controllo della temperatura (sempre inferiore a 17°C) e dell'umidità relativa (che non supera il 65%). Per ogni campionamento sono stati raccolti circa 30 grappoli, avendo cura di scegliere il grappolo basale di un germoglio posizionato circa al centro del tralcio di potatura. Nel nostro laboratorio si è proceduto ad isolare dai suddetti grappoli circa 450-500 bacche (circa 500g) in maniera omogenea da tutti i grappoli e da varie parti del grappolo. Una parte delle bacche è stata suddivisa in polpa e buccia: i due tessuti separati e la parte rimanente di bacche integre sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

Estrazione dell'RNA totale mediante il metodo (modificato) del perclorato di sodio

PROTOCOLLO

- Macinare 2 g di tessuto conservato a -80°C con pestello e mortaio in azoto liquido
- Aggiungere 20 ml di buffer di estrazione (Tabella X) e agitare rapidamente per 1 ora a temperatura ambiente

- Filtrare la miscela attraverso un apparato di separazione (siringa con Miracloth + microfibra di vetro Whatman GF/B)
- Raccogliere l'eluato e precipitare gli acidi nucleici con 2,5 volumi di etanolo 100% freddo (oppure 1 volume di isopropanolo freddo), incubare a -20°C per minimo 30 minuti per permettere la precipitazione degli acidi nucleici solubili
- Pellettare il precipitato tramite centrifugazione a 5000g per 20 minuti a 4°C e asciugare il pellet risultante sottovuoto. Risospendere in 1 ml di H₂O trattata con DEPC e trasferire in eppendorf
- Lasciare il campione in ghiaccio per circa 20 minuti. Centrifugare per 5 minuti alla massima velocità. Trasferire il surnatante in un nuovo tubo.
- Estrarre la sospensione una volta con 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1, v/v) e una con 1 volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1, v/v)
- Precipitare l'RNA aggiungendo 0,1 volumi di sodio acetato 3M e 2,5 volumi di etanolo 100% alla fase acquosa e incubare a -20°C per 30 minuti per permettere la precipitazione dell'RNA
- Pellettare l'RNA tramite centrifugazione a 7700g per 20 minuti a 4°C, eliminare il surnatante, lavare il pellet con etanolo 70%, asciugare sottovuoto e risospendere in 100 µl di H₂O trattata con DEPC
- Aggiungere 1 volume di LiCl 4M e incubare a 4°C in ghiaccio per una notte intera
- Centrifugare per 30 minuti alla massima velocità
- Conservare la sospensione di RNA a -80°C

Componente	Quantità
0,3M TrisHCl, pH 8,3	30 ml di stock 1M
2% (w/v) PEG 4000	2g
5M Na perclorato	55,5 ml di stock 9M
1% (w/v) SDS	1g
8,5% (w/v) PVPP	8,5g
1% (w/v) β-mercaptoetanol	1ml
H ₂ O	fino a 100ml

Tabella 2. Tampone di estrazione (100ml = 5 estrazioni)

Elettroforesi dell'RNA totale su gel di agarosio

Il gel viene preparato sciogliendo in un forno a microonde della polvere di agarosio puro in tampone TAE 1X (Tabella 3). La percentuale in peso di agarosio nel gel determina l'intervallo di separazione delle molecole; in questo caso si è utilizzato un gel all'1%, che consente di separare frammenti da 10 a 0,1 kb. Prima che il gel venga versato nella vaschetta si aggiunge una determinata quantità di SYBR® Safe 10000X; si tratta di un colorante per gli acidi nucleici, che emette fluorescenza quando viene

eccitato con luce ultravioletta e con luce visibile. Al campione viene aggiunta anche una determinata quantità di buffer GLB 6X (RNase free) (Tabella 4) che ha la funzione di appesantire il campione durante il caricamento facendolo precipitare sul fondo del pozzetto, e di visualizzare l'andamento della corsa data la presenza del colorante xilene-cianolo. Per poter identificare le bande date dai campioni, viene caricato anche un marcatore di peso molecolare. La corsa viene effettuata applicando un voltaggio costante tra gli elettrodi di 100 volt per circa 15 minuti. Questa corsa viene effettuata per verificare che lo stato di integrità e di purezza dell'RNA totale estratto sia sufficiente per procedere con i passaggi sperimentali successivi.

Componente	Concentrazione
Tris-acetato pH8,0	40mM
EDTA	1mM

Tabella 3. Tampone TAE 1X

Componente	Concentrazione (w/v%)
Xilene-cianolo	0,25
Glicerolo	30

Tabella 4. Tampone GLB 6X

Quantificazione dell'RNA totale

Dalla misura di assorbanza spettrofotometrica (A) a 260nm è possibile calcolare la concentrazione di RNA presente nel campione: un valore di assorbanza a 260nm pari a 1 corrisponde a circa 40µg/ml di RNA (50 µg/ml di DNA). Per stimare il grado di purezza dell'RNA estratto, si valuta sia il rapporto tra le letture a 260nm e a 280nm sia il rapporto tra le letture a 260nm e a 230nm. Il primo parametro esprime il rapporto tra la concentrazione di acidi nucleici e proteine (i cui residui aromatici assorbono a 280nm), mentre il secondo parametro riflette la contaminazione del campione dovuta a sostanze tra cui carboidrati, fenoli e peptidi.

Preparazione dell'RNA, ibridazione del microarray ed analisi dei dati

Il "Grape array 1.2"

Il "GrapeArray 1.2" (http://ddlab.sci.univr.it/FunctionalGenomics/datasheets/grape_1.2.html), prodotto con tecnologia CombiMatrix contiene 25471 trascritti di vite. Il chip è stato disegnato sulla base delle sequenze derivate dal "TIGR *Vitis vinifera* Gene Index Release 5.0 (June 21, 2006)" (19583 TCs o ESTs e 2394 singletons), sia dal progetto di sequenziamento del genoma della vite (3494 CDS) (French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. *Nature* 2007, 449: 463-7). Il chip contiene anche "Ambion spike-in specific oligos" (Cat.1780) e controlli negativi (batterici e virali).

Determinazione della qualità dell'RNA

L'esperimento di microarray è stato condotto sulle bacche intere campionate nei sei stadi sopra descritti (compresi tra la l'invaiaatura ed il completo appassimento) presso l'azienda Pasqua (Montorio, Verona) durante l'annata 2006.

L'RNA è stato estratto con il metodo del perclorato di sodio (Rezaian and Krake, 1987), per ognuno degli stadi considerati, da tre pool di acini ottenuti, ciascuno, da un grappolo diverso. Per ciascuno stadio l'RNA è stato quantificato mediante misura spettrofotometrica dell'assorbanza mentre la sua integrità è stata valutata attraverso il Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies) usando l'RNA LabChip® (Agilent Technologies) (Figura 1) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

La determinazione dell'integrità dell'RNA è un primo passaggio critico per ottenere dati di espressione genica il più possibile significativi; l'uso di RNA integro è un fattore chiave per una buona analisi microarray.

I profili generati da "Agilent 2100 bioanalyzer" forniscono inoltre informazioni sulla concentrazione e consentono un'analisi visiva dell'integrità dell'RNA considerato.



Figura 1. Agilent Bioanalyzer 2100 ed RNA LabChip®

Il "bioanalyzer" permette di eseguire la valutazione qualitativa del campione. È un sistema molto sensibile che prevede il caricamento dei campioni (solo 1µl) in un chip in cui avviene una corsa elettroforetica capillare. Al termine della corsa elettroforetica i campioni sono letti in base alla loro fluorescenza e tale informazione è tradotta in una tipica immagine di gel elettroforesi e in elettroferogrammi. Un RNA utilizzabile nella tecnica dei microarray deve avere un'elettroferogramma simile a quello riportato in figura, in cui i picchi del 28S e 18S RNA presentano un rapporto di circa 1.8-2.0 (Figura 2).

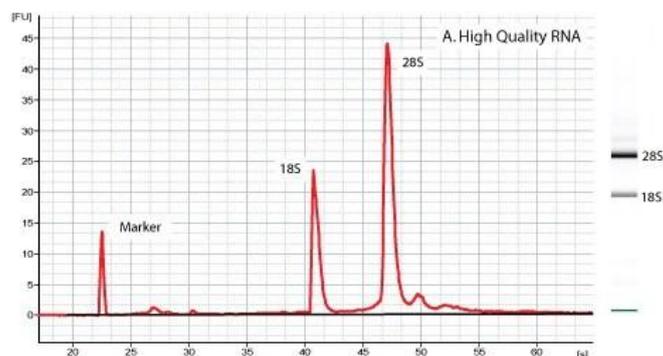


Figura 2. Tipico elettroferogramma di un campione di RNA di buona qualità

Dopo aver controllato la qualità dell'RNA si è proceduto con la marcatura dell'acido nucleico; l'aRNA (amplified RNA) marcato è stato prodotto a partire da 1µg di RNA totale, usando l'AminoAllyl MessageAmpTMaRNA (Ambion) (http://www.ambion.com/techlib/prot/fm_1752.pdf). La procedura consiste in una trascrizione inversa dell'RNA con un primer oligo(dT) portante un promotore T7 seguita da un passaggio di trascrizione *in vitro* con T7 RNA Polymerase per generare, a partire da centinaia, migliaia di copie di RNA antisense.

L'AminoAllyl MessageAmp aRNA Kit consente l'incorporazione del nucleotide modificato 5-(3-aminoallyl)-UTP (aaUTP) nell'RNA durante la trascrizione *in vitro*.

L'aaUTP contiene un gruppo amminico primario in posizione C5 dell'uracile che si lega al fluoro foro ammino-reattivo (CyTM5) in una reazione semplice ed efficiente. Una volta purificato, l'aRNA marcato con il fluoro foro può essere utilizzato per l'ibridazione.

Dopo aver verificato che ciascun campione avesse incorporato la stessa quantità di fluoro foro, 4µg di aRNA marcato sono stati frammentati e ibridati al Grape Array 1.2 in un "hybridization cap" in un forno contenente "CombiMatrix 32 CustomArrayTM Rotisserie" secondo i protocolli forniti dal produttore (http://www.combimatrix.com/products_rotisserie.htm).

Protocollo di ibridazione ed acquisizione delle immagini

Il kit fornito da CombiMatrix comprende:

- CustomArrayTM 90K microarray
- "Hybridization Cap" (120µl)
- Clips per "Hybridization Cap"
- LifterSlipTM cover slip
- Imaging Solution

La superficie del microarray, costituita dal semiconduttore, non va mai toccata ed è necessario indossare i guanti quando si maneggia il vetrino. I microarray CustomArrayTM 90K possono essere conservati fino a quattro mesi in un luogo fresco e asciutto.

Assemblaggio del CustomArrayTM 90K

In questo passaggio l' Hybridization Cap è stato posto sopra il vetrino in modo che il bordo superiore del vetrino combaciasse con lo "Stop" dell' Hybridization Cap e che il Cap fosse centrato sopra l'area del semiconduttore. L' Hybridization Cap è stato assicurato con le Clips fornite con il kit (Figure 3 e 4). Le Clips possono essere attaccate solo se l' Hybridization Cap è perfettamente posizionato con il bordo superiore del vetrino allo "Stop" del Cap.

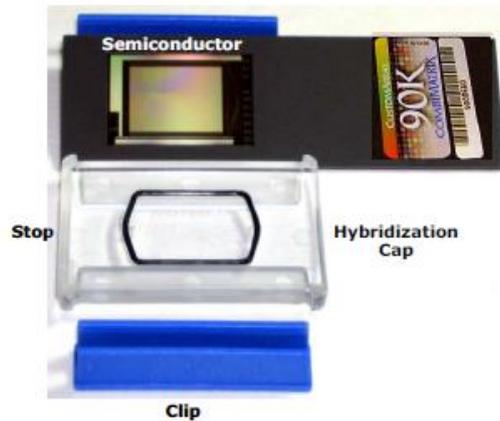


Figura 3. Il microarray CustomArray™ 90K, l'Hybridization Cap e le Clips

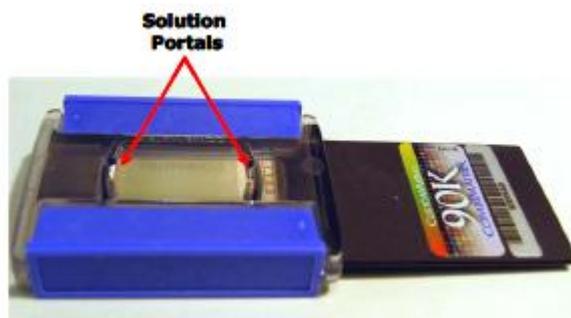


Figura 4. Il microarray CustomArray™ 90K assemblato con l'Hybridization Cap e le Clips

L'Hybridization Cap, una volta che il microarray è stato assemblato e reidratato, non viene rimosso in nessuno dei successivi passaggi di ibridazione e di lavaggio. È estremamente importante, in ciascun passaggio del protocollo, che la superficie del semiconduttore del microarray non sia mai asciutta. Le soluzioni vengono aggiunte o rimosse attraverso la “lower solution portal” dell'Hybridization Cap (Figura 5) mediante l'utilizzo di una pipetta da 200µl con puntali nuclease-free, tenendo il microarray, con il suo Hybridization Cap, ad un angolatura di 45°C.



Figura 5. Inserimento delle soluzioni attraverso la “lower solution portal” della cameretta di ibridazione del microarray assemblato.

Durante la pre-ibridazione, l'ibridazione ed i lavaggi si consiglia di procedere il più velocemente possibile con il cambio delle soluzioni. Inoltre per le incubazioni più lunghe di 10 minuti, le "solution portals" dell'Hybridization Cap vengono sigillate con nastro adesivo impermeabile per evitare l'evaporazione.

Preparazione per l'ibridazione

Le seguenti soluzioni sono state precedentemente preparate, mediante l'utilizzo di reagenti nuclease-free. La "2X Hyb Solution Stock" (Tabella 5) è stata utilizzata per la preparazione delle soluzioni di pre-ibridazione e di ibridazione.

Reagente	Volume per 10ml	Concentrazione finale
20X SSPE	6ml	12X
10% Tween-20	100µl	0,1%
0,5M EDTA	560µl	40mM
Acqua Nuclease-free	3,34ml	
Volume totale	10ml	

Tabella 5. 2X Hyb Solution Stock

Per i lavaggi sono state invece utilizzate le "Wash Solutions" riportate in Tabella 6:

Step	Soluzione	Per 10ml
6X SSPET Wash	6X SSPE, 0,05% Tween-20	3ml 20X SSPE 50µl 10% Tween-20 6,95ml Acqua Nuclease-free
3X SSPET Wash	3X SSPE, 0,05% Tween-20	1,5ml 20X SSPE 50µl 10% Tween-20 8,45ml Acqua Nuclease-free
0,5X SSPET Wash	0,5X SSPE, 0,05% Tween-20	250µl 20X SSPE 50µl 10% Tween-20 9,7ml Acqua Nuclease-free
PBST Wash	2X PBS, 0,1% Tween-20	250µl 20X SSPE 50µl 10% Tween-20 7,9ml Acqua Nuclease-free
PBS Wash	2X PBS	2ml 10X PBS 8ml Acqua Nuclease-free

Tabella 6. Wash Solutions

Pre-ibridazione

Prima dell'ibridazione, il CustomArray™ microarray è stato reidratato ed è stato sottoposto ad un passaggio di pre-ibridazione per bloccare il legame aspecifico dei target. In questo passaggio è stato

pre-riscaldato un incubatore a 65°C, è stata impostata la temperatura del fornello di ibridazione a 45°C ed è stata preparata la “Pre-hybridization Solution” (Tabella 7).

Reagente	Volume Cap Per 120µl	Concentrazione finale
2X Hyb Solution Stock	60µl	6X SSPE, 0,05% Tween-20, 20mM EDTA
Acqua Nuclease-free	41µl	
50X Denhardt's solution	12µl	5X
DNA di Sperma di Salmone (10mg/ml)	1µl	100ng/µl
1% SDS	6µl	0,05%
Volume totale	120µl	

Tabella 7. Pre-hybridization Solution

Dopo aver riempito la cameretta di ibridazione con acqua nuclease-free, avendo cura di non introdurre bolle d'aria, le “solution portals” sono state sigillate con nastro adesivo impermeabile per evitare l'evaporazione ed il vetrino è stato incubato a 65°C per 10 minuti. Il vetrino è stato quindi portato a temperatura ambiente ed è stata rimossa l'acqua dalla cameretta. Quest'ultima è stata riempita con la Pre-hybridization Solution, pipettando per mescolare ed inserendo una piccola bolla d'aria che permette di migliorare il processo di mescolamento durante l'incubazione.

Dopo aver sigillato entrambe le “solution portals” con nastro adesivo impermeabile, il vetrino microarray è stato caricato sull'elemento rotante del fornello di ibridazione ed incubato a 45°C per 30 minuti.

Frammentazione dell'RNA

CombiMatrix raccomanda che i campioni di RNA target siano frammentati prima dell'ibridazione. Di solito i frammenti di lunghezza compresa tra 50 e 200nt consentono di massimizzare sia la specificità di legame sia la sensibilità di rivelazione. Per questo scopo è stata necessaria la preparazione della “5X RNA Fragmentation Solution” (Tabella 8).

Reagente	Volume per 10ml	Concentrazione finale
1M Tris Acetato pH 8.1 (si aggiusta il pH con acido acetico glaciale)	2ml	200mM
KOAc	0,49g	500mM
MgOAc	0,32g	150mM
Acqua	Fino a 10ml	
Volume totale	10ml	

Utilizzando la “5X RNA Fragmentation Solution” (Tabella 8), usando 4µg di RNA marcato per ciascun microarray.

Reagente	Volume per 120 μ l
RNA marcato	4 μ g per microarray
5X RNA Fragmentation Solution	4,8 μ l
Acqua Nuclease-free	Fino a 19,2 μ l
Volume totale	24 μ l

Tabella 9. RNA Fragmentation Reaction

La “RNA Fragmentation Reaction” è stata quindi incubata a 95°C per 20 minuti e successivamente lasciata in ghiaccio; l’intero volume “RNA Fragmentation Reaction” è stato aggiunto alla “Hybridization Solution” (Tabella 10).

Ibridazione

Reagente	Per 120 μ l (volume Cap)	Concentrazione finale
2X Hyb Solution Stock	60 μ l	6X SSPE, 0,05% Tween-20, 20mM EDTA
DI Formamide	30 μ l	25%
Target marcati: 4 μ g per campione di RNA	Fino a 24 μ l	20-80ng/ μ l
DNA di Sperma di Salmone (10mg/ml)	1 μ l	100ng/ μ l
1% SDS	5 μ l	0,04%
Acqua Nuclease-free	Fino a 120 μ l	
Volume totale	120 μ l	

Tabella 10. Hybridization Solution

La “Hybridization Solution” è stata denaturata a 95°C per 3 minuti, quindi raffreddata per 1 minuto in ghiaccio e centrifugata per 5 secondi alla massima velocità.

È stata rimossa la banda adesiva dal microarray per poter estrarre la “Pre-hybridization Solution” dalla cameretta di ibridazione e poterla riempire con la “Hybridization Solution” pipettando ripetutamente con cautela. Anche in questo caso è stata introdotta una piccola bolla d’aria per agevolare il processo di mescolamento. Dopo aver accuratamente asciugato la soluzione in eccesso dall’ “Hybridization Cap” ed averlo sigillato con del nastro adesivo, il vetrino è stato caricato sull’elemento rotante del fornello di ibridazione ed incubato a 45°C per circa 14 ore in lenta rotazione.

Lavaggio del chip ibridato

In questo passaggio il vetrino non si deve mai asciugare; bisogna procedere con estrema rapidità quando si cambiano le soluzioni, senza lasciare la cameretta di ibridazione vuota per troppo tempo.

Dopo aver tolto il microarray dal fornetto di ibridazione, la “Hybridization Solution” è stata rimossa dalla cameretta che è stata sciacquata e riempita con “6X SSPET Wash Solution” pre-riscaldata a 45°C, prima di un’incubazione di 5 minuti (in lenta rotazione) in un fornetto di ibridazione.

A questo primo lavaggio ne sono seguiti altri tre rispettivamente con “3X SSPET Wash Solution”, “0,5X SSPET Wash Solution” ed “PSBT Wash Solution”, tutti con un’incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto.

Lavaggio finale

La “PSBT Wash Solution” è stata rimossa dalla cameretta di ibridazione che è stata risciacquata usando la “PSB Wash Solution”. La cameretta è stata riempita con la “PSB Wash Solution” ed il vetrino incubato a temperatura ambiente per 1 minuto. Il lavaggio con la “PSB Wash Solution” è stato ripetuto una seconda volta.

Acquisizione delle immagini del CUSTOMARRAY™90K

Il CustomArray™90K, quando viene scannerizzato, deve essere bagnato con la Imaging Solution fornita dal kit. La LifterSlip™ cover slip, fornita anch’essa con il kit, è stata specificatamente studiata per trattenere la Imaging Solution senza entrare in contatto con la superficie del vetrino.

Una volta aspirata la “PSB Wash Solution” dalla cameretta di ibridazione, questa è stata staccata dal vetrino, rimuovendo le clip e sollevando l’Hybridization Cap dalla superficie del vetrino; la superficie del microarray è stata quindi immediatamente coperta con la Imaging Solution.

Con una pinzetta dalle estremità molto sottili, è stato posto un LifterSlip™ sul microarray in modo che i bordi rialzati fossero rivolti dalla parte del vetrino. Il LifterSlip™ è stato adagiato sul vetrino in modo che fosse centrato rispetto all’area del semiconduttore (Figura 6). È stato appoggiato per primo un lato del LifterSlip™ sulla Imaging Solution, quindi lentamente tutto il LifterSlip™ ponendo attenzione a non introdurre bolle d’aria.

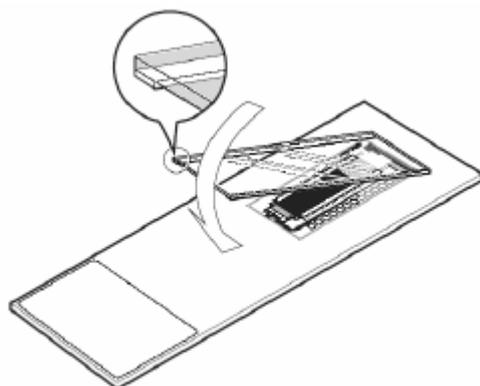


Figura 6. Il CustomArray™90K con il vetrino copri-oggetto LifterSlip™

Con molta cautela è stato rimosso qualunque eccesso di Imaging Solution dal bordo del LifterSlip™ fino a che non fosse rimasto solamente sul vetrino.

Assicurandosi di non spostare il copri-oggetto LifterSlip™, il vetrino CustomArray™90K è stato caricato nello scanner laser “ScanArray Express”, ponendo attenzione che i parametri usati nella scansione fossero sempre tali da poter successivamente comparare le immagini derivanti dai diversi chip ibridati. A scansione ultimata l’immagine è stata salvata in formato “.tiff”.

Quando è stata ultimata l’acquisizione dell’immagine, è stato possibile procedere con lo “stripping” del microarray CustomArray™90K (CombiMatrix CustomArray™ Stripping Kit) per prepararlo ad ibridazioni successive. I dati grezzi di espressione sono quindi stati estratti con il software “CombiMatrix Microarray Imager” (<https://webapps.combimatrix.com>). Microarray Imager è un software in grado di generare dati di intensità a partire dall’immagine di un CombiMatrix CustomArray™. Esso genera, a partire dall’immagine di un vetrino e da un file che ne descrive dettagliatamente il contenuto, informazioni sull’intensità degli spot. Tali informazioni possono essere alternativamente salvate nel file che descrive il disegno del chip oppure esportate come tabelle di dati delimitate da tabulazione.

Tali dati sono stati normalizzati tramite una strategia di “global median normalization”.

I geni differenzialmente espressi sono stati identificati tramite una “multi-class SAM” (Significance Analysis of Microarray) scegliendo un valore di FDR (False Discovery Rate) pari al 2%, utilizzando il software Mev 4.0. L’analisi SAM viene utilizzata per individuare geni la cui espressione differenziale risulta statisticamente significativa tra diversi set di campioni.

Analisi di Real-time RT PCR

I profili trascrizionali di alcuni geni appartenenti alle famiglie coinvolte nel metabolismo di parete che mostravano una modulazione significativa ($FC \geq 2$) sono stati studiati tramite esperimenti di Real-time RT PCR.

Per analizzare l’espressione genica, è possibile, dopo aver isolato l’RNA, retrotrascriverlo in cDNA (con l’ausilio di una trascrittasi inversa) e quindi amplificarlo mediante reazioni di PCR utilizzando coppie di primer specifiche per la sequenza di cui si desidera studiare l’espressione.

Eliminazione del DNA

Per eliminare il DNA contaminante, che verrebbe altrimenti utilizzato come stampo nelle reazioni di PCR successive, falsando i risultati dell’analisi, si tratta la soluzione di RNA con l’enzima DNase prodotto da Promega, seguendo il protocollo allegato. La digestione viene allestita come segue (Tab.11):

Componente	Volume
Soluzione acquosa di RNA	1-7µl (corrispondenti a 1100 ng di RNA)
RQ1 RNase-free Dnase Reaction buffer (10X)	1µl
RQ1 Rnase-free Dnase (1U/µg RNA)	2,75µl
Volume totale	10µl

Tabella 11. Miscela per la digestione enzimatica

La miscela viene lasciata per 30 minuti a 37°C, successivamente si aggiungono 2µl di RQ1 Dnase Stop Solution per terminare la reazione e si incuba per 10 minuti a 65°C per inattivare la Dnase.

Sintesi del primo filamento con Oligo(dT)

Si utilizza l'enzima ImProm-IITM Reverse Transcriptase fornito da Promega. Vengono miscelato in due distinte eppendorf 6µl di RNA stampo, con e 1,5µl di oligo(dT), il tutto viene incubato a 70°C per 5 minuti e quindi rapidamente posto in ghiaccio. Questa soluzione viene aggiunta ad una miscela di reazione così composta (Tab.12):

Componente	Volume
ImProm-IITM Reaction Buffer (5x)	4µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,4µl
dNTP mix (10 mM)	1µl
Rnasin®Ribonuclease Inhibitor (1U/µl)	0,5µl
ImProm-IITM Reverse Transcriptase	1µl
Volume totale	20µl

Tabella 12. Miscela di reazione

Tale soluzione è posta a 25°C per cinque minuti, quindi incubata a 42°C per un'ora. La trascrittasi inversa è disattivata con un trattamento a 70°C per 15 minuti, al termine dei quali sarà possibile utilizzare il cDNA sintetizzato come stampo per reazioni di PCR.

Real Time RT-PCR

La metodica di "Real-Time RT-PCR" è una reazione di PCR in cui l'accumulo del prodotto viene monitorato nel corso della reazione. Utilizzando il SYBR®Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) è quindi possibile rendere quantitativa o semiquantitativa una reazione di RT-PCR.

Il SYBR®Green 1 è un colorante che lega in modo altamente specifico il DNA a doppio filamento, permettendo il monitoraggio dell'accumulo dei prodotti di PCR. In seguito a questo legame, esso presenta un incremento in fluorescenza emessa. La capacità di legarsi a dsDNA indipendentemente dalla sequenza che essi possiedono conferisce a SYBR®Green 1 un'elevata versatilità: infatti, un singolo colorante può essere utilizzato per rivelare qualsiasi prodotto di amplificazione. Questo è però anche il suo più grosso svantaggio, poiché esso può generare segnale non solo da parte dei prodotti specifici di reazione, ma anche di quelli aspecifici. Con il SYBR®Green PCR Reagents sono possibili due diversi tipi di analisi quantitativa. La quantificazione assoluta di campioni di DNA genomico e plasmidico si ottiene tramite una curva standard di campioni a concentrazione nota. Nel nostro caso, invece, si utilizza la quantificazione relativa di una molecola target contro uno standard interno. L'espressione genica può essere, così, misurata dalla quantificazione del cDNA ottenuto dalla conversione dell'RNA messaggero di un gene d'interesse, relativa ad un campione calibratore che serve da riferimento fisiologico.

Nel caso specifico si procede ad un'analisi quantitativa relativa, usando come normalizzatore il gene, costitutivamente espresso, dell' actina (TC81781, 6.0; TC55334, 5.0) attraverso un sistema Mx3000P Real-Time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA, USA), seguendo il protocollo Comparative Quantitation.

L'andamento della reazione viene dunque monitorato misurando la fluorescenza emessa dal colorante SYBR Green®, incorporato ai frammenti amplificati nel corso della reazione. Le misure condotte ad intervalli regolari, durante la reazione di amplificazione, sono registrate dal sistema di rilevazione.

Primers

I primers utilizzati nella reazione di PCR permettono l'amplificazione di una porzione della sequenza delle molecole di cDNA del gene di cui si vuole verificare il livello di espressione. Vengono disegnati con l'utilizzo del programma "Gene Runner" e poi analizzati attraverso il software "Oligo Analyser", rispettando alcuni parametri:

- l'amplificato ottenuto in genere ha una lunghezza compresa tra 100 e 130 bp,
- il contenuto di GC deve avere valori compresi tra 20 e 80%,
- la temperatura di melting deve essere compresa tra 50 e 55°C,
- temperature di annealing comparabili tra il gene di interesse e il gene normalizzatore (52-55°C),
- energie libere di intra - inter dimerizzazione non inferiori alle 7 kcal/mole per limitare i problemi di dimerizzazione dei primers,
- tra gli ultimi cinque nucleotidi presenti all'estremità 3' non devono essere presenti più di 2 G o C.

Primers utilizzati nelle reazioni di Real time RT PCR

Gene name	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
Aq GSVIVT00017179001	CATGGGGCCTGGAGGAATT	CTGGAAAGCGTCAACGTGG
Cs GSVIVT00014999001	TGTATCAGTAAGCAAAGTCTCT	TATCCATTATTGAAAGTTGAAAC
Chit GSVIVT00034646001	TCACTCCCACTCGCTTACG	CCGGTGATAGTGTCTTCCAA
Endo GSVIVT00028035001	TGTATCAGTAAGCAAAGTCTCT	ATATATAACAGTTCTTGAGAGC
Inver GSVIVT00029907001	TTCTCCATCTCCATCCCATC	GGATTGAATATGGCAGCCTTG
PI GSVIVT00020459001	AAGGGTTGGAATTGGAGGTC	GCATAGCTGGCTGAGGCACC
PME GSVIVT0002639001	TTCAGGTGGTGGAGCATCG	CCAGGAGAGAAGGGAACAC
PME1B GSVIVT00033995001	AATGTGATCGACCCTGCTGG	GCCCTTCATGTTACTCTCT
PG GSVIVT00028234001	CCATTGCCTCGCCGAAGATT	TGTTACTGCACACAAAGTT
XET GSVIVT00015670001	TCGGTTCAAGGACTGCG	GATGACAAATGGAATGACTCG

Expansin gene name	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
GSVIVT00036225001	AGGGACTTGCTGTTATTTATG	CTCAAATAATCTAATGCTCTGC
GSVIVT00024306001	CATATTTACCCTTCTTGCG	CCCAATTTCCCTCCCTCA
GSVIVT00023470001	AAGGGTTGGAATTTGGACAG	CATACACCCCTCCAACCA
GSVIVT00016318001	CAAACCTTGCTTAATGGTGTATC	CCAGAATCTACTAACTAAC
GSVIVT00000851001	AGCTCCTACTCCTATAATACC	AGACTGACCCCAAGGACA
GSVIVT00029445001	GCTAATTGGCACCCGCATG	ATCTAAAAAGCTTGGAGGGC

Preparazione della reazione di PCR

La reazione viene eseguita secondo le specifiche del kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) in un volume finale di 25µl. Questo prodotto viene venduto già pronto per l'uso, in cui è incluso tutto il necessario per la reazione tranne il template e i primers. Il template è il cDNA singolo filamento derivante dalla reazione di retrotrascrizione. Tutti i campioni di cDNA sono utilizzati come stampo di due diverse reazioni di PCR, una in cui si utilizzano i primers specifici per il gene d'interesse, l'altra in cui sono coinvolti i primers specifici per il gene codificante l'actina (normalizzatore).

Ogni campione viene analizzato in tre repliche tecniche per permettere un'analisi statistica dei dati di amplificazione. Si preparano inoltre dei controlli negativi senza template per verificare l'assenza di "falsi positivi" dovuti a dimerizzazione dei primers, contaminazioni di DNA o alla presenza di molecole fluorescenti contaminanti. Ogni soluzione di reazione è raccolta in singolo pozzetto di una piastra da 96 pozzetti, ABI PRISM 96-Well Optical Reaction Plate. I pozzetti sono chiusi con l'utilizzo di MicroAmp® Optical Caps (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). La piastra è successivamente posizionata all'interno del termociclatore.

Master Mix

Reagente:

- SYBR Green PCR Buffer contenente SYBR Green 1 Dye, Passive Reference 1
- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD
- dNTPs Mix

L'AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD è una forma chimicamente modificata dell'AmpliTaq® DNA Polymerase, che rende questo enzima inattivo. Per innalzamento termico si ha il rilascio del modificatore e l'attivazione enzimatica. I passaggi ad alta temperatura garantiscono la sua funzionalità solo nelle condizioni in cui il DNA è completamente denaturato. Questo sistema, detto "Hot Start", permette di migliorare la specificità e la sensibilità della reazione evitando appaiamenti scorretti dei primers.

La dNTP Mix contiene dATP 2,5mM, dCTP 2,5mM, dGTP 2,5 mM e dUTP 5,0mM. Per ottimizzare la reazione si utilizzano le coppie di primer ad una concentrazione finale pari a 300nM.

Esecuzione e monitoraggio della reazione

Il MxPro QPCR (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA) software crea una riproduzione della piastra da 96 pozzetti. Questa riproduzione è utilizzata per i seguenti scopi: definire e registrare i primers e i campioni di ogni pozzetto; impostare e registrare i parametri del ciclo termico, usato per eseguire l'esperimento; esaminare i cambiamenti in fluorescenza al termine della reazione di PCR; analizzare i dati di fluorescenza e generare una curva standard; salvare le informazioni riguardanti l'organizzazione della piastra e acquisire i dati sotto forma di una registrazione elettronica dell'esperimento.

Durante lo svolgimento di questo programma, da parte del termociclatore, avviene il contemporaneo monitoraggio dell'accumulo dei prodotti di PCR tramite detector. In questo strumento, la luce emessa da una lampada alogena, passa attraverso un filtro ottico trasparente per la lunghezza d'onda pari a 485nm. La radiazione monocromatica, così ottenuta, è adatta ad eccitare il SYBR Green. La fluorescenza emessa dal colorante in seguito all'eccitazione è convogliata ad una telecamera CCD. Durante ogni ciclo di PCR si registrano immagini multiple dell'intera piastra da 96 pozzetti.

Il programma impostato nel termociclatore durante i nostri esperimenti è stato il seguente:

95°C x 10 min "Hot Start"

95°C x 30 sec
55°C x 30 sec
72°C x 20 sec

} Per 45 cicli

95°C x 1 min

55°C x 30 sec

95°C x 30 sec

Acquisizione dei dati

Con la quantificazione relativa, il livello di espressione genica può essere misurato dalla quantificazione di un cDNA rispetto ad un campione calibratore che serve da riferimento fisiologico. Tutte le quantificazioni vengono inoltre normalizzate contro un controllo endogeno come l'actina (un gene costitutivo).

Il software di acquisizione dei dati riporta per ogni campione i risultati come CT (threshold cycle).

Il ciclo soglia rappresenta il ciclo di PCR, a cui può essere rilevato per la prima volta un incremento significativo della fluorescenza.

Analisi e rappresentazione dei dati

Il MxPro QPCR software (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA) è coinvolto anche nell'analisi e nella rappresentazione dei dati, registrati precedentemente. Per ogni reazione di amplificazione si ottiene una curva di valori di Rn (normalized reporter), che indica la fluorescenza registrata durante lo

svolgimento della PCR stessa, in funzione del numero dei cicli. Si può scegliere di esprimere l'asse Y in forma lineare o logaritmica. Dall'analisi della curva di amplificazione, si definisce un valore di threshold che corrisponde al valore di Rn che si trova all'interno della zona esponenziale di aumento della fluorescenza nel corso dell'amplificazione. L'intersezione tra la curva di crescita della fluorescenza e il threshold fornisce i valori di CT (threshold cycle) che rappresentano i cicli ai quali i diversi campioni presentano lo stesso valore di fluorescenza. La tabella presenta anche i valori di deviazione standard di CT, la quantità di molecole prodotte, la media e la deviazione standard della quantità.

Analisi dei risultati

I risultati vengono analizzati in un foglio di lavoro Microsoft Excel. I passaggi matematici riportati consentono di calcolare, partendo dal valore di ciclo soglia, la quantità relativa del trascritto d'interesse presente nel campione.

La quantificazione dell'espressione relativa di un gene di interesse è calcolata attraverso l'equazione di Pfaffl (Pfaffl, 2001; Pfaffl, 2002).

$$ratio = (E_{gene})^{\Delta Ct_{gene}} / (E_{rif})^{\Delta Ct_{rif}}$$

- E_{gene} : efficienza della reazione di amplificazione per il gene di interesse
- E_{rif} : efficienza della reazione di amplificazione per il gene normalizzatore (actina)
- ΔCt_{gene} : differenza del valore di Ct del campione calibratore e del campione in analisi per il gene di interesse
- ΔCt_{rif} : differenza del valore di Ct del campione calibratore e del campione in analisi per il gene normalizzatore (actina)

L'efficienza delle reazioni di amplificazione è calcolata a partire dai dati di fluorescenza attraverso l'utilizzo del programma LinRegPCR (Ramarker *et al.*, 2003).

I valori di ΔCt_{gene} ed ΔCt_{rif} sono calcolati utilizzando i valori medi di Ct_{gene} e Ct_{rif} sia per il campione calibratore e sia per il campione in analisi.

Il valore di errore standard è calcolato secondo la seguente formula proposta da Pfaffl (Fig. 6):

$$\begin{aligned} S.E.(\hat{\varphi}) = & \varphi \left\{ \frac{(CP_{target,cont} - CP_{target,test})^2}{\hat{E}_{target}^2} SE^2(\hat{E}_{target}) \right. \\ & + \frac{(CP_{ref,cont} - CP_{ref,test})^2}{\hat{E}_{ref}^2} SE^2(\hat{E}_{ref}) \\ & + (\log_e E_{target})^2 (SE^2(CP_{target,cont}) + SE^2(CP_{target,test})) \\ & \left. + (\log_e E_{ref})^2 (SE^2(CP_{ref,cont}) + SE^2(CP_{ref,test})) \right\}^{0.5} \end{aligned}$$

Figura 6. Equazione di Pfaffl

SCOPO

Le informazioni in letteratura riguardanti il comportamento di alcune famiglie geniche di vite coinvolte nel metabolismo della parete cellulare e nel trasporto dell'acqua sono relative essenzialmente al periodo che va' dall'antesi alla maturazione del frutto , mentre si hanno poche notizie relative all'appassimento.

Per poter delucidare il comportamento di particolari geni chiave del metabolismo di parete, sarebbe interessante utilizzare un approccio il più globale possibile, che coinvolga, ad esempio, un intervallo temporale più ampio, comprensivo anche della fase di appassimento.

A questo scopo, è richiesta una preliminare analisi bioinformatica di tipo BlastP, a partire da sequenze note, contro l'intero genoma di *Vitis vinifera* 8.4X; l'obiettivo iniziale di questo lavoro è, dunque, l'identificazione di tutte le sequenze amminoacidiche presenti in ciascuna famiglia oggetto di studio e la ricerca dei domini conservati che le caratterizzano.

Per caratterizzare le espressioni dei geni di parete e coinvolti nel trasporto dell'acqua, verrà effettuata un'analisi del trascrittoma mediante l'utilizzo di un chip Combimatrix 90K contenente 24562 trascritti di vite, derivanti dal "TIGR *Vitis vinifera* Gene Index" Release 5.0 e dal progetto di sequenziamento del genoma di vite.

Su alcuni delle sequenze geniche che risulteranno differenzialmente espresse rispetto agli stadi presi in esame, verranno condotte analisi di tipo Real time RT-PCR, mediante l'utilizzo di coppie di primers gene-specifiche.

Si procederà quindi all'analisi dell'attività enzimatica, mediante gel diffusione, di alcune famiglie, per le quali è stato messo a punto un sistema proteina-specifico.

RISULTATI

Caratterizzazione di famiglie geniche coinvolte nel metabolismo di parete e trasporto dell'acqua nel genoma di *Vitis vinifera* cv CORVINA

La prima fase di questo lavoro ha riguardato l'identificazione e la caratterizzazione dei membri di famiglie geniche di vite coinvolte nel metabolismo della parete cellulare e nel trasporto dell'acqua tra la parete cellulare e la cellula (Tab 1). Per ogni famiglia genica considerata sono state identificate le sequenze amminoacidiche tramite un'analisi BlastP a partire da sequenze di *Arabidopsis thaliana*, di *Oriza sativa* o di *Zea mais* condotta contro l'intero genoma di *Vitis vinifera* 8.4X. Sui risultati ottenuti, è stata effettuata una prima selezione sulla base del livello di omologia con le sequenze note di *Arabidopsis* e riso ed una successiva selezione, attraverso il software "Conserved Domain Database" (CDD) di NCBI, sulla base della presenza di un dominio proteico conservato tipico di ogni famiglia genica in esame.

Per tutti i geni identificati si sono cercati, dove riportati, la nomenclatura corrispondente secondo il sistema IASMA, la localizzazione cromosomica, la funzione e il numero di accessione nucleotidica delle proteine corrispondenti.

Per esaminare le relazioni filogenetiche tra le proteine di vite sono stati costruiti alberi filogenetici a partite dalla sequenze "full-length". Le sequenze sono state allineate con la suite Mafft, è stato trovato il modello migliore con ProtTest e infine gli alberi sono stati preparati con PhyML. La parte strettamente informatica è stata condotta in collaborazione con il Dott. Luca Venturini. Nella tabella 1 sono elencate le famiglie geniche analizzate e l'accession number della sequenza di input utilizzata per condurre l'analisi BlastP.

Famiglie studiate	Sequenza di input per il BlastP
Acquaporine	GI:189032243 <i>A. thaliana</i>
Chitinasi	GI:145338613 <i>A. thaliana</i>
Cellulosa sintasi	GI:3135611 <i>A. thaliana</i>
Cellulasi	GI:226531107 <i>Z. mais</i>
Invertasi	GI:67633352 <i>O. sativa</i>
Pectato liasi	GI:10177179 <i>A. thaliana</i>
Pectinmetilesterasi	GI:6093122 <i>A. thaliana</i>
Poligalatturonasi	GI:15218607 <i>A. thaliana</i>
Xiloglucano endotransglicosilasi	GI:22327914 <i>A. thaliana</i>

Tabella 1. Famiglie geniche analizzate

Pectinmetilesterasi

Le pectine rappresentano un gruppo altamente eterogeneo di polimeri costituito da omogalatturonani e ramnogalatturonani I e II e formano il 35% del peso secco delle pareti delle dicotiledoni.

La polimerizzazione delle pectine avviene nel *cis*Golgi, la metilesterificazione avviene nel *medial*Golgi e la sostituzione delle catene laterali si compie nelle cisterne del *trans*Golgi (Goldberg et al, 1996). Dal momento che le pectine vengono secrete in parete in forma altamente metilesterificata, esse possono

essere modificate da pectinasi come pectinmetilesterasi (PME), che catalizzano la demetilesterificazione degli omogalatturonani, rilasciando pectine acide e metanolo.

Le PME sono enzimi ubiquitari della parete cellulare che catalizzano l'idrolisi di gruppi metilestere dai residui galatturonosilici, rendendoli accessibili all'azione delle poligalatturonasi (PG) (Deytieu-Belleau et al., 2008).

Nel genoma di *Vitis vinifera* sono stati identificati, scegliendo un E-value $\leq 7e-11$ e considerando la presenza del dominio conservato riportato in figura 1, 55 geni codificanti pectinmetilesterasi, riportati nella tabella in appendice 1. Il dominio proteico conservato della famiglia delle PME è costituito da circa 285 aa (Fig.1).

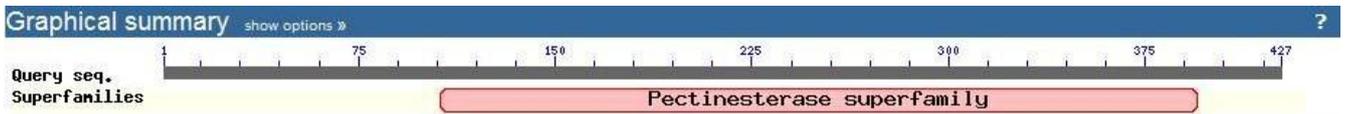


Figura 1. dominio conservato delle pectinmetilesterasi

I geni codificanti PME sono distribuiti su almeno 15 dei 19 cromosomi di vite, ma un raggruppamento sostanziale di questi geni è evidente su alcuni cromosomi. In particolare 7 geni sono localizzati sul cromosoma 11, 5 geni si trovano sui cromosomi 7-14 e 16, e 4 sui cromosomi 4-5-6. La posizione fisica di 8 geni non è stata ancora definita. L'albero filogenetico costruito sulle sequenze di PME mostra come vi un'elevata omologia tra le pectinmetilesterasi di vite (Fig.2).

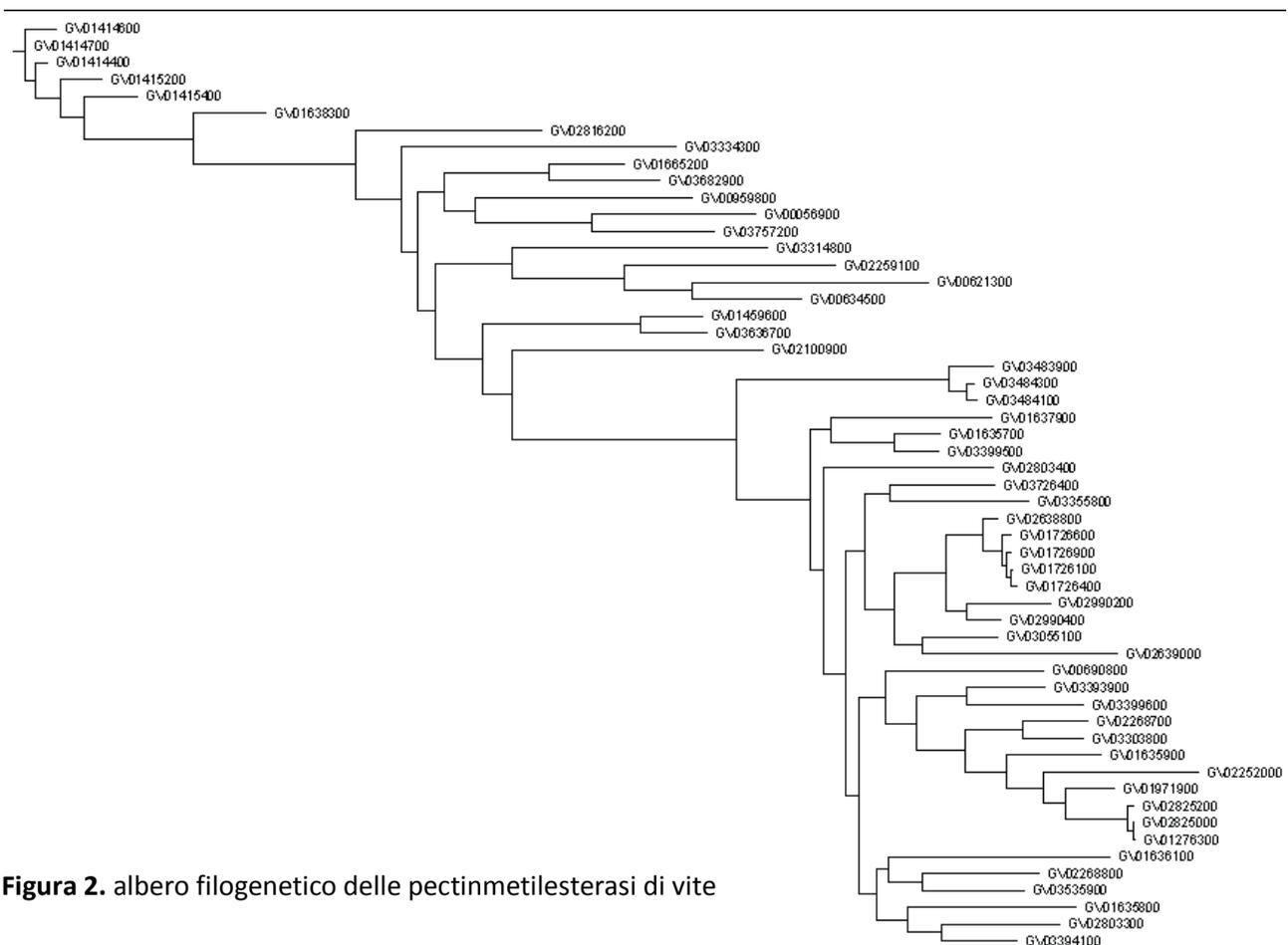


Figura 2. albero filogenetico delle pectinmetilesterasi di vite

Poligalatturonasi

La maturazione della bacca è caratterizzata dall'ammorbidimento del frutto dovuto ad un'estensiva degradazione della parete cellulare (Brummel et al., 2004). Molti dei polisaccaridi strutturali subiscono idrolisi enzimatiche, reazioni di transglicosilazione, solubilizzazione e depolimerizzazione, che si ritiene contribuiscano al "wall loosening" (Fischer et al., 1991, Nunan et al., 2001, Wakabayashi et al., 2000).

La rottura delle strutture della parete cellulare avviene attraverso l'azione di enzimi idrolitici, tra cui pectinasi come poligalatturonasi, pectato liasi e pectinmetilesterasi. Le poligalatturonasi sono ampiamente caratterizzate tra le varie pectinasi e giocano un ruolo importante in questi processi. Esse appartengono ad una famiglia multi-genica, nella quale sono presenti isoforme tessuto-specifiche o espresse in risposta a stimoli ed in risposta a vari stimoli (Gonzales-Carranza et al., 2007, Hadfield et al., 1998).

La de-metilazione operata dalle PME rende i poligalatturonani accessibili alla degradazione da parte delle PG, che rilasciano acidi galatturonici (eso-poligalatturonasi) oppure oligogalatturonati (endo-poligalatturonasi).

L'azione delle PG influenza la disponibilità dei gruppi carbossilici degli omogalatturonani al legame con gli ioni Ca^{2+} ; se aumenta il numero di ponti Ca^{2+} -catene di omogalatturonani diminuisce l'accessibilità di quest'ultimi all'azione delle idrolasi.

Il genoma 8.4X di *Vitis vinifera* contiene 74 sequenze codificanti poligalatturonasi (Appendice 2), portanti il dominio conservato Glico-idro-28 tipico della superfamiglia delle poligalatturonasi mostrato in figura 3.



Figura 3. dominio conservato delle poligalatturonasi

L'albero filogenetico di questa famiglia genica mostra che la maggior parte dei membri sono caratterizzati da un'elevata ologia di sequenza, mentre alcuni membri si discostano dalle ramificazioni principali (Fig.4).

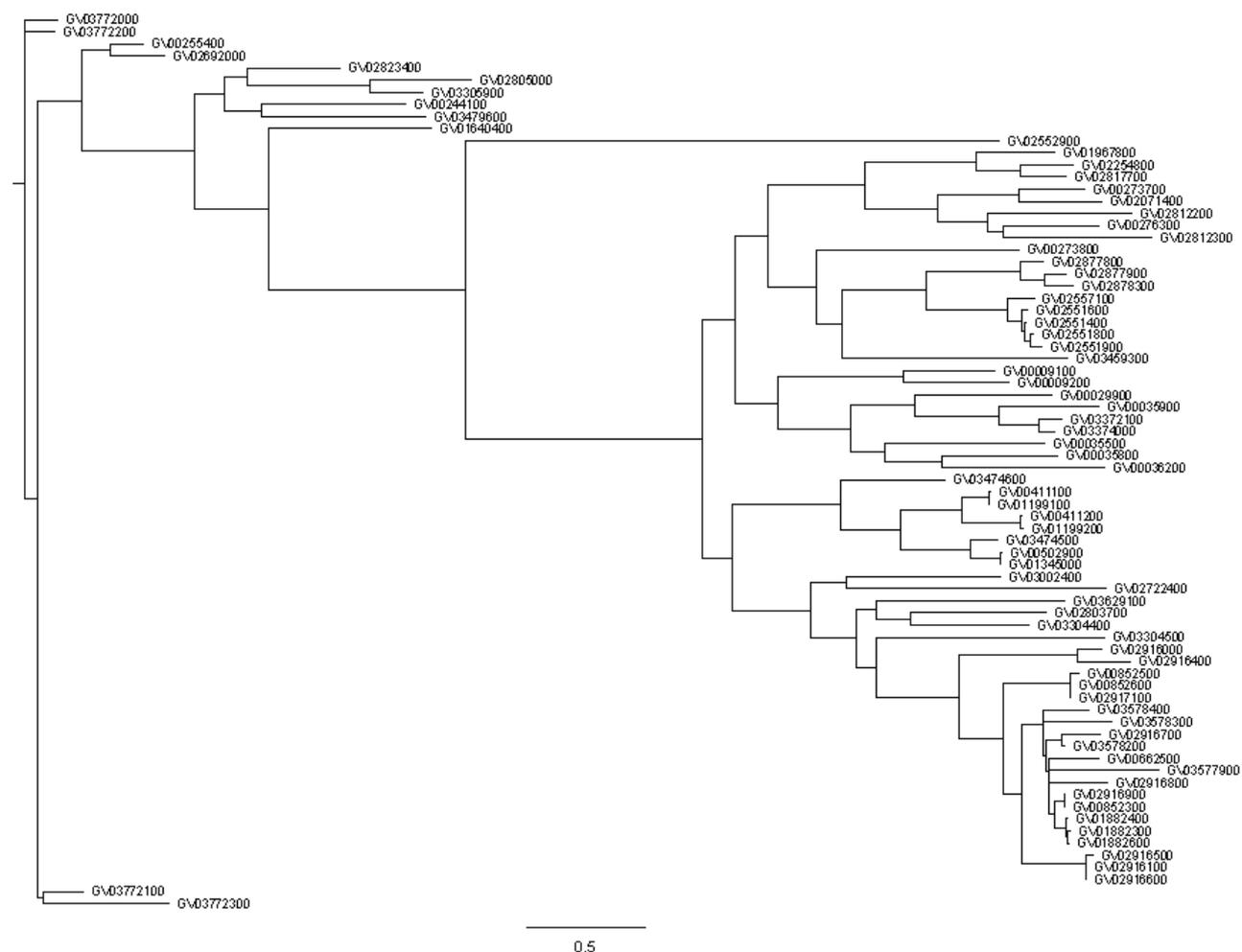


Figura 4. albero filogenetico delle poligalatturonasi di vite

Pectato liasi

Come già precedentemente descritto, durante l'ammorbidente dei frutti avviene una diminuzione della quantità di pectine covalentemente legate ed un aumento dei poliuronidi idro-solubili (Huber 1984, Knee et al. 1977, Redgwell et al. 1997). Sebbene le poligalatturonasi fossero considerate tra le principali idrolasi deputate alla degradazione della pectina durante la maturazione del pomodoro (Hobson and Grierson 1993), frutti tra i quali il mango e la banana mostravano livelli di attività di PG molto bassi o addirittura non rilevabili (Ali et al. 2004, Dominguez-Puigjaner et al. 1997, Lazan et al. 1986) nonostante una considerevole solubilizzazione e degradazione della pectina (Huber 1984, Smith et al. 1989).

Oltre all'azione delle PG nel softening di tali frutti, si propone la partecipazione di altri enzimi, tra cui le pectato liasi, poiché possiedono attività pectinolitica e tagliano i legami glicosidici tra i residui galatturonosilici, attraverso un meccanismo di β -eliminazione (Rao et al. 1996).

Recenti studi effettuati su banana, fragola e uva suggeriscono un ruolo importante delle PL nella maturazione del frutto (Marin-Rodriguez et al. 2003, Medina-Escobar et al. 1997, Nunan et al. 2001).

Le pectato liasi, altrimenti conosciute come pectato transeliminasi, catalizzano il taglio eliminativo della pectina de-esterificata. Lo scheletro dei polisaccaridi pectici è costituito da blocchi di acidi α -1,4 poligalattosiluronici localizzati in regioni in cui sono presenti anche acidi galattosiluronici e residui di

ramnosio (Willats et al., 2001). Il taglio effettuato dalle PL richiede la presenza di ioni Ca^{2+} e genera oligosaccaridi con residui galatturonosilici non saturati all'estremità non riducente.

Fino a poco tempo fa, si pensava che le PL fossero secrete soprattutto dai fitopatogeni, in quanto agiscono nella macerazione dei tessuti vegetali, tuttavia l'abbondanza di sequenze PL simili nei genomi delle piante (27 geni nel genoma di *Arabidopsis*) suggerisce che questi enzimi abbiano un ruolo importante nei processi di sviluppo. Ad esempio, la proteina raggiunge il suo massimo di espressione in fase tardiva durante lo sviluppo del polline; questo dato suggerisce che durante la crescita del tubetto pollinico la pectina presente nella pareti cellulari venga degradata.

Il genoma 8.4X di *Vitis vinifera* contiene 15 diverse sequenze codificanti Pectato liasi, contenenti i domini conservati tipici della superfamiglia delle PL (Appendice 3), (Fig.5).

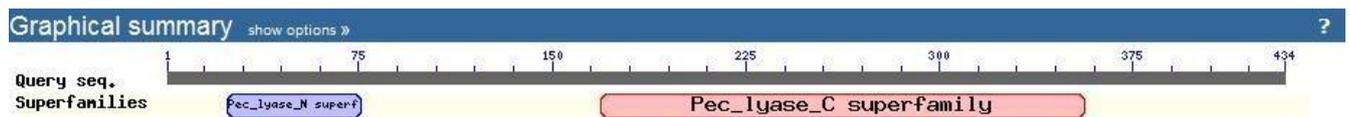


Figura 5. dominio conservato delle pectato liasi

L'albero filogenetico delle pectato liasi può essere suddiviso in due grandi raggruppamenti, il secondo dei quali presenta numerose sequenze che mostrano elevata omologia (Fig.6).

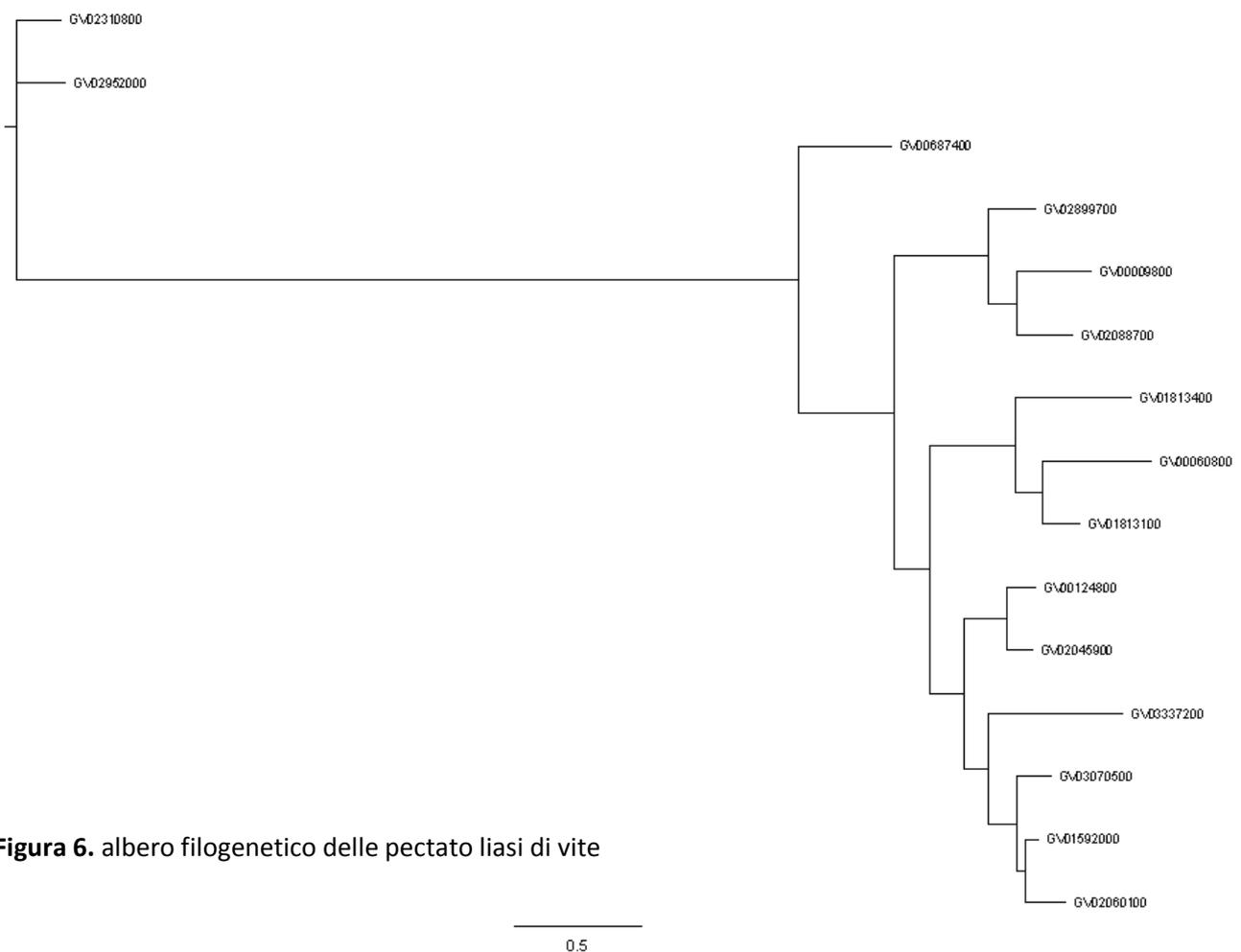


Figura 6. albero filogenetico delle pectato liasi di vite

Xiloglucano endotransglicosilasi

La parete cellulare primaria della maggior parte delle dicotiledoni è costituita da microfibrille di cellulosa immerse in una matrice di emicellulose, rappresentate principalmente da xiloglucani e pectine.

Durante l'allungamento e l'espansione cellulare, la parete subisce continue azioni di "loosening" seguite da rapidi rinforzi strutturali. Le Xiloglucano endotransglicosilasi (XETs) sono enzimi in grado di modulare la chimica della matrice svolgendo entrambe le funzioni sopra citate, mediante catalisi del taglio delle catene di xiloglucano e la conseguente re-ligazione ad una catena diversa.

Le XET appartengono ad una più vasta famiglia di enzimi noti come glicoside idrolasi, che catalizzano la fissione di ponti glicosidici in ambiente acido; le XET mostrano una spiccata preferenza per gli xiloglucani, sia come substrati donatori, sia come accettori (Ishimaru et Kobayashi, 2002).

Nel genoma 8.4X di *Vitis vinifera* sono state identificate 38 sequenze codificanti xiloglucano endotransglicosilasi (Appendice 4), contenenti il dominio conservato Glico-idro-16 tipico della superfamiglia delle XET (Fig.7).

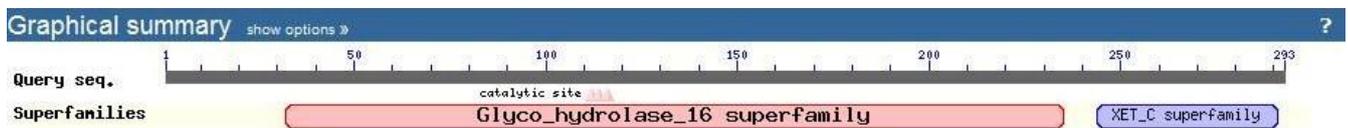


Figura 7. dominio conservato delle xiloglucano endotransglicosilasi

L'albero filogenetico delle XET mostra che le sequenze amminoacidiche si distribuiscono soprattutto in due grandi raggruppamenti, il secondo dei quali mostra numerose ramificazioni. L'omologia tra le sequenze risulta elevata (Fig.8).

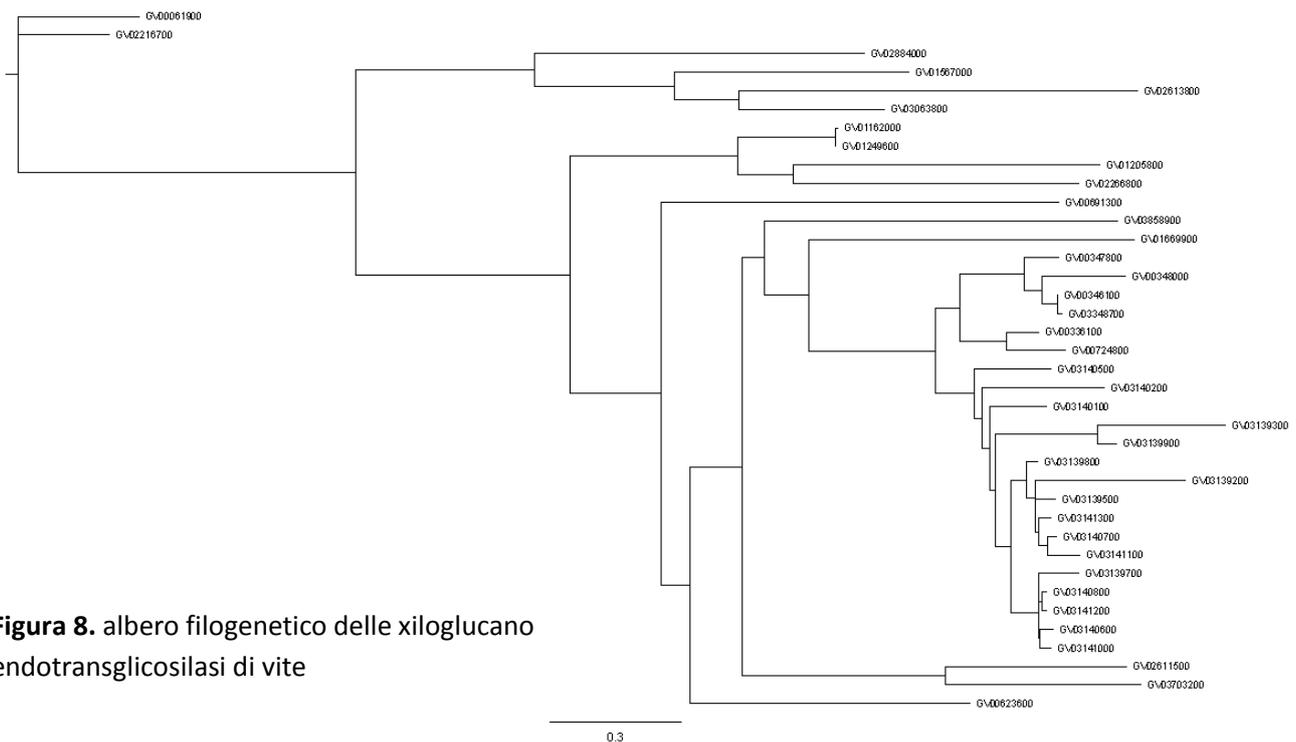


Figura 8. albero filogenetico delle xiloglucano endotransglicosilasi di vite

Acquaporine

Uno dei regolatori chiave degli stadi di crescita della bacca è rappresentato dall'acqua, data la sua capacità di creare una pressione di turgore. Proteine canale denominate acquaporine permettono il movimento delle molecole d'acqua attraverso il plasmalemma e il tonoplasto, per poi confluire nel vacuolo.

Le funzioni fisiologiche ed i meccanismi regolatori di queste proteine non sono ancora ben chiari (Hachez et al., 2006), tuttavia nove sequenze full-length di cDNA codificanti acquaporine sono state recentemente isolate da bacche di vite (Fouquet et al., 2008) e mostrano una globale sottoespressione durante la maturazione. In condizioni di stress idrico, alcuni geni codificanti acquaporine hanno mostrato una diminuzione significativa dell'abbondanza del trascritto sia nella polpa sia nella buccia, in seguito al decremento del flusso idrico causato ad esempio dalla disidratazione post-raccolta (Luu and Maurel, 2005; Grimplet et al., 2007; Rizzini et al., 2009).

La recente pubblicazione del genoma di vite (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007) ci ha permesso di identificare 26 sequenze geniche codificanti putative acquaporine contenenti il dominio conservato tipico della superfamiglia delle proteine MIP (Fig.9). Altre due sequenze, corrispondenti a GSVIVT00023346001 e GSVIVP00025504001, sono state recuperate dalla letteratura (Fouquet et al., 2008). Le 28 sequenze risultanti sono riportate in appendice (Appendice 5).

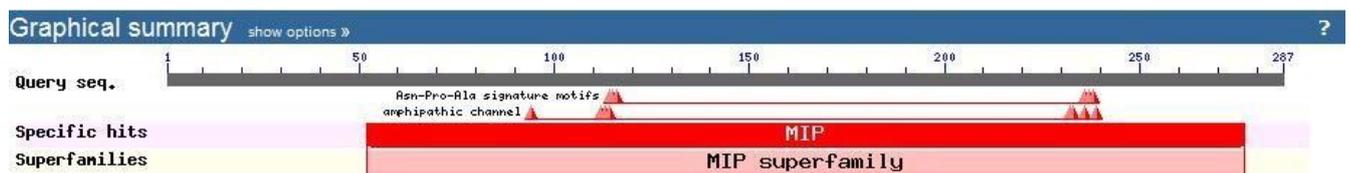


Figura 9. dominio conservato delle acquaporine di vite

Come in altre specie vegetali, un'approfondita analisi delle sequenze proteiche dedotte indica che le acquaporine di vite possono essere suddivise in quattro sottofamiglie distinte: PIPs (proteine della membrana plasmatica), TIPs (proteine del tonoplasto), NIPs (proteine nodulina26-simili) e SIPs (proteine piccole e basiche). Nelle piante, le acquaporine sono presenti nel tonoplasto e nella membrana plasmatica di quasi tutti i tessuti; la localizzazione subcellulare di membri delle famiglie NIPs e SIPs rimane ancora incerta, ma studi recenti mostrano che le SIPs sono nel reticolo endoplasmico delle cellule di *Arabidopsis* (Ishikawa et al., 2005).

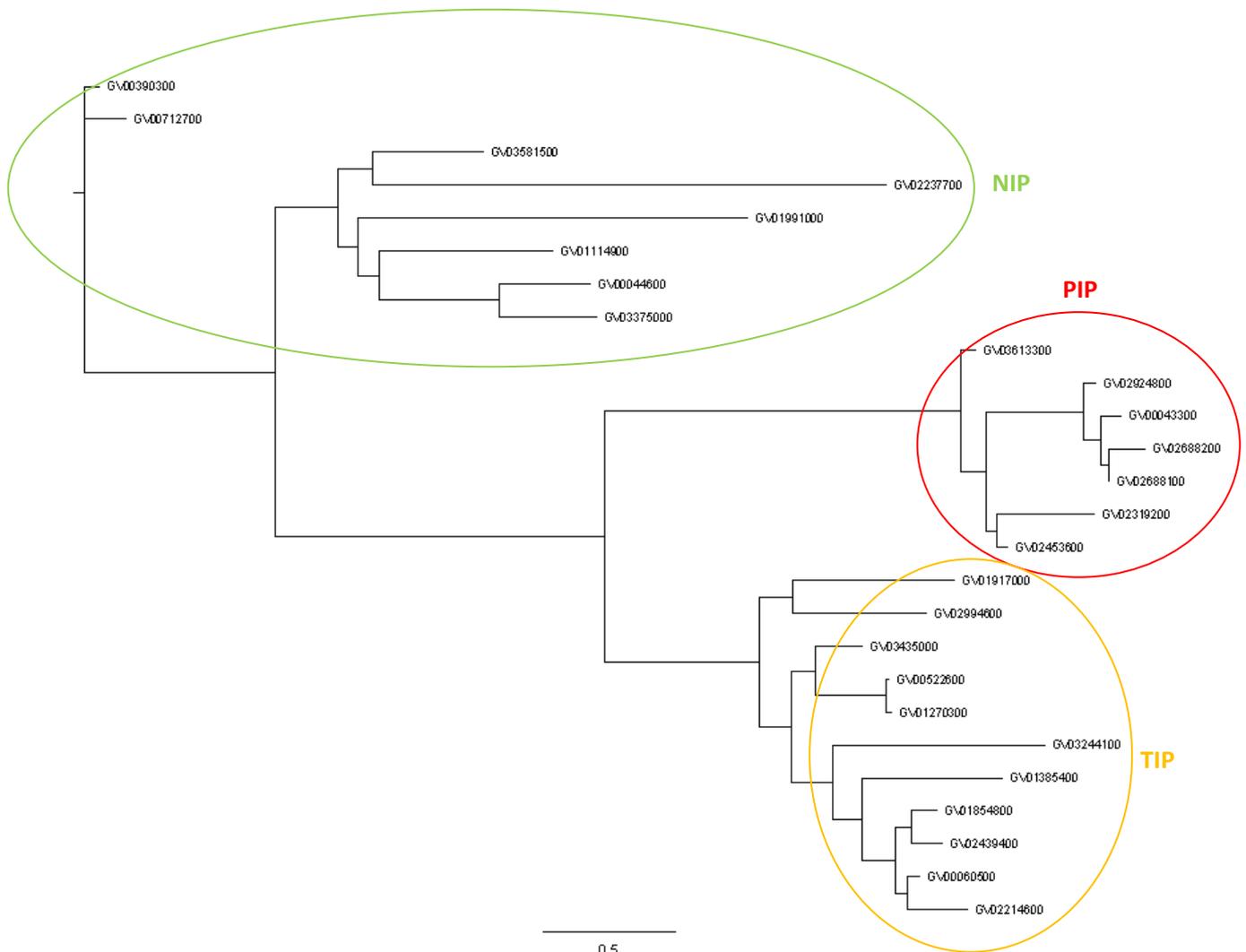


Figura 10. albero filogenetico delle acquaporine di vite

Come in *Arabidopsis* e riso, specie nelle quali sono state identificate 35 e 33 isoforme rispettivamente (Johanson et al. 2001; Sakurai et al. 2005), le acquaporine di vite appartengono ad un'importante famiglia multigenica. E' interessante notare come le sequenze codificanti acquaporine seguano i raggruppamenti corrispondenti alle sottofamiglie nelle quali sono state suddivise; ad esempio, le proteine della membrana plasmatica, PIP, sono raggruppate nello stesso ramo dell'albero filogenetico (Fig.10).

Chitinasi

Tra i vari patogeni di *Vitis vinifera*, i funghi sono spesso la causa di severi danneggiamenti a carico delle bacche di vite durante lo sviluppo, che portano ad una perdita della qualità del vino. Le risposte di difesa che la pianta mette in atto coinvolgono diversi meccanismi tra cui la sintesi di proteine di patogenesi (PR-proteins).

Le chitinasi costituiscono un gruppo di molecole di difesa contro i fitopatogeni e sono indotte in seguito ad attacco fungino (Linthorst, H. J, 1991) o contatto con alcuni elicitori (Ebel, 1998) ed inibiscono direttamente la crescita dei funghi *in vitro* (Herrera-Estrella. and Chet, 1999).

Questi enzimi sono suddivisi in sei classi differenti, in base alle loro omologie strutturali (Robert et al., 2001).

La maturazione della bacca coinvolge una serie di eventi tra cui l'accumulo di zuccheri e altri nutrienti, il softening e la rottura delle strutture cellulari, che potrebbero predisporre il tessuto ad un attacco da parte dei patogeni. In letteratura è riportato che nei semi in via di germinazione (Terras et al., 1992; Vogeli-Lange et al., 1994; Leubner-Metzger et al., 1995) e nei tessuti fiorali (Lotan et al., 1989; Wemmer et al., 1994; Harikrishna et al., 1996), target eccellenti per i fitopatogeni, i meccanismi di difesa sono indotti con lo sviluppo; analogamente nei frutti in via di maturazione, l'induzione delle proteine di difesa potrebbe avvenire in maniera costitutiva, conferendo così alle PR-proteins un ruolo nella normale crescita e nello sviluppo (S. Robinson et al., 1997)

Nel genoma 8.4X di *Vitis vinifera* sono presenti 23 sequenze codificanti chitinasi che contengono il dominio conservato glico-idro-19 (Fig.11). (Appendice 6)

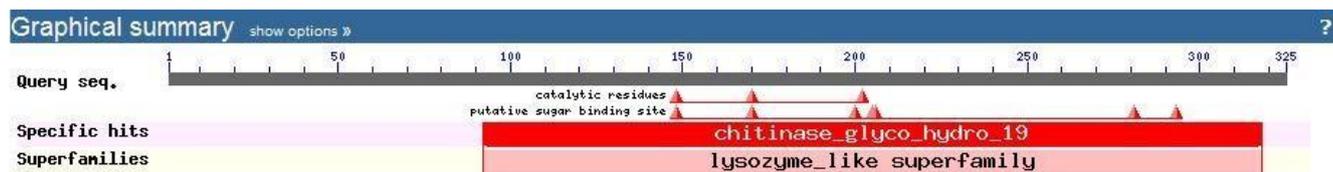


Figura 11. dominio conservato delle chitinasi

La maggior parte delle sequenze codificanti chitinasi si dispongono sullo stesso ramo dell'albero filogenetico, mostrando così un'elevata omologia (Fig.12)

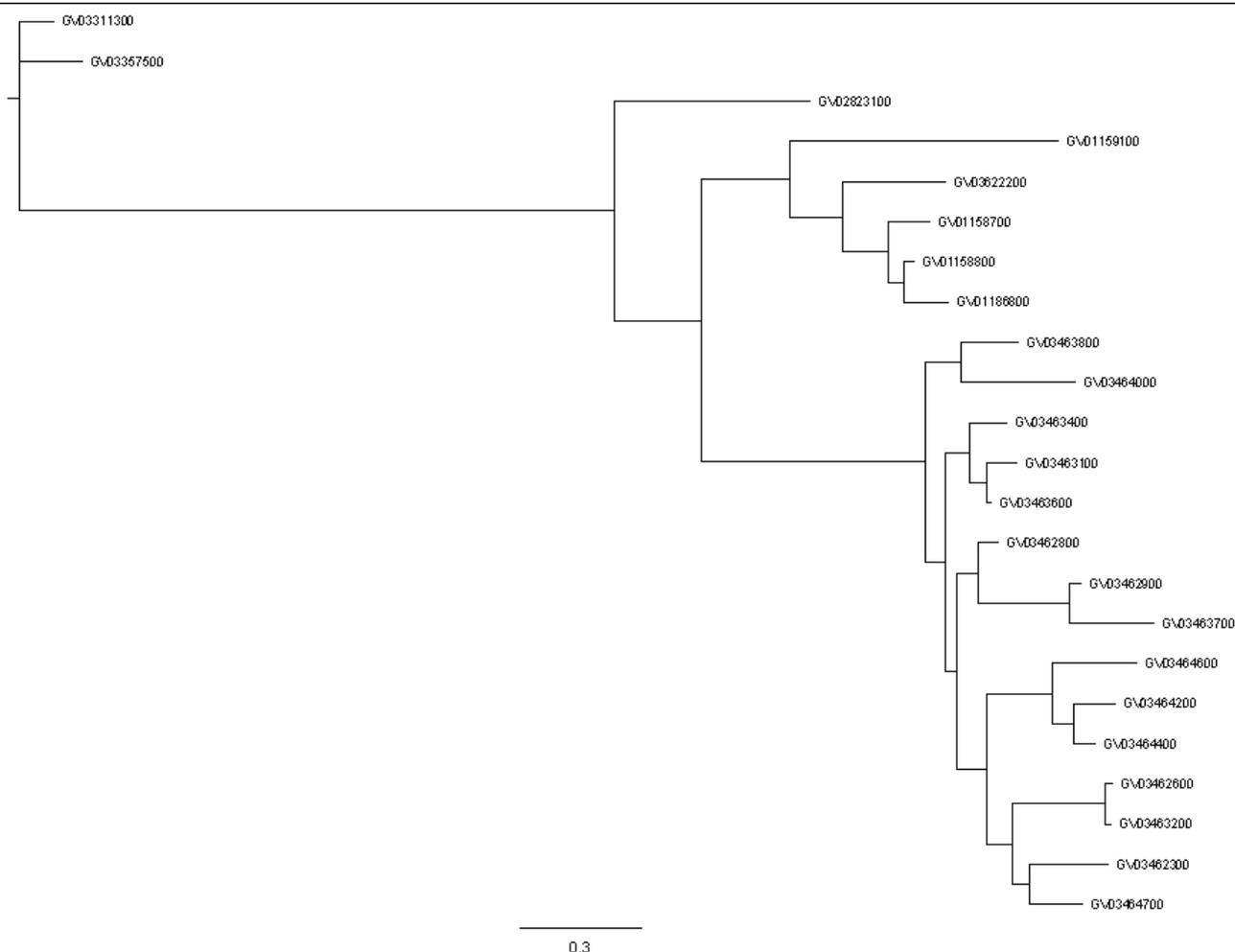


Figura 12. albero filogenetico delle chitinasi di vite

Cellulasi (endo-(1-4)- β -glucanasi)

Le cellulasi sono un'importante famiglia di enzimi che si trovano in molte specie di piante, batteri, funghi e lieviti. Le piante codificano per cellulasi che catalizzano il taglio dei legami interni di tipo 1,4- β -glucosidici della cellulosa. Le cellulasi vegetali avrebbero un ruolo in molti ambiti dello sviluppo della pianta, tra cui l'abscissione, il softening dei frutti, il differenziamento vascolare e la simbiosi.

Il genoma 8.4X di *Vitis vinifera* contiene 20 diverse sequenze corrispondenti a endo-1,4- β -glucanase, contenenti il dominio conservato glico-idro-9 (Fig.13), (Appendice 7).

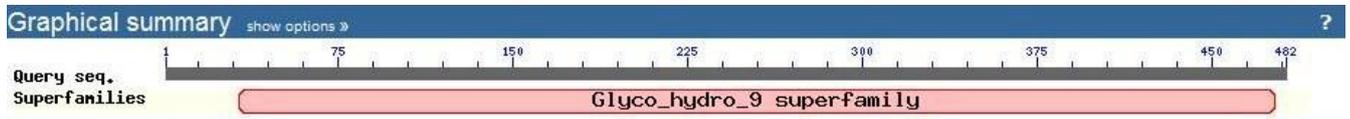


Figura 13. dominio conservato delle cellulasi

Le cellulasi di vite mostrano un'elevata omologia di sequenza, osservabile nell'albero filogenetico rappresentato in figura 14.

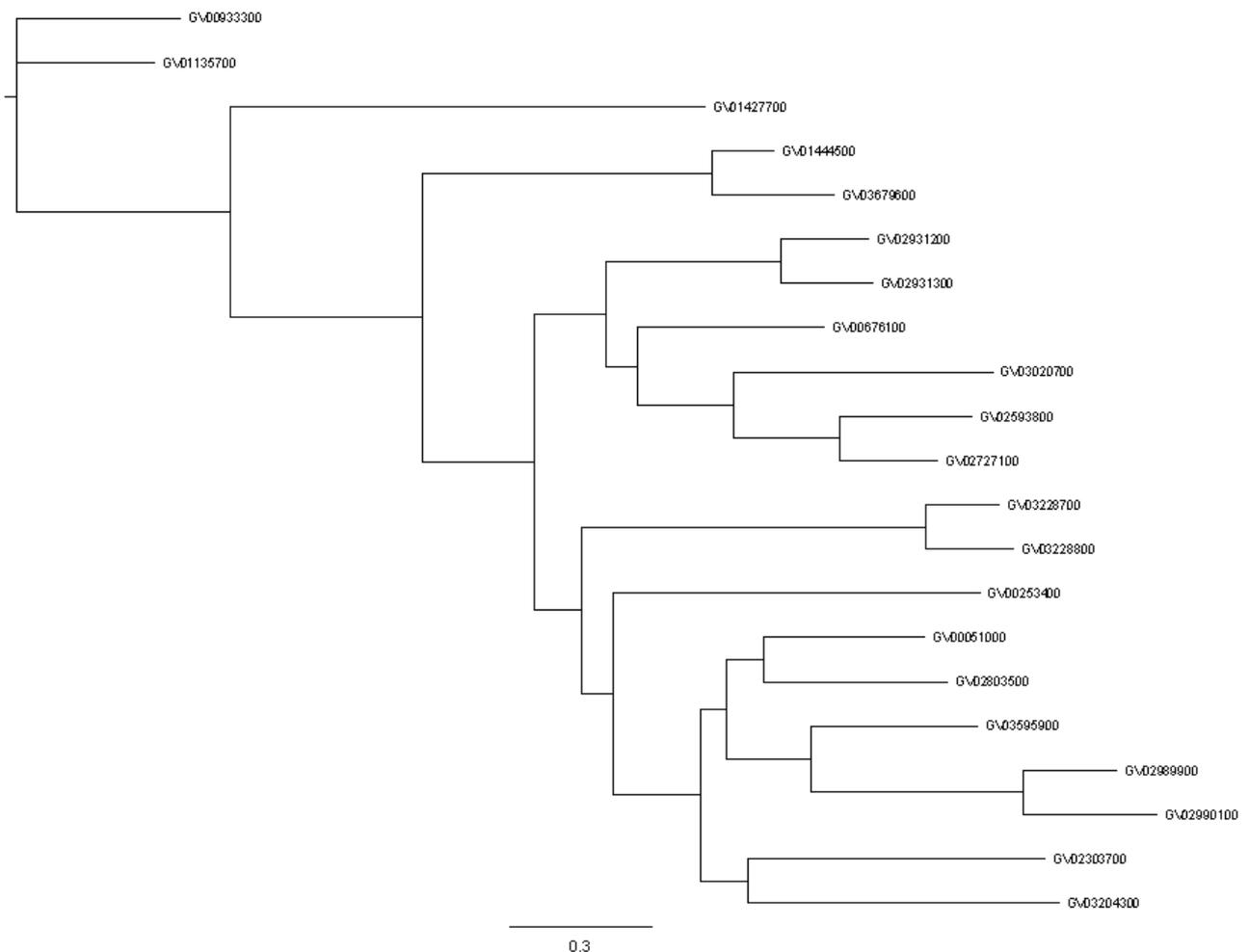


Figura 14. albero filogenetico delle cellulasi di vite

Cellulosa sintasi

La superfamiglia delle cellulosa sintasi è stata suddivisa in nove famiglie cellulose sintesi simili (Csl) e una famiglia di cellulose sintasi propriamente dette (CesA). Il sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* ha permesso di classificare i geni coinvolti nella biosintesi della cellulosa in una famiglia CesA e sei famiglie Csl (CslA/B/C/D/E/G), sulla base di analisi filogenetiche (Richmond and Somerville, 2000). Studi successivi (Yin et al., 2009) hanno permesso di identificare altre due famiglie di Csl, che sono CslF e CslH.

I geni appartenenti alla superfamiglia delle cellulosa sintasi sono tra i più importanti attori della biosintesi della parete cellulare, composta principalmente da biopolimeri quali cellulosa, emicellulosa, pectina e lignina. Le elevate omologie di sequenza dei geni Csl con i geni CesA, hanno fatto avanzare l'ipotesi che essi siano coinvolti nella biosintesi dello scheletro delle emicellulose. La cosiddetta "ipotesi CSL" suggerisce che CslA codifichi per la mannano sintasi (Dhugga et al., 2004; Liepman et al., 2005), CslF e CslH codifichino per la glucano sintasi (Doblin et al., 2009; Burton et al., 2006) ed infine i geni CslC sarebbero coinvolti nella biosintesi dello xiloglucano (Cocuron et al., 2007). Il ruolo funzionale delle altre famiglie Csl (B/D/E/G) resta ancora da definire.

Il genoma 8.4X di *Vitis vinifera* contiene 66 sequenze codificanti cellulosa sintasi, contenenti il dominio conservato GTA (Fig. 15). (Appendice 8). Le glicosiltransferasi (GTA) sono enzimi che sintetizzano oligosaccaridi, polisaccaridi e glicoconjugati attraverso il trasferimento di una molecola di zucchero da un donatore attivato ad un accettore, che può essere rappresentato da un oligosaccaride, un lipide o una proteina.

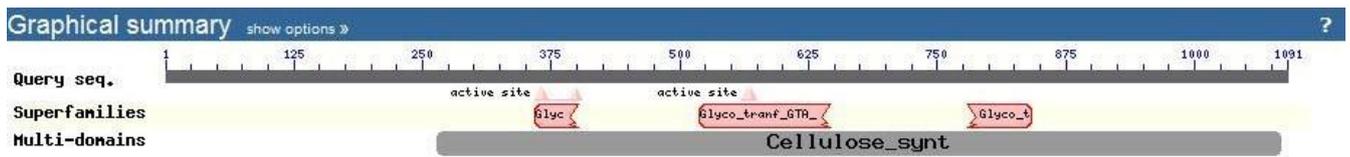


Figura 15. dominio conservato delle cellulosa sintasi

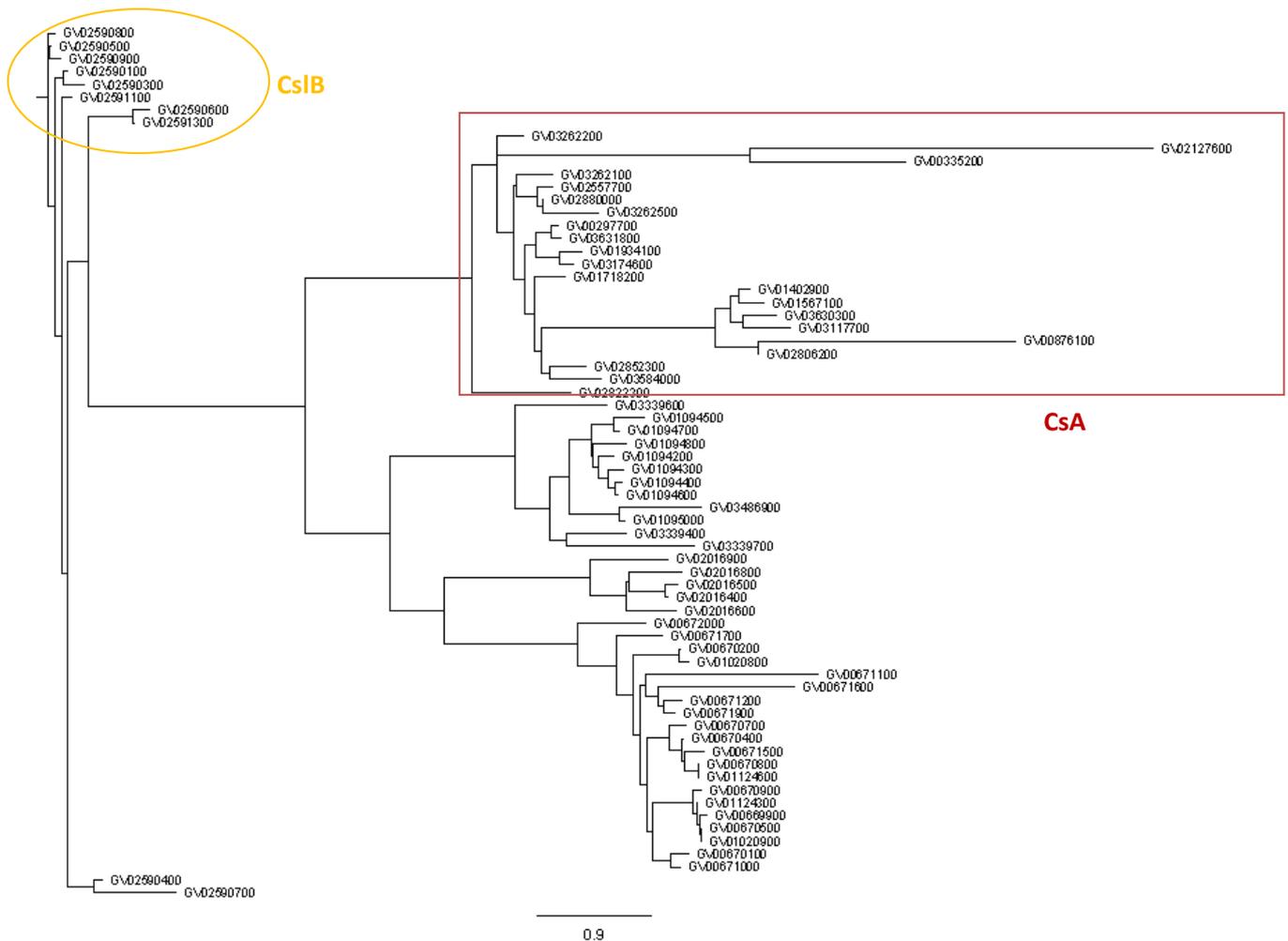


Figura 16. albero filogenetico delle cellulosa sintasi

L'albero filogenetico (Fig. 16) mostra che i membri della sottofamiglia CslB si localizzano nello stesso clade, così come i membri della famiglia CsA. La disposizione delle sequenze amminoacidiche sull'albero filogenetico conferma quindi i dati presenti in letteratura (Richmond and Somerville, 2000; Yin et al., 2009).

Invertasi

L'accumulo di zuccheri nella forma di glucosio e fruttosio, all'interno del vacuolo, è uno dei principali eventi che caratterizza il processo di maturazione della bacca di vite; il saccarosio viene prodotto nella foglia come risultato della fotosintesi e viene poi trasportato per via floematica alla bacca (Swanson and Elshishiny, 1958), dove viene scisso in eguale quantità nei monosaccaridi componenti.

In *Vitis vinifera* l'invaiaura segna l'inizio dell'accumulo degli zuccheri e tale evento continua durante tutta la maturazione. L'enzima invertasi (P-fructosidase; EC 3.2.1.26), che catalizza la conversione del saccarosio in glucosio e fruttosio, è il probabile responsabile di questa reazione nelle bacche e nelle specie vegetali che accumulano zuccheri in questo modo.

Le invertasi sono classificate in tre sottofamiglie sulla base delle proprietà biochimiche e della loro presunta localizzazione subcellulare (Tymowska-Lalanne and Kreis 1998). Le invertasi vacuolari e di

parete hanno un optimum di attività a pH acido e sono associate all'osmoregolazione, alla risposta alle ferite o all'infezione da parte di patogeni e al "sweetening" indotto dal freddo tra i diversi taxa vegetali (Sturm and Tang 1999; Roitsh and Gonzales 2004).

L'attività delle invertasi di parete aumenta nella bacca all'inizio della maturazione (Zhang et al., 2006), mentre l'espressione delle invertasi vacuolari è sotto-regolata durante lo stesso periodo (Davies and Robinson 1996).

Le invertasi neutre hanno un optimum di attività a pH neutro-alcalino e sono espresse nei "sinks" che accumulano zucchero (Gallagher and Pollock 1998; Sturm et al., 1999; Bosch et al., 2004), tra cui i frutti maturi (Nonis et al., 2007).

Dall'analisi blast effettuata sul database 8.4X di *Vitis vinifera* a partire da un invertasi di riso (Q9ZTW9_ORYSA) sono state identificate 7 sequenze codificanti invertasi vacuolari e di parete, tutte rappresentate sul chip Grape array 1.2 (contenenti il dominio conservato glicoside-idrolasi 32) (Fig.17).

Le 9 sequenze codificanti invertasi neutre sono state recuperate dalla letteratura (Nonis et al., 2008) Tutte le sequenze trovate contengono il dominio conservato tipico della famiglia delle glicoside-idrolasi 32. (Appendice 9)

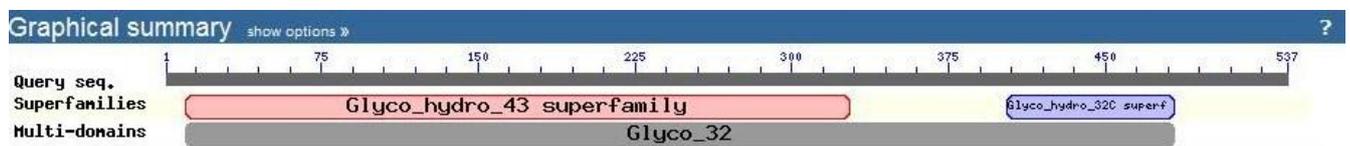


Figura 17. dominio conservato delle invertasi

L'albero filogenetico è stato effettuato solamente sulle invertasi vacuolari e di parete; è interessante notare come le sequenze corrispondenti alle due invertasi vacuolari GIN1 (GSVIVP00029907001) e GIN2 (GSVIVP00004764001) mostrino una filogenesi distinta dalle invertasi di parete che sono rappresentate in un clade separato (Fig.18).

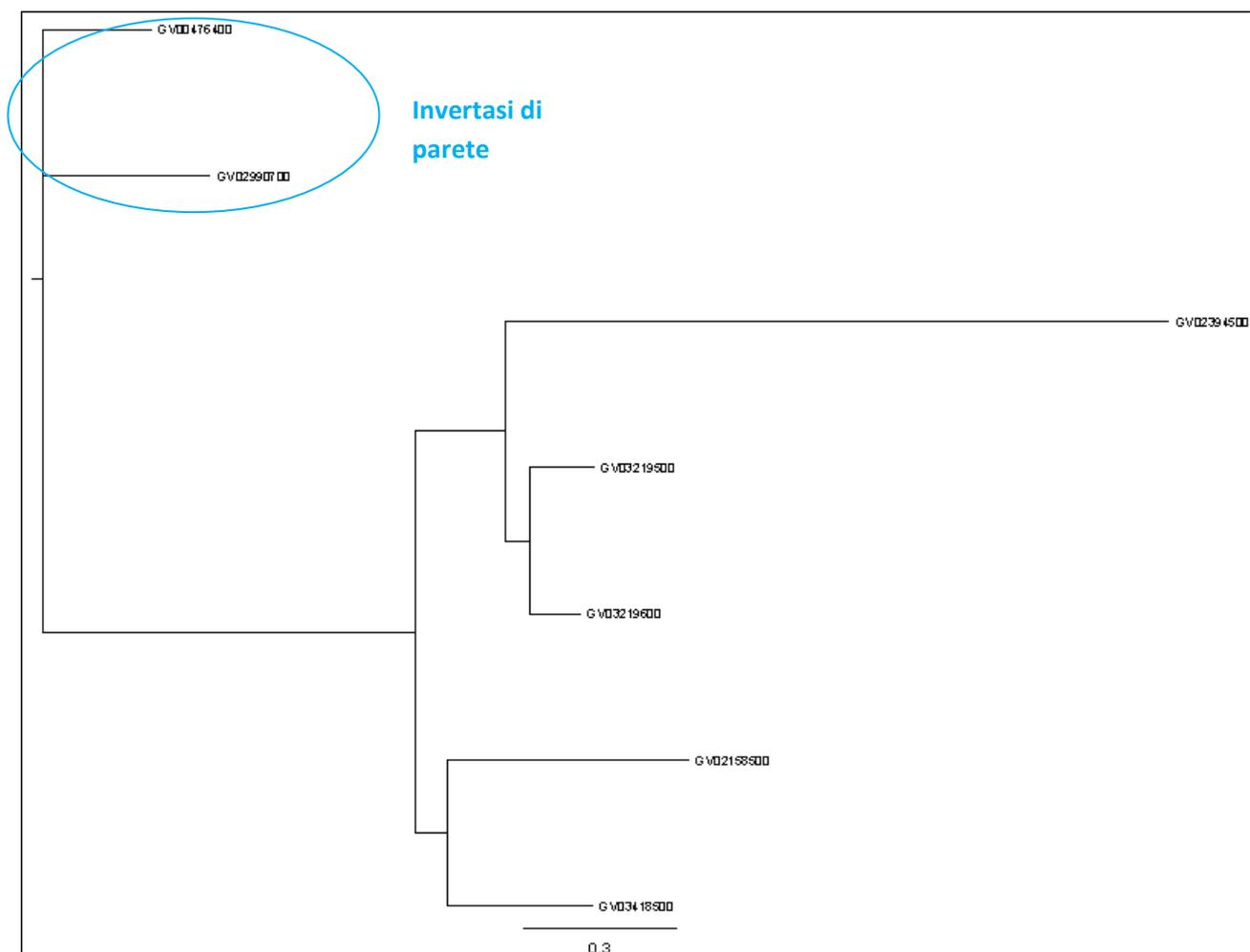


Figura 18. albero filogenetico delle invertasi di vite

Analisi di espressione delle famiglie geniche durante la maturazione e l'appassimento

L'RNA totale è stato isolato in triplicato da bacche di uva campionate durante la maturazione (veraison, pre-maturazione, maturazione) e il processo tecnologico di appassimento (I, II e III mese) ed è stata effettuata un'analisi del trascrittoma attraverso l'utilizzo di un chip Combimatrix 90K contenente 24562 trascritti di vite; il chip è stato disegnato sulla base delle sequenze derivanti dal "TIGR *Vitis vinifera* Gene Index Release 5.0 e dal progetto di sequenziamento del genoma di vite. Al fine di trovare una corrispondenza tra le 21068 sonde disegnate su TC, ET e "singletons" e i geni del sequenziamento 8.4X, è stato effettuato un mega blast sul database del genoma 8.4X, utilizzando dapprima come "query" le sonde di 35 nucleotidi. In questo modo 7975 sonde hanno trovato corrispondenza con i geni 8.4X.

Successivamente, per aumentare il numero di correlazioni, si sono utilizzate come "query" le sequenze dei TC e dei "singletons", ottenendo così una corrispondenza di altre 17611 sonde con il genoma 8.4X. Quindi 21105 sonde su 24562 sono specifiche per i geni 8.4X.

Nella seguente tabella vengono riportati, per ogni famiglia genica studiata, il numero di sequenze trovate nel genoma ed il numero di sequenze presenti sul chip Grape Array 1.2 (Tabella 2).

Famiglie	N° di geni nel genoma di <i>Vitis vinifera</i>	N° di geni rappresentati sul chip
Acquaporine	28	15
Chitinasi	23	11
Cellulosa sintasi	67	32
Cellulasi	20	14
Invertasi	7 + 9	7 + 5
Pectato liasi	15	11
Pectinmetilesterasi	55	25
Poligalatturonasi	74	25
Xiloglucano endotransglicosilasi	38	25

Tab.2. numero di sequenze trovate nel genoma di vite e numero di sequenze riportate sul chip grape array 1.2

I dati di espressione ottenuti dall'analisi microarray sono stati filtrati e normalizzati tramite una strategia "global median normalization", ottenendo un set di 16102 trascritti ritenuti "consistenti" tra le ripetizioni tecniche all'interno del chip ed espressi in almeno uno dei sei tempi di campionamento scelti.

I geni differenzialmente espressi sono stati identificati tramite un approccio "multi-class SAM"; scegliendo un valore di FDR pari all'1% 6364 trascritti sono risultati differenzialmente espressi in almeno uno stadio di maturazione e appassimento della bacca.

Da questi geni è stato estratto un sottogruppo di 6179 probes che risultavano modulati due o più volte rispetto ad uno stadio nel corso del campionamento della bacca.

Per ogni famiglia sono stati identificati i geni non espressi, i geni espressi ma non modulati durante lo sviluppo, i geni differenzialmente espressi ed i geni non consistenti per l'analisi statistica.

Pectinmetilesterasi in vite

Tra le 55 sequenze identificate nel genoma 8.4X di *Vitis vinifera* cv Corvina, 25 sono rappresentate sul chip Grape array 1.2 e sono riportate nella seguente tabella. Dall'analisi statistica, 8 sequenze sono risultate non espresse, 10 non sono modulate, mentre 5 mostrano una modulazione significativa rispetto ad uno degli stadi analizzati (Tab.3).

Codice 8.4X	Grape Array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00017266001	GSVIVT00017266001			*	
GSVIVT00033939001	GSVIVT00033939001			*	
GSVIVT00006908001	TC62593			*	
GSVIVT00021009001	TC63388			*	
GSVIVT00026390001	TC69684			*	
GSVIVT00009598001	GSVIVT00009598001	*			
GSVIVT00012763001	GSVIVT00012763001	*			
GSVIVT00030551001	TC52948	*			
GSVIVT00029904001	TC56663	*			
GSVIVT00028034001	TC57247	*			
GSVIVT00016357001	TC63693	*			
GSVIVT00028252001	TC64421	*			
GSVIVT00026388001	TC69052	*			
GSVIVT00019719001	GSVIVT00019719001				*
GSVIVT00028162001	GSVIVT00028162001				*
GSVIVT00033558001	GSVIVT00033558001				*
GSVIVT00033995001	TC53652				*
GSVIVT00017269001	TC55078				*
GSVIVT00034843001	TC58800				*
GSVIVT00016359001	TC62346				*
GSVIVT00014144001	TC63208				*
GSVIVT00022520001	TC67636				*
GSVIVT00037264001	TC69709				*
GSVIVT00016652001	TC61993		*		
GSVIVT00016358001	TC68710		*		

Tab.3. andamento dei geni codificanti PME nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00017266001	1	1,80	1,25	1,38	1,81	3,25
GSVIVT00033939001	1	1,60	1,01	-1,34	-1,41	-1,23
GSVIVT00006908001	1	1,59	1,05	-1,27	-1,40	-1,47
GSVIVT00021009001	1	-1,95	1,22	1,90	2,63	2,50
GSVIVT00026390001	1	1,97	2,34	5,84	4,61	4,30

Tab.4. andamento dei geni modulati

La famiglia delle PME mostra 3 geni sovra espressi durante l'appassimento, in particolare l'espressione di GSVIVT00017266001 aumenta durante il terzo stadio (Fig.19). GSVIVT00021009001 è sottoespresso durante la prematurazione e presenta un picco di espressione al secondo stadio di appassimento, mentre GSVIVT00026390001 è altamente espresso al primo stadio di appassimento.

Nel caso di GSVIVT00006908001 e GSVIVT00033939001, il pattern di espressione presenta un aumento dell'abbondanza del trascritto durante la prematurazione, seguita da una diminuzione nei tre stadi di appassimento.

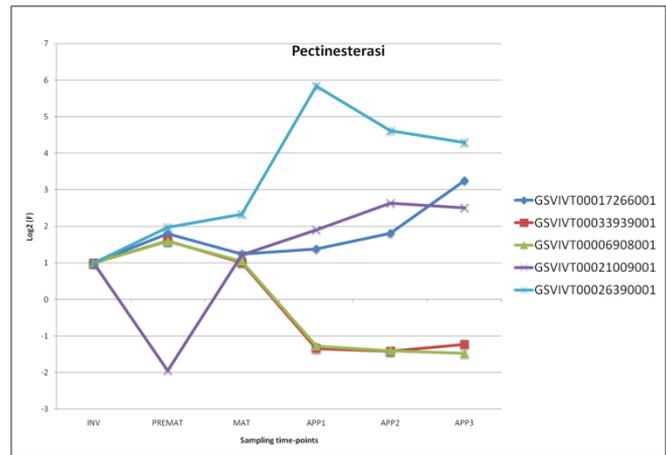


Figura 19. grafico dell'andamento dei geni modulati

Per investigare in dettaglio il comportamento di uno dei geni risultati differenzialmente espressi dall'analisi microarray durante i sei stadi di sviluppo, l'RNA totale è stato isolato da polpa e buccia separatamente e il cDNA è stato sintetizzato. La presenza di una sequenza 3'UTR adatta, ha permesso di disegnare una coppia di primers specifica per il gene GSVIVT00026390001 in esame.

I livelli di espressione di GSVIVT00026390001 mostrano un andamento crescente, a partire dall'invaiaitura, fino al primo stadio di appassimento, dove raggiungono un picco, per poi decrescere negli ultimi due stadi esaminati. Il comportamento è simile nella buccia e nella polpa, ma in quest'ultima il livello di espressione risulta più elevato (Fig.20).

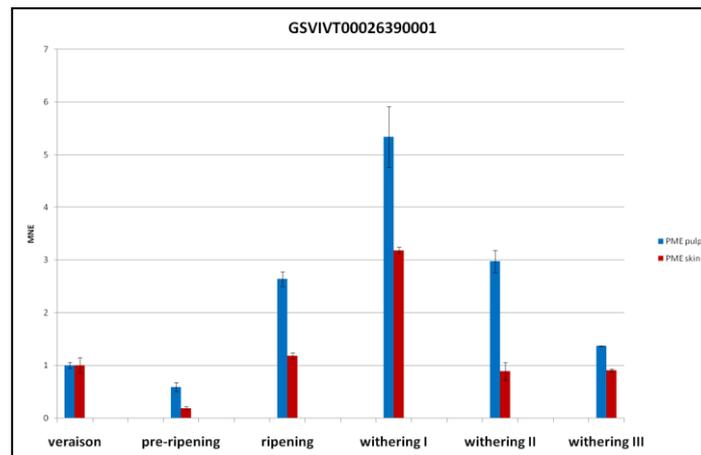


Figura 20. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00026390001

L'attività dell'enzima pectinmetilesterasi è stata studiata, per la prima volta, in tessuti isolati rappresentati dalle bucce d'uva, da Deytieux-Belleau et al. nel 2008. Dati precedenti si riferivano infatti ad analisi effettuate nel mesocarpo di bacche di *Vitis vinifera* cv Muscat Gordo o cv Ugni Blanc (Nunan et al., 2001; Barnavon et al., 2001). Deytieux-Belleau et al.,(2008) hanno quindi determinato l'attività delle PME nelle bucce di bacche di *Vitis vinifera* cv Cabernet sauvignon durante il processo di

maturazione, mediante la quantificazione del metanolo che viene prodotto dall'azione delle PME estratte, su un substrato specifico. L'attività delle PME associate alla parete cellulare è già presente a 40 giorni postantesi, aumenta fino all'invasatura e poi diminuisce, raggiungendo un minimo, a 60 giorni postantesi, per poi risalire a completa pigmentazione delle bacche. Parallelamente all'analisi dell'attività, è stata determinata l'espressione del gene *VvPME1* (GSVIVT00035359001) nelle bucce di *Vitis vinifera* cv Cabernet sauvignon; il gene è espresso durante tutti gli stadi analizzati e mostra il suo massimo a 60 giorni postantesi, momento in cui tutti i frutti sono rossi. Il pattern di espressione nelle bucce mature è quindi temporalmente correlato con il pattern di attività enzimatica, in quanto nel momento in cui l'attività enzimatica è appena rilevabile (60DAA), l'espressione del gene *VvPME1* è minima.

In questo lavoro, l'attività è stata analizzata sulle PME estratte sia dalla buccia sia dalla polpa, in un range di tempo molto ampio, che va dall'invasatura fino al completo appassimento. La metodica utilizzata è quella di Downie et al.,(1998) mediante gel diffusione.

Le proteine estratte nei sei stadi di sviluppo e poste in un opportuno tampone, sono state fatte reagire con un substrato commerciale costituito da pectina di agrume. A fine reazione il gel è stato trattato con una soluzione acquosa di Ruthenium Red allo 0.05% (p/v), un colorante specifico per la pectina demetossilata.

Poiché l'enzima migra radialmente nel gel e solo la pectina demetossilata reagisce con il colorante, come risultato si è ottenuto un cerchio colorato la cui area è proporzionale all'attività dell'enzima.

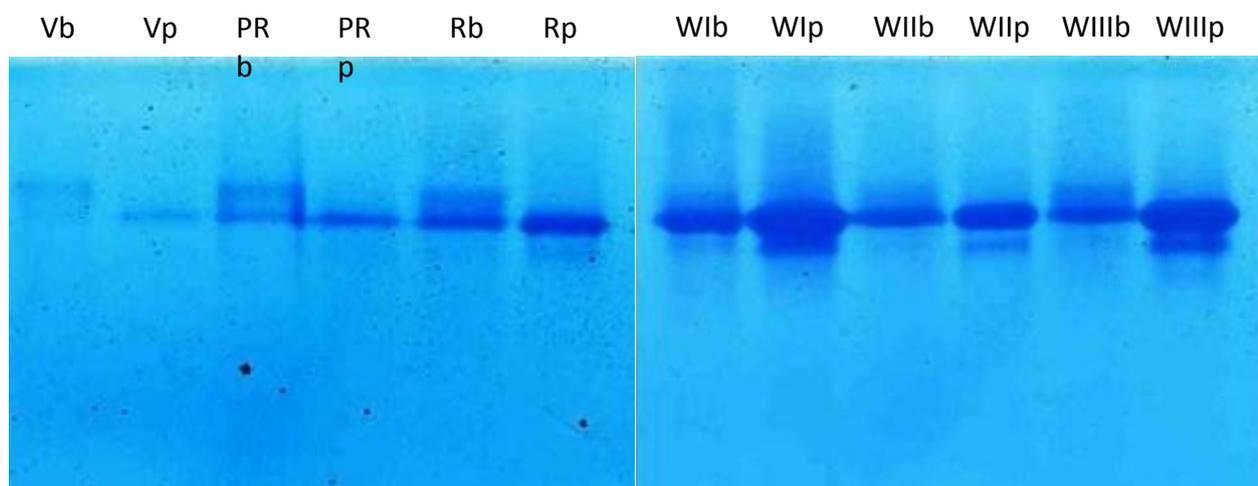


Figura 21. analisi dell'attività enzimatica delle PME

Dall'analisi della figura 21 è possibile notare un aumento progressivo dell'attività a partire dall'invasatura, per entrambi i tessuti esaminati. Lo stadio di maturazione segnerebbe l'inizio di una maggiore attività enzimatica nella polpa rispetto alla buccia.

Se si confrontano il pattern di espressione del gene GSVIVT00026390001 con l'attività enzimatica di tutte le PME estratte da buccia e polpa, è possibile notare come ad una maggiore quantità di trascritto rilevata nella polpa corrisponda una maggior attività dell'enzima e come le due analisi mostrino un andamento speculare fino allo stadio di appassimento I. Durante l'appassimento II e III, l'attività dell'enzima rimane alta in entrambi i tessuti, mentre il trascritto del gene GSVIVT00026390001 diminuisce.

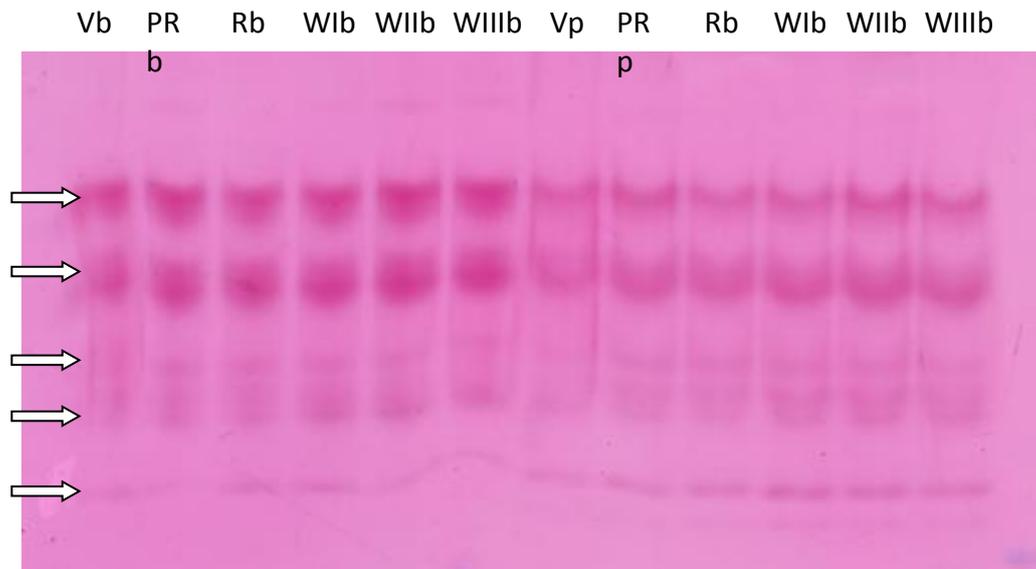


Figura 22. analisi dell'attività enzimatica delle PME mediante isoelettrofocalizzazione

L'analisi mediante isoelettrofocalizzazione (Fig.22) permette di distinguere meglio le cinque isoforme e mostra come l'intensità delle bande diminuisca negli stadi di appassimento, per entrambi i tessuti, polpa e buccia, coerentemente con i dati di espressione.

Poligalatturonasi in vite

Lo screening del genoma 8.4X di *Vitis vinifera* ha permesso di identificare 74 sequenze codificanti poligalatturonasi, di cui 25 sono presenti sul chip Grape array 1.2. L'analisi statistica effettuata sui dati di ibridazione, mostra come solamente tre sequenze sono risultate modulate in almeno uno degli stadi analizzati (Tab.5).

Codice 8.4X	Grape array 1.2	NON ESPRESI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00028177001	GSVIVT00028177001			*	
GSVIVT00028234001	TC59916			*	
GSVIVT00025529001	TC66168			*	
GSVIVT00029167001	GSVIVT00029167001				*
GSVIVT00033721001	GSVIVT00033721001				*
GSVIVT00002441001	TC52140				*
GSVIVT00000091001	TC56906				*
GSVIVT00028037001	TC57257				*
GSVIVT00033044001	TC57956				*
GSVIVT00002554001	TC59719				*
GSVIVT00034593001	TC60288				*
GSVIVT00029160001	TC63420				*
GSVIVT00000358001	GSVIVT00000358001	*			
GSVIVT00002738001	GSVIVT00002738001	*			
GSVIVT00020714001	TC70021	*			
GSVIVT00002763001	GSVIVT00002763001		*		
GSVIVT00026920001	TC52273		*		
GSVIVT00019678001	TC54436		*		
GSVIVT00028783001	TC57725		*		
GSVIVT00028778001	TC58604		*		
GSVIVT00037721001	TC60770		*		
GSVIVT00000355001	TC62623		*		
GSVIVT00025519001	TC63753		*		
GSVIVT00025571001	TC69506		*		
GSVIVT00037720001	TC70088		*		

Tabella 5. andamento dei geni codificanti PG nell'analisi microarray

Le tre sequenze geniche modulate, GSVIVT00028177001, GSVIVT00028234001 e GSVIVT00025529001, sono tutte sottoesprese durante l'appassimento; GSVIVT00028177001 e GSVIVT00028234001 mostrano un picco di espressione durante la prematurazione, stadio nel quale la sequenza GSVIVT00025529001 raggiunge il suo minimo (Tab.6).

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00028177001	1,00	1,31	-1,10	-1,72	-2,13	-2,96
GSVIVT00028234001	1,00	1,33	-1,12	-2,28	-2,49	-2,80
GSVIVT00025529001	1,00	-3,25	-2,69	-2,87	-3,11	-3,44

Tabella 6. andamento dei geni modulati

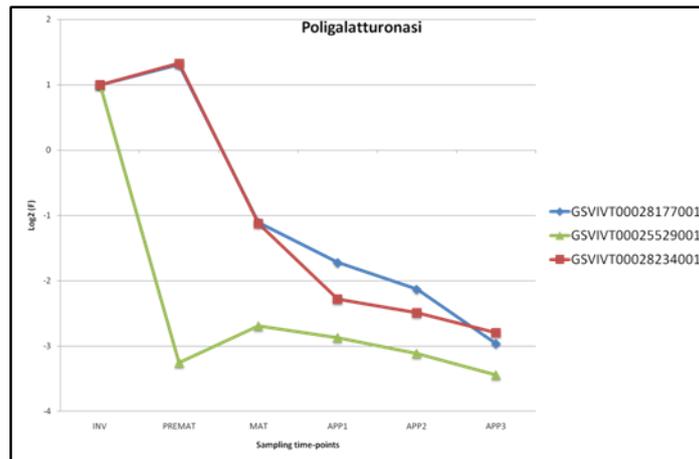


Figura 23. grafico dell'andamento dei geni modulati

L'analisi Real time RT-PCR è stata effettuata sul gene GSVIVT00028234001, che mostra un picco di espressione, per la polpa, durante la prematurazione e un brusco calo del livello di trascritto negli stadi successivi (Fig.24).

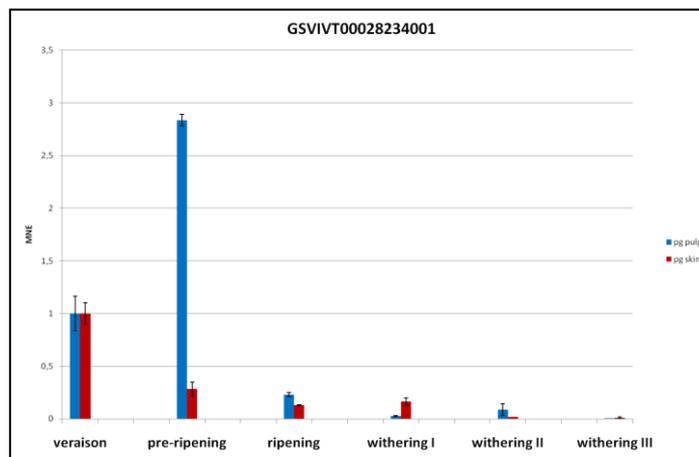


Figura 24. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00028234001

Dati in letteratura (Deytieu-Belleau et al., 2008) riportano informazioni riguardo l'espressione in buccia di un altro gene, GSVIVT00025571001 (*VvPG1*), durante lo sviluppo della bacca. Il trascritto non era presente prima dell'invasatura, ma mostrava un abbondante accumulo durante il periodo in cui la bacca cambiava colore, per poi decrescere durante la maturazione. Al momento della raccolta, i trascritti di *VvPG1* tornavano ad accumularsi ad un livello equivalente a quello dell'inizio della maturazione. L'espressione risultava quindi più bassa allo stadio intermedio di maturazione (71 giorni dopo l'antesi) e aumentava drasticamente a maturità.

Analogamente al gene *VvPG1*, l'accumulo di trascritto del gene GSVIVT00028234001, è massimo in fase di prematurazione, ma l'espressione decresce in maniera netta negli stadi successivi, a partire dalla maturazione.

L'attività delle PG è stata determinata in piastra, per gel diffusione (Fig.25); le proteine PG sono state estratte dalle bucce e sono state fatte reagire con il substrato acido poligalatturonico (SIGMA); a fine reazione il gel è stato trattato con una soluzione acquosa di Ruthenium Red allo 0.05% (p/v). Dall'immagine riportata si può notare come vi sia attività solamente negli stadi di appassimento WI e

WIII, nei quali sono presenti rispettivamente 1 e 2 isoforme. Il tentativo di estrazione delle PGA dalle polpe non ha invece portato alcun risultato.

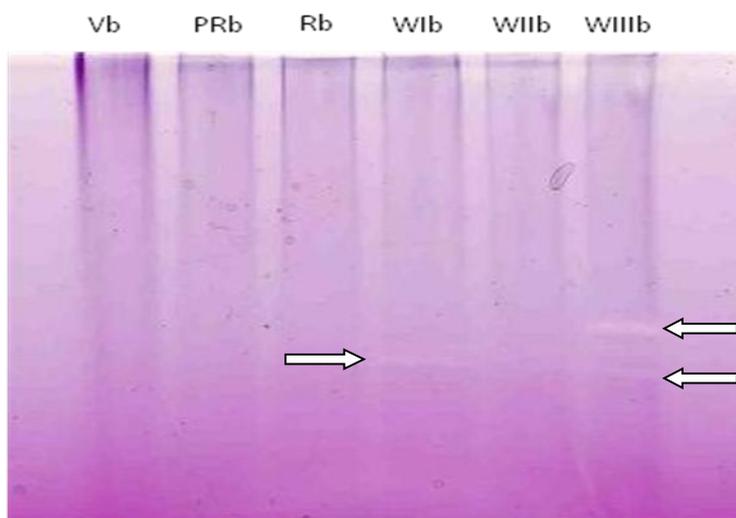


Figura 25. analisi dell'attività enzimatica delle PG

Se si confrontano i dati di ibridazione con l'attività delle PGA si può notare come le tre sequenze geniche analizzate abbiano espressione minima negli stadi in cui sono presenti le isoforme enzimatiche. Sarebbe interessante ripetere gli esperimenti di ibridazione avendo a disposizione un chip contenente tutte le 74 sequenze codificanti per poligalatturonasi, per vedere se qualche isoforma viene espressa in fase di appassimento. Con i dati a disposizione, si può comunque giustificare la presenza di poligalatturonasi durante l'appassimento, data la presenza di almeno 5 isoforme di PME negli stessi stadi, le quali agirebbero rendendo accessibili i poligalatturonani all'azione delle PG.

In letteratura non sono riportati dati riguardanti l'attività delle PGA nella vite; Deytieux-Belleau et al. (2008) non hanno infatti rilevato alcuna attività apprezzabile nelle bacche della varietà Cabernet Sauvignon raccolte fino a maturazione.

Pectato liasi in vite

Sul chip Grape Array 1.2 sono presenti 11 sequenze, 4 delle quali sono risultate modulate durante i sei stadi di sviluppo esaminati (Tab.7).

Codice 8.4X	Grape Array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00000608001	TC59761			*	
GSVIVT00018131001	CF404655			*	
GSVIVT00020459001	TC65623			*	
GSVIVT00030705001	TC53176			*	
GSVIVT00001248001	TC62936		*		
GSVIVT00015920001	CN545514				*
GSVIVT00018134001	GSVIVT00018134001				*
GSVIVT00020601001	TC62787				*
GSVIVT00023108001	TC67683	*			
GSVIVT00029520001	TC64831				*

Tabella 7. andamento dei geni codificanti PL nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00000608001	1,00	2,06	1,22	1,46	-1,22	-1,38
GSVIVT00018131001	1,00	-1,92	-2,13	-4,29	-3,88	-3,36
GSVIVT00020459001	1,00	-7,87	-6,47	-18,83	-13,37	-15,31
GSVIVT00030705001	1,00	-5,08	-5,39	-7,85	-5,12	-4,76

Tabella 8. andamento dei geni modulati

Rispetto all'invaiaitura, i geni GSVIVT00018131001, GSVIVT00020459001 e GSVIVT00030705001 sono sottoespressi ed il livelli di trascritto resta basso per tutto il periodo di sviluppo analizzato. Il gene GSVIVT00000608001 è invece sovra-regolato fino al primo stadio di appassimento, dopo il quale la sua espressione diminuisce (Tab.8, Fig. 26).

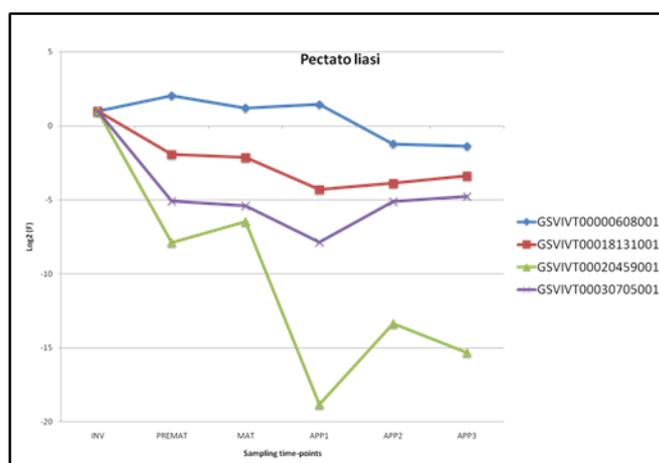


Figura 26. grafico dell'andamento dei geni modulati

L'analisi Real time RT-PCR è stata effettuata sulla sequenza GSVIVT00020459001 e mostra un'espressione elevata in fase di invaiatura e prematurazione, minima in fase di maturazione e assente negli stadi rimanenti (Fig.27).

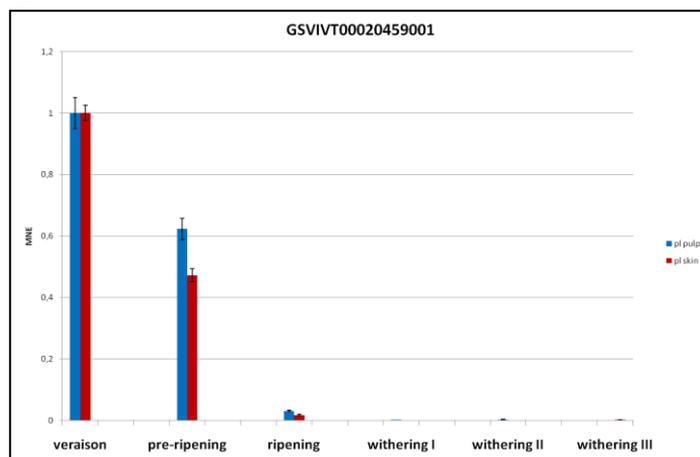


Figura 27. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00020459001

Nunan et al., (2001) hanno studiato l'espressione di questo gene (*VvPL1*), nei fiori e nelle bacche di uva Shiraz, mediante analisi Northern Blot e mostrano come il segnale di ibridazione sia massimo nel periodo immediatamente successivo all'invasatura, analogamente ai dati trovati dall'analisi di Real time RT-PCR.

Schlosser et al., 2008 hanno invece studiato l'espressione del gene GSVIVT00015920001, non modulato secondo l'analisi statistica effettuata, nel mesocarpo e nell'endocarpo di bacche di Cabernet Sauvignon durante lo sviluppo. Anche in questo caso, il livello di trascritto è massimo, per entrambi i tessuti, durante l'invasatura e decresce negli stadi successivi.

Xiloglucano endotransglicosilasi

Nel genoma 8.4X di *Vitis vinifera* sono state identificate 38 sequenze codificanti xiloglucano endotransglicosilasi, ma solamente 25 di queste sono presenti sul chip Grape Array 1.2 (Tab.9).

Codici 8.4X	Grape array 1.2	NON ESPRESI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00031408001	GSVIVT00031408001			*	
GSVIVT00031397001	TC55095			*	
GSVIVT00006236001	TC56669			*	
GSVIVT00015670001	TC60685			*	
GSVIVT00003478001	TC64184			*	
GSVIVT00022167001	TC65841			*	
GSVIVT00031410001	CF212592				*
GSVIVT00006913001	GSVIVT00006913001				*
GSVIVT00028840001	GSVIVT00028840001				*
GSVIVT00031412001	GSVIVT00031412001				*
GSVIVT00033487001	TC52361				*
GSVIVT00030638001	TC53835				*
GSVIVT00007248001	TC55069				*
GSVIVT00026138001	TC62471				*
GSVIVT00031407001	TC63145				*
GSVIVT00031405001	GSVIVT00031405001	*			
GSVIVT00037032001	GSVIVT00037032001	*			
GSVIVT00003480001	TC59417	*			
GSVIVT00003461001	TC60314	*			
GSVIVT00000619001	GSVIVT00000619001		*		
GSVIVT00038589001	GSVIVT00038589001		*		
GSVIVT00031402001	TC52577		*		
GSVIVT00026115001	TC57673		*		
GSVIVT00031398001	TC60614		*		
GSVIVT00031406001	TC63269		*		

Tabella 9. andamento dei geni codificanti XET nell'analisi microarray

Tra le 25 sequenze rappresentate sul chip, 6 sono risultate differenzialmente espresse durante i sei stadi esaminati; il gene GSVIVT00015670001 è l'unico che mostra una sovra regolazione durante maturazione e appassimento, con un picco di espressione ($FC > 6$) al secondo stadio di appassimento (Tab.10).

Codici 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00031408001	1,00	-1,66	-1,32	-2,61	-3,12	-2,10
GSVIVT00031397001	1,00	-1,23	1,01	-2,92	-2,73	-2,77
GSVIVT00006236001	1,00	-1,92	-2,39	-5,73	-5,58	-5,35
GSVIVT00015670001	1,00	2,11	3,51	6,32	6,73	5,88
GSVIVT00003478001	1,00	-5,76	-5,40	-10,22	-10,97	-9,55
GSVIVT00022167001	1,00	-5,44	-1,96	-2,15	-4,11	-13,96

Tabella 10. andamento dei geni modulati

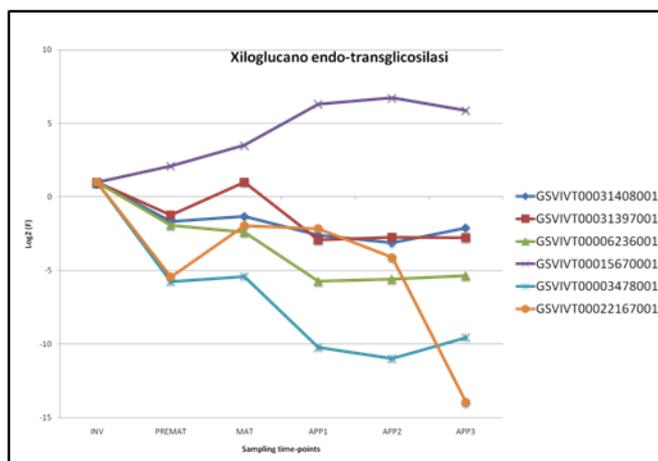


Figura 28. grafico dell'andamento dei geni modulati

Esperimenti di Real time RT-PCR eseguiti sullo stesso gene mostrano che l'espressione di GSVIVT00015670001 aumenta a partire dalla maturazione e resta alta durante l'appassimento (Fig.29).

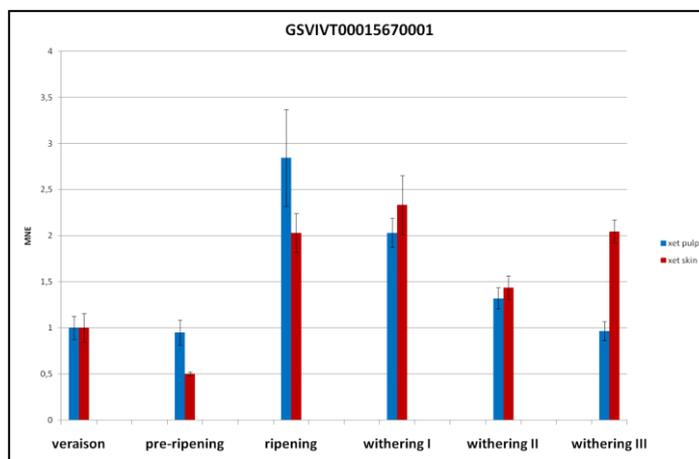


Figura 29. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00015670001

Analisi di espressione del gene *VvXET1* (GSVIVT00022167001), risultato significativamente modulato nell'analisi microarray, mostrano un segnale appena rilevabile prima dell'invasatura, seguito da una sovra regolazione negli stadi di crescita II e III (Ishimaru et Kobayashi, 2002), (Schlosser et al., 2008).

L'aumento di espressione coincide probabilmente con la depolimerizzazione dello xiloglucano, come osservato da Yakushiji et al. (2001), indicando un possibile ruolo delle XET nel softening. Data la

capacità di idrolizzare catene di glucani (1->4)- β , alcuni membri della famiglia delle endo- (1->4)- β -D-glucanasi possono idrolizzare anche xiloglucani e la cellulosa non cristallina (Brummel and Harpster 2001). Sebbene siano presenti in letteratura dati di espressione effettuati su pomodoro e fragola che supportano un ruolo di questi enzimi nella crescita del frutto (Brummel et al., 1997. Brummel and Harpster 2001), non si è ancora riusciti a rilevare attività delle XET durante la maturazione della bacca di vite (Nunan et al., 2001).

Acquaporine in vite

L'analisi microarray effettuata su larga scala ha mostrato che 9 delle 15 sonde corrispondenti ad acquaporine presenti sul chip sono modulate in maniera significativa durante i sei stadi di sviluppo analizzati (Tab. 11) e seguono globalmente un comune andamento decrescente, ad esclusione del gene GSVIVT00003903001 che appare invece sovra-regolato nei tre stadi di appassimento (Tab.12, Fig. 30).

Codice 8.4X	Grape Array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00000433001	BQ795622			*	
GSVIVT00000605001	TC53408			*	
GSVIVT00003903001	GSVIVT00003903001			*	
GSVIVT00013854001	TC69819			*	
GSVIVT00022146001	TC58583			*	
GSVIVT00023192001	TC60678			*	
GSVIVT00024536001	TC53235			*	
GSVIVT00026881001	TC60619			*	
GSVIVT00036133001	TC68434			*	
GSVIVT00000446001	TC70919				*
GSVIVT00026882001	CO819265				*
GSVIVT00029248001	TC51776		*		
GSVIVT00032441001	TC59205	*			
GSVIVT00033750001	GSVIVT00033750001		*		
GSVIVT00034350001	TC58032				*

Tabella 11. andamento dei geni codificanti AQ nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00000433001	1,00	-2,13	-2,41	-3,80	-4,18	-3,51
GSVIVT00000605001	1,00	-5,53	-7,53	-5,72	-8,19	-8,31
GSVIVT00003903001	1,00	2,43	1,89	3,64	3,51	3,04
GSVIVT00013854001	1,00	1,49	1,06	-1,78	-1,74	-1,71
GSVIVT00022146001	1,00	-11,49	-20,10	-17,25	-21,90	-21,06
GSVIVT00023192001	1,00	-4,68	-2,97	-6,69	-8,10	-6,99
GSVIVT00024536001	1,00	-9,70	-15,12	-12,20	-18,02	-19,09
GSVIVT00026881001	1,00	-7,15	-5,32	-10,74	-7,35	-6,18
GSVIVT00036133001	1,00	-6,64	-1,69	-11,94	-15,53	-27,13

Tabella 12. andamento dei geni modulati

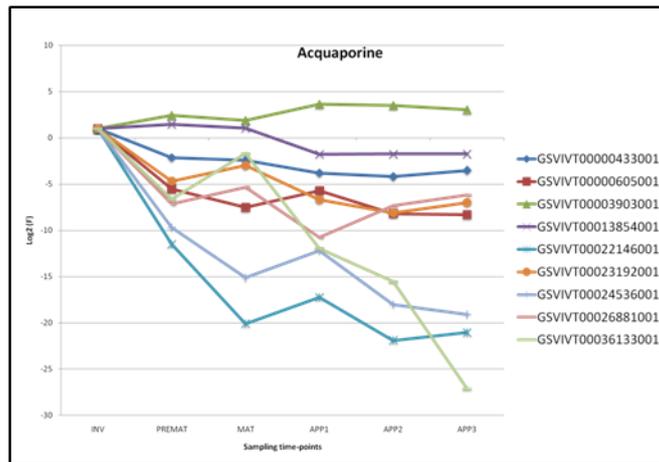


Figura 30. grafico dell'andamento dei geni modulati

Per validare i profili di espressione ottenuti mediante l'ibridazione microarray, è stato allestito un esperimento di Real time RT-PCR su una delle sequenze modulate, utilizzando una coppia di primers gene-specifica (Fig.31). L'andamento del gene *VvPIP1;2* (GSVIVT00026881001) è decrescente rispetto all'invasatura e si differenzia nei due tessuti analizzati in particolare negli stadi di maturazione, appassimento II e appassimento III.

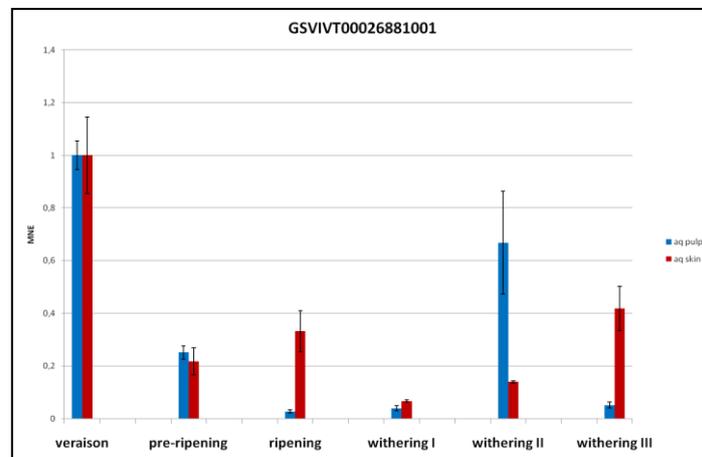


Figura 31. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00026881001

Dati in letteratura, mostrano che molte sequenze codificanti acquaporine sono espresse in maniera preferenziale prima o comunque fino all'inizio dello stadio di invasatura (Fouquet et al., 2008); risultati simili sono stati ottenuti da Deluc et al., (2007) e Pilati et al., (2007). Sebbene alcune acquaporine siano coinvolte nel trasporto di piccoli soluti neutri o gas (Kaldenhoff and Fischer 2006), la funzione centrale di tutte le proteine caratterizzate è quella di trasportare l'acqua. Se infatti ci si attiene solamente all'attività di canali dell'acqua, l'espressione preferenziale prima dell'invasatura è probabilmente associata ai meccanismi di divisione ed espansione cellulare, che avvengono durante la prima fase di crescita della bacca (Schlosser et al., 2008).

Chitinasi in vite

Nel genoma 8.4X di *Vitis vinifera* sono presenti 23 sequenze codificanti chitinasi che contengono il dominio conservato glico-idro-19; sul chip Grape Array 1.2 sono presenti 11 sonde corrispondenti a chitinasi e tra queste, 5 risultano differenzialmente espresse (Tab.13).

Codice 8.4X	Grape Array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00011591001	TC51975			*	
GSVIVT00033113001	TC51734			*	
GSVIVT00033575001	TC53891			*	
GSVIVT00034626001	TC57889			*	
GSVIVT00034638001	GSVIVT00034638001			*	
GSVIVT00011588001	TC51703	*			
GSVIVT00034636001	GSVIVT00034636001		*		
GSVIVT00034640001	TC62176				*
GSVIVT00034644001	TC66967				*
GSVIVT00034646001	TC70080				*
GSVIVT00034647001	TC63731				*

Tabella 13. andamento dei geni codificanti CHI nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00011591001	1,00	1,35	-1,12	-1,23	-1,79	-1,62
GSVIVT00033113001	1,00	-9,43	-3,93	-3,84	-5,98	-6,64
GSVIVT00033575001	1,00	-7,35	-2,61	-5,59	-5,59	-7,13
GSVIVT00034626001	1,00	1,82	1,64	2,87	3,06	3,29
GSVIVT00034638001	1,00	2,00	1,48	2,11	1,60	1,41

Tabella 14. andamento dei geni modulati

Le sequenze GSVIVT00034626001 e GSVIVT00034638001 sono sovra-regolate durante lo sviluppo e raggiungono la loro espressione massima durante l'appassimento; un andamento decrescente è visibile invece nel caso di GSVIVT00011591001, GSVIVT00033113001 e GSVIVT00033575001, sottoespresse già a partire dalla pre-maturazione (Tab.14), (Fig.32).

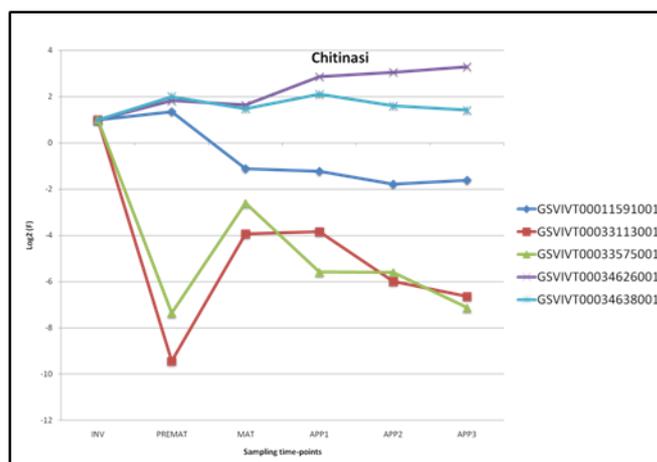


Figura 32. grafico dell'andamento dei geni modulati

A causa della difficoltà di disegnare una coppia di primers specifica per i geni risultati modulati dall'analisi microarray, l'analisi Real time RT PCR è stata effettuata sulla sequenza GSVIVT00034646001, espressa durante lo sviluppo, ma non significativa da un punto di vista statistico.

Il profilo del gene mostra un'espressione costante nella polpa, mentre l'andamento nella buccia evidenzia un picco nei stadi di pre-maturazione e maturazione (Fig. 33).

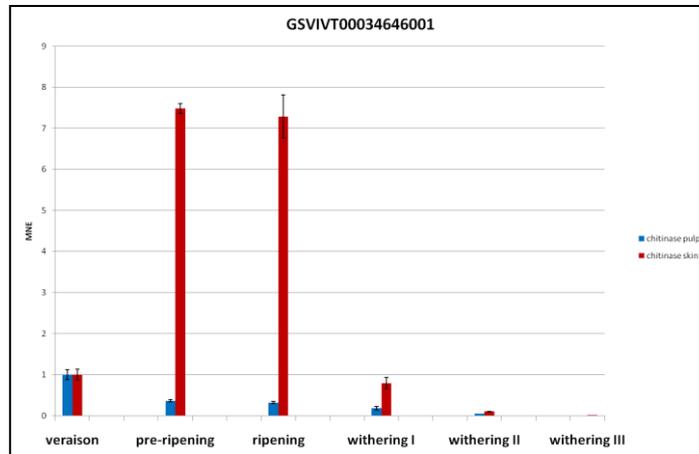


Figura 33. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00034646001

L'espressione del gene *VvChi4* (GSVIVT00034644001), non modulato in Corvina secondo l'analisi microarray effettuata in questo lavoro di Dottorato, è stata studiata da Robinson et al., (1997) in vari tessuti della cultivar Shiraz, tra cui foglie, radici, semi, fiori e bacche. Per la cultivar Shiraz l'invaiaatura ha inizio 8 settimane dopo la fioritura, come indicato dall'accumulo dei soluti solidi totali (°Brix). Tra i tessuti esaminati, segnali di ibridazione sono stati rilevati solamente nei fiori e nelle bacche, sia nella buccia sia nella polpa, a partire da 10 settimane dopo la fioritura, ma la massima intensità viene raggiunta solamente tra la 12 e la 16 settimana postantesi (Robinson et al., 1997). L'attività enzimatica, misurata da due settimane dalla fioritura, viene rilevata a partire dall'invaiaatura, stadio dopo il quale aumenta in maniera significativa e resta alta per tutta la maturazione.

L'attività delle chitinasi di buccia e polpa è stata studiata, in collaborazione con il prof. Peruffo, dall'invaiaatura all'appassimento. Le proteine sono state estratte da entrambi i tessuti e la reazione è avvenuta su piastra mediante il substrato specifico. Le 5 isoforme che hanno reagito sono state quindi colorate con il colorante Rosso Congo.

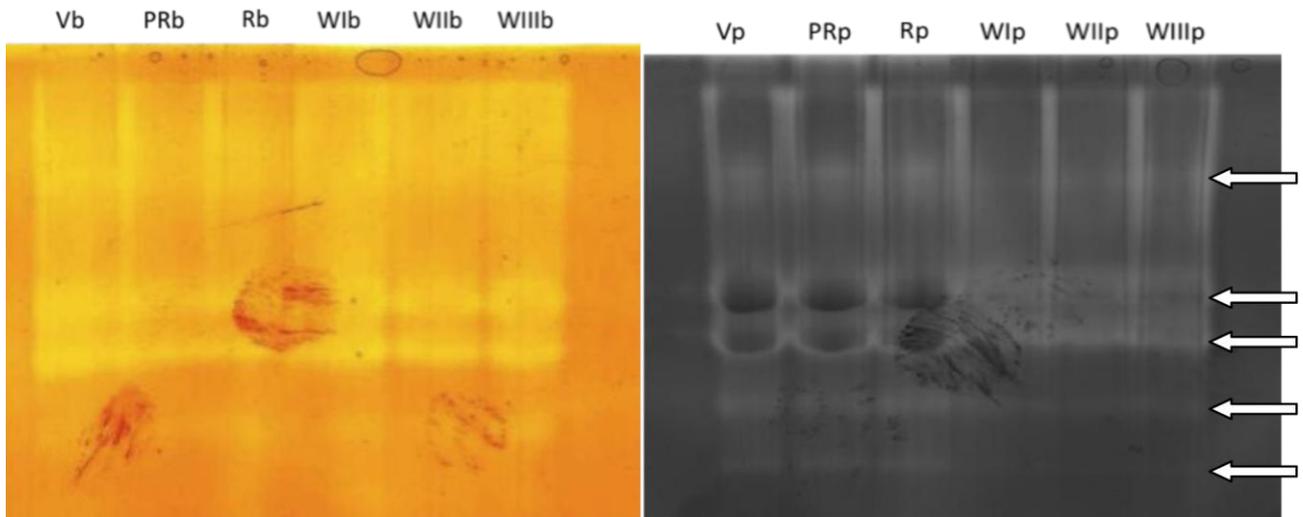


Figura 34. analisi dell'attività enzimatica delle CHI

Dall'analisi delle immagini (Fig.34), si può notare come le bande corrispondenti alle 5 isoforme presenti si mantengano costanti nei sei stadi; durante invaiatura, prematurazione e maturazione l'intensità delle due isoforme localizzate in posizione centrale, trovate nelle polpe, è maggiore rispetto agli stadi di appassimento. L'espressione costante di due sequenze geniche (GSVIVT00034626001 e GSVIVT00034638001) e la presenza di attività enzimatica fino al terzo stadio di appassimento, suggerirebbero la messa in atto di meccanismi di protezione della pianta. La maturazione è infatti caratterizzata da un forte accumulo di zuccheri, nutrienti, ma anche da ammorbidimento e rottura delle strutture cellulari; l'appassimento invece, è caratterizzato da una forte disidratazione e dalla biosintesi di numerosi composti fenolici (Zamboni et al., 2008). La presenza di chitinasi anche in assenza di un attacco da parte dei patogeni potrebbe anche suggerire un ruolo delle PR-proteins nella normale crescita e nello sviluppo della pianta (Robinson et al, 1997).

Cellulasi (endo-(1-4)- β -glucanasi) in vite

Il genoma 8.4X di *Vitis vinifera* contiene 20 diverse sequenze corrispondenti a endo-1,4- β -glucanasi, contenenti il dominio conservato glico-idro-9. Tra le 14 sequenze presenti sul chip, 3 geni risultano modulati durante gli stadi di sviluppo analizzati (Tab.15) e seguono un andamento globalmente decrescente durante le fasi di appassimento (Tab.16), (Fig.35).

Codice 8.4X	Grape array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00032287001	GSVIVT00032287001			*	
GSVIVT00011357001	TC52380			*	
GSVIVT00028035001	TC61627			*	
GSVIVT00036796001	GSVIVT00036796001				*
GSVIVT00006761001	TC51759				*
GSVIVT00009333001	TC62881				*
GSVIVT00023037001	CK906709				*
GSVIVT00014277001	GSVIVT00014277001	*			
GSVIVT00030207001	GSVIVT00030207001		*		
GSVIVT00032288001	GSVIVT00032288001		*		
GSVIVT00035959001	GSVIVT00035959001		*		
GSVIVT00000510001	NP596365		*		
GSVIVT00014445001	TC53433		*		

Tabella 15. andamento dei geni codificanti CEL nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00032287001	1,00	1,46	1,27	-1,35	-1,45	-1,33
GSVIVT00011357001	1,00	-5,99	1,86	-7,73	-3,91	-5,08
GSVIVT00028035001	1,00	1,57	1,09	-1,23	-1,74	-1,74

Tabella 16. andamento dei geni modulati

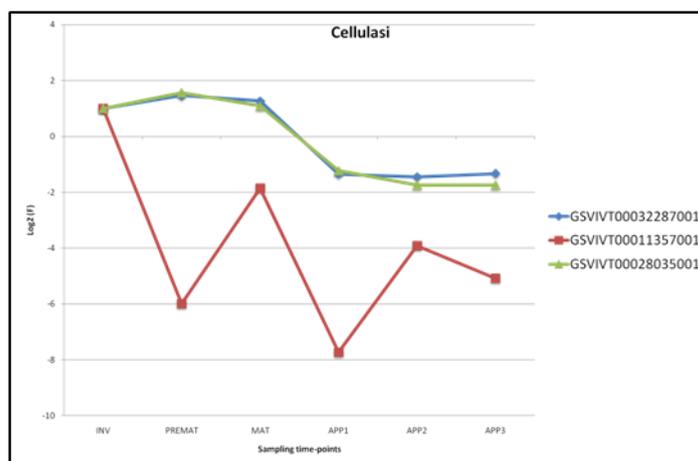


Figura 35. grafico dell'andamento dei geni modulati

L'analisi Real time RT-PCR effettuata sul gene GSVIVT00011357001 conferma il dato ottenuto dall'ibridazione microarray e mostra che il trascritto diminuisce drasticamente, a partire dall'invaiaatura, sia nella polpa sia nella buccia (Fig.36).

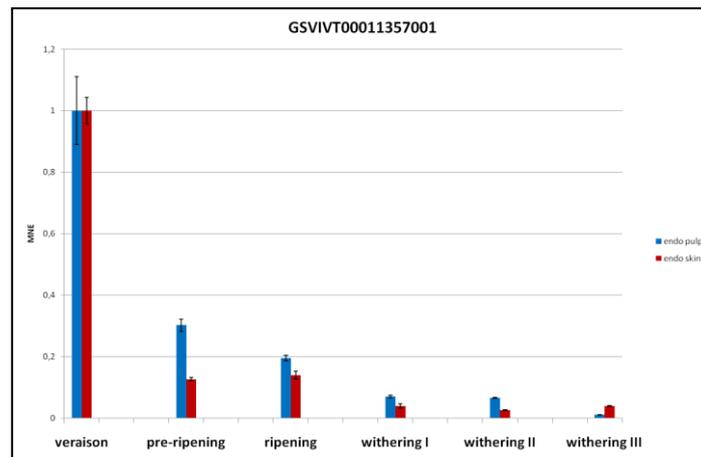


Figura 36. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00011357001

L'espressione del gene GSVIVT00006761001, non modulato secondo l'analisi statistica, è stata studiata nel mesocarpo e nell'endocarpo durante la maturazione, relativamente alla concentrazione di trascritto presente in un campione a 15 giorni post antesi (Schlosser et al., 2008). Se si confrontano i tre stadi di crescita della bacca, l'espressione di GSVIVT00006761001 risulta maggiore durante il periodo di rapida crescita degli stadi I e III rispetto allo stadio II.

Al fine di monitorare l'attività delle cellulasi in campioni delle varietà Pinot nero e Pinot grigio è stato messo a punto un sistema basato sulla fluorescenza, applicata a stadi di sviluppo che vanno dalla pre-invaiaatura fino alla completa maturazione della bacca (Naleway et al., 2008). Il saggio ha rilevato la presenza di composti inibitori di cellulasi, di natura non proteica, il cui livello varia con la maturazione correlando con l'aumento della quantità di soluti solidi totali (°Brix) e con l'acidità titolabile (TA) dei vari campioni. L'identità dei composti inibitori è ancora oggetto di studio, tuttavia tale metodica permetterebbe di sviluppare un sistema per stimare le condizioni ottimali di raccolta in maniera semi-automatica.

Cellulosa sintasi in vite

Tra le 32 sequenze presenti sul chip e riportate in tabella, dieci sono risultate modulate in maniera significativa (Tab.17) e mostrano globalmente due tipi di andamenti; le sequenze GSVIVT00010950001 e GSVIVT00019341001 sono sovra-regolate durante l'appassimento, mentre il livello di trascritto delle altre sequenze decresce a partire dalla maturazione, nel caso di GSVIVT00028062001, GSVIVT00031177001 e GSVIVT00014999001, o a partire dall'invasatura, nel caso di GSVIVT00002977001, GSVIVT00010946001, GSVIVT00014029001, GSVIVT00032621001, GSVIVT00036318001 e GSVIVT00006707001 (Tab.18), (Fig.37).

Codice 8.4X	Grape Array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00002977001	GSVIVT00002977001			*	
GSVIVT00010946001	TC53451			*	
GSVIVT00010950001	TC52457			*	
GSVIVT00014029001	TC68390			*	
GSVIVT00019341001	TC55721			*	
GSVIVT00028062001	TC60927			*	
GSVIVT00031177001	GSVIVT00031177001			*	
GSVIVT00032621001	GSVIVT00032621001			*	
GSVIVT00036318001	TC51828			*	
GSVIVT00014999001	TC68524			*	
GSVIVT00006707001	TC69075				*
GSVIVT00006719001	GSVIVT00006719001				*
GSVIVT00006720001	TC56091				*
GSVIVT00015671001	TC68684				*
GSVIVT00020164001	TC55634/TC66355				*
GSVIVT00020166001	TC63179				*
GSVIVT00021276001	TC54220				*
GSVIVT00025577001	TC61758				*
GSVIVT00025911001	GSVIVT00025911001				*
GSVIVT00028523001	CD799835				*
GSVIVT00031746001	CK906598				*
GSVIVT00033396001	TC57597				*
GSVIVT00035840001	TC59569				*
GSVIVT00006704001	TC66037		*		
GSVIVT00006709001	GSVIVT00006709001		*		
GSVIVT00010948001	TC68035		*		
GSVIVT00010209001	GSVIVT00010209001	*			
GSVIVT00010942001	TC68938	*			
GSVIVT00011243001	TC54259	*			
GSVIVT00017182001	TC64687	*			
GSVIVT00025904001	GSVIVT00025904001	*			
GSVIVT00028223001	GSVIVT00028223001	*			

Tabella 17. andamento dei geni codificanti CS nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00010950001	1,00	2,24	1,25	2,43	1,71	1,81
GSVIVT00019341001	1,00	-2,22	1,38	2,00	2,75	2,97
GSVIVT00028062001	1,00	1,98	1,11	-1,26	-1,18	-1,03
GSVIVT00031177001	1,00	1,70	1,16	-1,17	-1,45	-1,61
GSVIVT00014999001	1,00	1,29	-1,24	-1,45	-2,29	-2,61
GSVIVT00002977001	1,00	-1,18	-1,63	-3,00	-3,79	-4,07
GSVIVT00010946001	1,00	-4,53	-3,02	-4,80	-5,22	-4,92
GSVIVT00014029001	1,00	-6,19	-2,32	-7,70	-5,64	-7,53
GSVIVT00032621001	1,00	-2,55	-1,87	-7,34	-5,92	-6,07
GSVIVT00036318001	1,00	-1,65	-1,74	-2,29	-2,52	-2,90

Tabella 18. andamento dei geni modulati

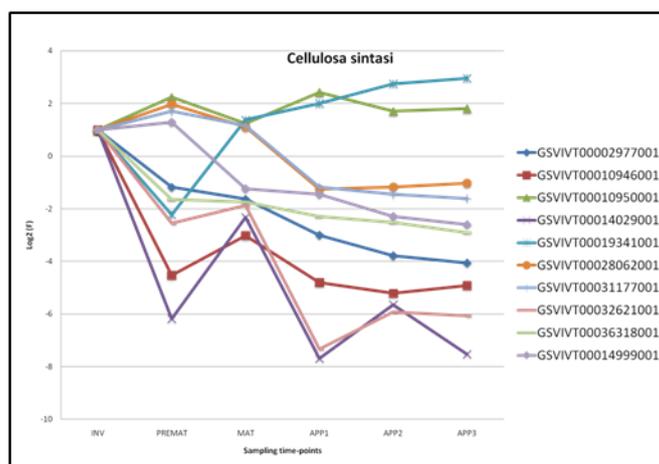


Figura 37. grafico dell'andamento dei geni modulati

L'andamento del gene GSVIVT00014999001 è stato confermato tramite analisi Real time RT-PCR, mediante una coppia di primers specifici disegnati sulla sequenza 3' UTR. Analogamente ai dati di ibridazione, è presente un picco alla prematurazione, mentre il livello di trascritto decresce dalla maturazione, fino al terzo stadio di appassimento (Fig.38). L'espressione del gene nei due tessuti analizzati è globalmente analoga, ma si differenzia nelle fasi di maturazione e appassimento III, stadi nei quali GSVIVT00014999001 sembra essere maggiormente espresso nella buccia.

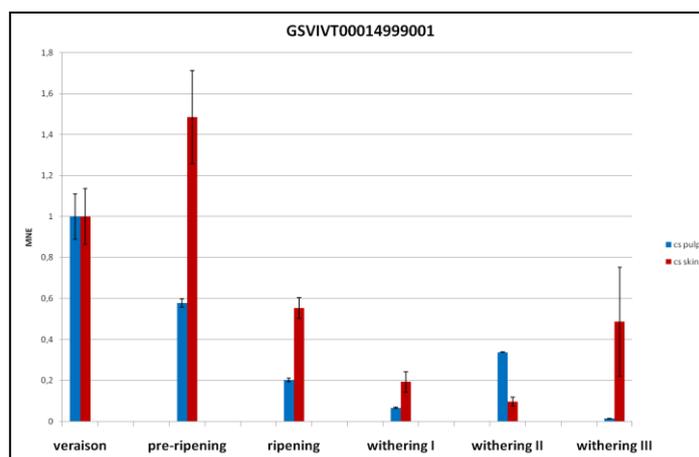


Figura 38. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00014999001

Invertasi in vite

Tra le 12 sequenze codificanti invertasi vacuolari, di parete o neutre, solo 4 mostrano una modulazione significativa negli stadi di sviluppo analizzati (Tab.19); i livelli di trascritto di GSVIVT00004764001 e GSVIVT00029907001, classificate come invertasi vacuolari, hanno un andamento decrescente a partire dall'invasatura, mentre GSVIVT00022575001 e GSVIVT00022057001, invertasi neutre, sono sovra regolate e presentano un picco di espressione all'appassimento (Tab.20), (Fig.39).

Codice 8.4X	Grape Array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00004764001	TC52500			*	
GSVIVT00029907001	GSVIVT00029907001			*	
GSVIVT00022575001	TC66468			*	
GSVIVT00022057001	TC70860			*	
GSVIVT00021585001	TC64998				*
GSVIVT00023945001	TC57350				*
GSVIVT00034185001	GSVIVT00034185001				*
GSVIVT00032195001	TC60402		*		
GSVIVT00032196001	GSVIVT00032196001	*			
GSVIVT00031814001	GSVIVT00031814001		*		
GSVIVT00036029001	GSVIVT00036029001				
GSVIVT00033188001	TC58461		*		

Tabella 19. andamento dei geni codificanti INV nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00004764001	1,00	-5,27	-6,43	-9,71	-4,88	-4,75
GSVIVT00029907001	1,00	-10,54	-16,16	-13,43	-16,12	-11,76
GSVIVT00022575001	1,00	-1,80	-1,01	2,06	3,98	3,96
GSVIVT00022057001	1,00	-1,45	1,47	1,98	2,84	2,52

Tabella 20. andamento dei geni modulati

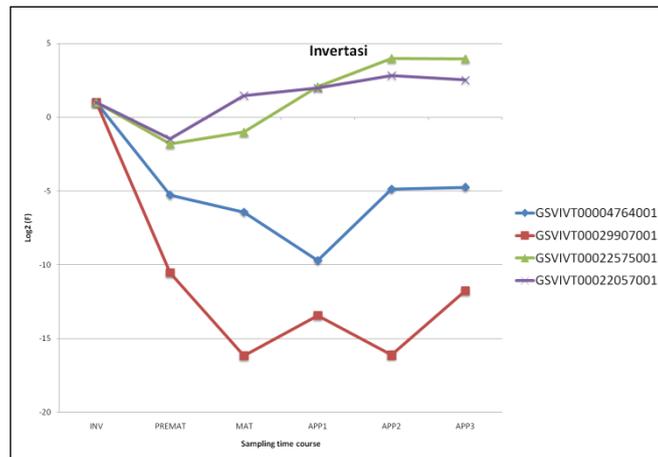


Figura 39. grafico dell'andamento dei geni modulati

L'analisi Real time RT PCR effettuata sul gene GSVIVT00029907001 (GIN1) conferma l'andamento decrescente osservato con l'analisi microarray, in entrambi i tessuti analizzati (Fig.40).

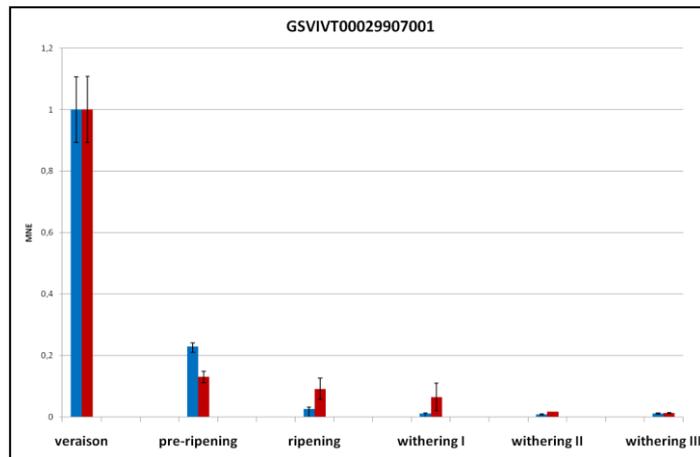


Figura 40. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00029907001

L'espressione dei geni GIN1 e GIN2 (GSVIVT00029907001) e (GSVIVT00004764001) è stata investigata anche mediante analisi Northern blot su tessuti provenienti dalle bacche della varietà Shiraz, a partire da 2 fino a 16 settimane dalla fioritura (Davies et al., 1996)

Entrambi i trascritti relativi a GIN1 e GIN2 sono stati rilevati nei tessuti della bacca, ma GIN1 risultava più espresso di GIN2 in tutti gli stadi dello sviluppo della bacca. L'espressione massima dei geni è stata registrata a 2 settimane dalla fioritura, periodo dopo il quale la quantità di trascritto ha iniziato a diminuire, fino alla quasi totale scomparsa a 12 settimane post fioritura. Questo pattern di espressione si accorda perfettamente con il trend osservato dall'analisi enzimatica, secondo la quale l'attività dell'enzima diminuisce con lo sviluppo. Tuttavia a 12 settimane post fioritura, quando il livello di trascritto non è più rilevabile, l'attività enzimatica osservata resta costante, suggerendo così che le invertasi vacuolari della bacca sono proteine stabili che mostrano un turnover relativamente basso. (Davies et al., 1996)

L'attività delle invertasi di bacca è stata determinata su piastra, mediante l'osservazione dell'azione degli enzimi estratti, sia da polpa sia da buccia, sul substrato costituito da saccarosio. La colorazione con TCC (*Trifenil Tetrazolio Cloruro*) ha permesso di visualizzare 3 isoforme, la cui intensità è

abbastanza costante nei sei stadi. In corrispondenza della maturazione e dell'appassimento III l'isoforma di peso molecolare inferiore presenta intensità elevata nel tessuto corrispondente alla polpa (Fig.41).

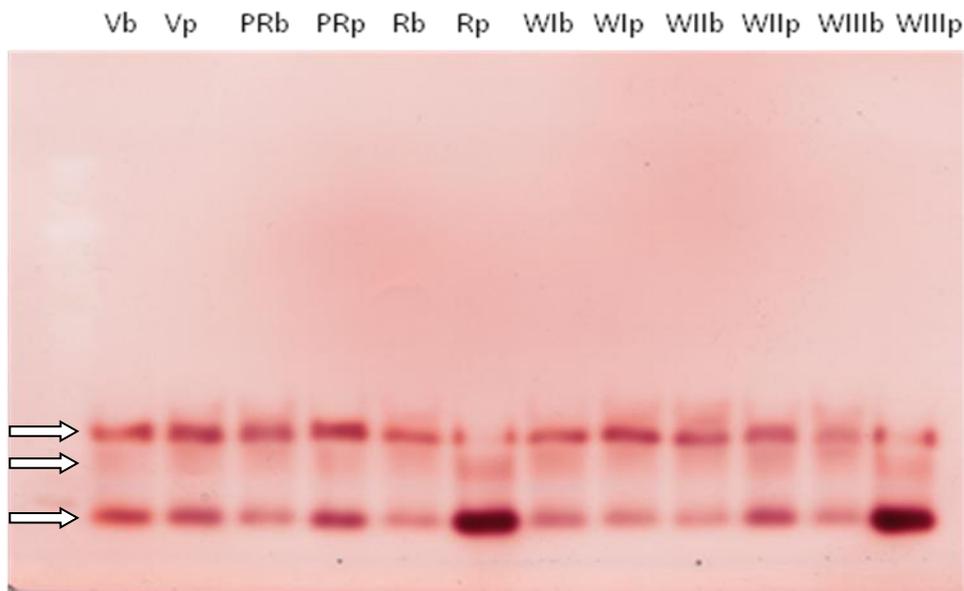


Figura 41. analisi dell'attività enzimatica delle INV

Dal confronto dei dati di ibridazione con i dati riguardanti l'attività, si può ipotizzare che le due sequenze geniche appartenenti alle invertasi neutre GSVIVT00022575001 e GSVIVT00022057001 e sovra regolate durante maturazione e appassimento corrispondano alle isoforme indicate dalle frecce e rilevate in piastra.

Dati in letteratura riportano l'attività delle invertasi determinata sulle bacche di *Vitis vinifera* cv Sultanina (Dreier et al., 1998) e mostrano come l'attività dell'enzima inizi ad aumentare precocemente durante lo sviluppo della bacca e rimanga alta durante tutta la maturazione.

Conclusioni

La maturazione del frutto è un fenomeno irreversibile altamente coordinato e geneticamente programmato, che coinvolge una serie di cambiamenti fisiologici, biochimici e organolettici (Prasanna et al., 2007)

La vite produce frutti non climaterici, la cui maturazione non sembra essere controllata dall'etilene, che mostrano un pattern di crescita a doppia sigmoide. La maturazione avviene durante la seconda fase di crescita, quando la bacca cambia colore, inizia ad ammorbidirsi, accumula zuccheri riducenti, metabolizza acidi organici e sintetizza composti aromatici.

I polisaccaridi di parete, tra cui pectine, cellulose, emicellulose e amido, giocano un ruolo importante nella maturazione e subiscono una serie di alterazioni mediate da enzimi, che portano alla dissoluzione della parete primaria e della lamella mediana.

Le pectine sono le principali componenti della parete primaria e della lamella mediana e contribuiscono alla "texture" del frutto e sono responsabili della consistenza del frutto; da un punto di vista strutturale esse sono eteropolisaccaridi che contengono residui di acido galatturonico parzialmente metilato, pectine metilesterificate, acidi pectici de-esterificati e i loro sali, pectati e polisaccaridi neutri (Brownleader et al., 1999). Durante la maturazione, l'ammorbidimento del frutto è causato dalla conversione della proto pectina (pectina insolubile ad alto peso molecolare) in poliuronidi (John and Dey, 1986). Inoltre le pectine contenute nei frutti maturi mostrano un livello di esterificazione, un peso molecolare medio e un contenuto di zuccheri neutri più bassi rispetto alla pectina contenuta nei frutti non maturi (Huber and Lee, 1986).

I cambiamenti nella composizione della parete cellulare che accompagnano l'ammorbidimento del frutto durante la maturazione sono dovuti principalmente all'azione delle idrolasi dei carboidrati, che agiscono sui polimeri di parete, determinandone la degradazione. La maggior parte di questi enzimi sono presenti a bassi livelli e in modo costitutivo durante sviluppo e maturazione del frutto (Tucker, 1993), tuttavia durante la maturazione mostrano un generale aumento di attività.

Tra le idrolasi di parete, gli enzimi che degradano le pectine sono maggiormente implicati nell'ammorbidimento del frutto; dal momento che i polimeri pectici iniziano ad acquisire solubilità solamente dopo che l'enzima poligalatturonasi risulta attivato, si ritiene che quest'enzima sia coinvolto nella rottura del complesso insolubile di polisaccaridi, mediante la riduzione della lunghezza delle catene legate da ioni calcio (Wong, 1995). Una correlazione positiva tra la comparsa delle PG e l'inizio dell'ammorbidimento è stata rilevata in una serie di frutti, tra i quali guava (El-Zoghbi, 1994), papaya (Paull and Chan, 1983) e mango (Roe and Bruemmer, 1988).

Gli enzimi che degradano le pectine sono classificati sulla base del loro modo di azione e sono distinti in poligalatturonasi, pectinmetilesterasi e pectato liasi.

Le poligalatturonasi (PG) sono enzimi idrolitici che agiscono sull'acido poligalatturonico, rompendo i legami α -1,4-glicosidici tra residui di acido galatturonico in galatturonani. Tra le tre sequenze risultate modulate dall'analisi microarray, si può notare come l'espressione diminuisca tempo lungo la maturazione e l'appassimento, a parte un leggero aumento in fase di prematurazione per due sequenze studiate. Per quanto riguarda l'attività enzimatica, in letteratura non sono state rilevate informazioni inerenti al periodo che intercorre tra maturazione ed appassimento. L'esperimento condotto in questo lavoro mostra però che nelle bucce è presente attività rilevabile in corrispondenza degli stadi di appassimento. Questo dato introduce una novità nell'ambito delle poligalatturonasi, che

potrà essere meglio chiarita quando si andrà ad analizzare lo stato delle pectine totali nella bacca, proprio in fase di appassimento. I dati ottenuti dall'analisi microarray sono coerenti con quelli riportati in letteratura; i geni *VvPG1* e *VvPG2*, studiati da Deytieu-Belleau et al., (2008), sono infatti espressi precocemente, o a partire dall'invasatura, come *VvPG1*, o a pochi giorni dall'antesi, come *VvPG2*; l'espressione precoce di questi geni suggerirebbe un ruolo delle PG nella crescita e nell'espansione cellulare, che richiedono l'indebolimento e il disassemblamento della parete cellulare.

Un altro enzima coinvolto nell'idrolisi delle pectine è la pectinmetilesterasi (PME), che catalizza la rimozione del gruppo metossile dalla pectina metilata. Le PME attaccano preferenzialmente i legami metilestere di unità di galatturonato che si trovano accanto ad unità non esterificate (Pilnik and Voragen, 1970) e si ritiene che la loro azione sia un prerequisito per l'azione delle PG durante la maturazione. Dati in letteratura mostrano come *VvPME1* cominci ad accumularsi già prima dell'invasatura e che l'attività enzimatica relativa alle pectinmetilesterasi sia rilevabile già a 40 giorni postantesi (Deytieu-Belleau et al., 2008); l'osservazione di un accumulo così precoce correlato ad attività enzimatica suggerisce che le PME siano coinvolte nell'espansione cellulare durante la fase di crescita I, e agirebbero modificando il grado di metilesterificazione dei galatturonani di parete. La sintesi sostanziale di pectina metilesterificata durante la fase verde, legata all'aumento del volume e del numero di cellule, spiegherebbero inoltre la presenza di attività enzimatica precoce (Draye and Van Cutsem, 2007). Le evidenze di espressione genica da analisi globale di tipo microarray e confermati mediante Real time RT-PCR mostrano una sovra regolazione a partire dall'invasatura fino all'appassimento per 3 delle sei sequenze risultate significativamente modulate. L'attività enzimatica a carico delle PME rimane significativa anche in fase di appassimento, giustificando così la presenza dell'enzima PG nello stesso periodo. Le modificazioni delle catene di pectina ad opera delle PME, sembrano quindi rendere i galatturonani accessibili alla degradazione da parte delle PG, confermando alle PME un ruolo chiave nell' induzione del softening. Esperimenti di ingegneria genetica hanno mostrato che la soppressione delle PME porta ad un aumento dei solidi solubili totali nei pomodori in via di maturazione (Grey et al, 1992; Tieman et al., 1992), tuttavia tali enzimi non sono gli unici determinanti del softening, che richiederebbe quindi l'azione di altri fattori.

Un'altra categoria di enzimi coinvolti nella degradazione della pectina sono le pectato liasi, che catalizzano il taglio delle unità di galatturonato esterificate o de-esterificate attraverso una reazione di β -trans-eliminazione dell'idrogeno localizzato tra il C-4 e il C-5 dell'acido galatturonico. Linee di fragole transgeniche nelle quali l'attività delle PL è stata repressa, mostrano un aumento della "firmness" del frutto, indicando così un ruolo delle pectato liasi nel softening (Jimenez-Bermudez et al., 2002). I risultati dell'analisi microarray mostrano un'espressione globalmente decrescente dei geni risultati differenzialmente espressi, ad eccezione della sequenza GSVIVT00000608001, sovra regolata fino al primo stadio di appassimento. Questi dati si integrano bene con quelli ottenuti da Schlosser et al., (2008), secondo i quali l'espressione della pectato liasi è massima per il mesocarpo in fase di invasatura, per poi decrescere in fase di maturazione. L'azione delle PL sarebbe quindi subordinata a quella delle PME, in quanto il trascritto delle pectinmetilesterasi è stato rilevato in fase più precoce rispetto a quello relativo alle pectato liasi, che necessiterebbero dell'azione di metilesterificazione per esercitare la loro funzione.

Oltre alle pectine, altri polimeri sono coinvolti nel softening del frutto e sono rappresentati dalle emicellulose. Le emicellulose sono polisaccaridi neutri, scarsamente solubili e strettamente associati alla cellulosa. Yakushiji et al., (2001) hanno osservato che il contenuto di zuccheri acidi e neutri della frazione della pectina diminuisce soltanto dopo l'invasatura, mentre il contenuto degli zuccheri neutri dell'emicellulosa diminuisce prima e dopo l'invasatura. Inoltre gli xiloglucani emicellulosici vengono depolimerizzati in maniera marcata prima di l'invasatura e durante questo stadio. Lo studio dell'espressione di sei geni corrispondenti ad enzimi che degradano la parete cellulare (PG; PME; Gal; PL; Cel; XET) durante lo sviluppo di bacche della varietà Kyoho mostra che solamente il gene *XET*, a differenza degli altri geni, viene rilevato subito prima e dopo l'invasatura (Ishimaru and Kobayashi, 2002). Questo dato suggerirebbe quindi che l'espressione di *XET* sia strettamente legata al softening della bacca; il prodotto del gene *XET1* potrebbe determinare l'interruzione del un network di parete cellulosa-xyloglucano inducendo il softening nelle bacche di uva Kyoho all'invasatura. Analisi di espressione del gene *VvXET1* (GSVIVT00022167001), risultato significativamente modulato nell'analisi microarray da noi effettuata, mostrano un segnale appena rilevabile prima dell'invasatura, seguito da una sovra regolazione negli stadi di crescita II e III (Schlosser et al., 2008). Dati ottenuti dall'analisi microarray mostrano che tale gene segue un andamento globalmente decrescente negli stadi che seguono l'invasatura, così come altre sequenze risultate differenzialmente espresse, mostrando così un possibile ruolo delle XET nelle fasi precoci della maturazione della bacca. Nonostante in letteratura siano presenti dati che supportano il ruolo di tali enzimi nella maturazione e nell'azione precoce di induzione del softening, non si è ancora riusciti a rilevare un'attività enzimatica durante le fasi di crescita della bacca di vite.

Il materiale inerte, insolubile e cristallino residuo in seguito all'estrazione delle emicellulose e costituito prevalentemente da β -glucosio è la cellulosa. Sono poche le informazioni presenti in letteratura riguardanti l'azione degli enzimi cellulolitici, tuttavia è noto che l'attività cellulolitica aumenta durante la maturazione di frutti quali l'avocado, la pesca, la fragola, il pomodoro e la papaia (Hobson, 1981). L'attività cellulolitica in pomodori *wild type* e mutanti per la maturazione, suggerisce che questi enzimi non possiedono un ruolo primario nel softening del frutto. L'analisi microarray effettuata sulle bacche della cultivar Corvina mostrano come due delle tre sequenze differenzialmente espresse manifestino una sovra regolazione in fase di prematurazione e maturazione, per poi subire un decremento durante gli stadi successivi. Questi dati da noi ottenuti confermerebbero i risultati di Schlosser et al., (2008), secondo i quali l'espressione di una endo-(1-4)- β -glucanasi diminuirebbe a partire da 15 giorni post antesi fino a al periodo adatto alla raccolta.

Gli zuccheri e gli amminoacidi che si accumulano nella bacca durante la maturazione sono importati attraverso il floema, mentre molti metaboliti secondari vengono sintetizzati direttamente all'interno della bacca. La vite importa saccarosio ma accumula esosi; la conversione da saccarosio agli esosi corrispondenti è normalmente attribuita all'espressione all'attività di invertasi di parete e di saccarosio sintasi (Zhang et al. 2006; Deluc et al. 2007) o di invertasi vacuolari (Davies and Robinson 1996).

Per quanto riguarda le invertasi vacuolari GIN1 e GIN2, clonate e studiate da Davies and Robinson, (1996), il cui trascritto inizia ad accumularsi precocemente durante lo sviluppo della bacca ed è rilevabile fino a 12 settimane post antesi, i dati di espressione microarray ottenuti in questo lavoro, mostrano come tali geni decrescente decrescano progressivamente fino agli stadi di appassimento. In

merito all'accumulo di zuccheri esosi, si è però notato che esso inizia a partire da 8 settimane post antesi e continua fino a 16 settimane post antesi, quando il frutto è maturo (Davies et al., 1996); l'attività delle invertasi inoltre aumenta dalla fioritura, è massima a 8 settimane post antesi e resta costante per tutta la maturazione. Sebbene le invertasi vacuolari siano coinvolte nell'accumulo di esosi nella bacca, l'espressione genica e la sintesi degli enzimi precede l'inizio dell'accumulo di esosi di qualche settimana, suggerendo così che il meccanismo che regola tale accumulo non sia direttamente guidato da GIN1 e GIN2. Poca importanza è stata data al ruolo delle invertasi neutre e all'implicazione che esse possono avere nello sviluppo del frutto; Nonis et al., (2008) hanno osservato che cambiamenti nei livelli di trascritto corrispondenti a NIs coincidevano con l'inizio dell'accumulo degli esosi. Si è osservato che i geni GSVIVT00022575001 e GSVIVT00022057001, corrispondenti alle invertasi neutre NI3 e NI4, sono espressi debolmente nelle bacche verdi fino a 59 giorni post antesi, ma vengono sovra regolati a 66 giorni post antesi, in concomitanza con la fine della fase lag di crescita e con il rapido aumento della concentrazione di zuccheri (Nonis et al., 2008). Il livello di trascritto resta alto durante tutto il periodo di maturazione e diminuisce debolmente quando il frutto raggiunge la sua piena maturità. I dati ottenuti dall'analisi microarray riguardanti gli stessi geni, confermano e integrano questa tendenza mostrando come il livello di tali trascritti resti alto anche durante la fase di appassimento. Il saggio enzimatico, effettuato per gel diffusione, sulle invertasi estratte da buccia e polpa di bacca mostra inoltre la presenza di due isoforme la cui attività è rilevabile anche in fase di appassimento, che potrebbero corrispondere alle due invertasi neutre oggetto di studio. Questa evidenza, supportata dallo studio di Nonis et al., (2008), potrebbero fornire nuove indicazioni secondo le quali alcune NIs potrebbero agire direttamente nel network di accumulo di zuccheri e non agirebbero semplicemente come "geni housekeeping".

Le informazioni riguardanti gli enzimi deputati alla sintesi di cellulosa in vite, presenti in letteratura, riguardano essenzialmente analisi filogenetiche (Yin et al, 2009). Analisi di tipo AFLP-TP effettuate su bacche d'uva subito sottoposte ad appassimento post-raccolta hanno mostrato la presenza di un gene considerato un tag specifico per l'appassimento, coinvolto nel metabolismo della parete cellulare e codificante per una cellulosa sintasi del tipo CSLG2, GSVIVT00020164001 (Zamboni et al., 2008). Tale gene risulta sotto regolato durante il "time course". Glissant et al., (2008) hanno inoltre notato come la sequenza CS001A01C, codificante una cellulosa sintasi, fosse espressa solamente durante i primi stadi dello sviluppo della bacca. Inoltre si è visto che il contenuto di cellulosa della parete cellulare della bacca aumenta in seguito all'invasatura, ma diminuisce subito dopo (Vicens et al., 2009). L'analisi microarray mostra che i 10 geni differenzialmente espressi, presentano andamenti eterogenei, alcuni sovra regolati rispetto all'invasatura, altri con livello di trascritto globalmente decrescente, analogamente al gene GSVIVT00020164001. Non si è stati in grado di mettere a punto un sistema soddisfacente e riproducibile per la determinazione dell'attività enzimatica in piastra. Nonostante la scarsità di dati ottenuti, è bene sottolineare l'importanza di questa superfamiglia genica, che consta di 66 membri, coinvolti nella biosintesi della parete cellulare.

Studi effettuati sulle pareti delle bacche durante la maturazione suggeriscono che non si assiste ad un cambiamento drammatico sulla composizione polisaccaridica, piuttosto una modificazione di componenti specifici potrebbe contribuire al softening (Robinson and Davies, 2000). Un certo numero di proteine viene sintetizzato *ex novo* durante la maturazione e tra queste le più abbondanti sono rappresentate dalle proteine legate alla patogenesi, che includono chitinasi e proteine simili alla

taumatina. L'espressione di un certo numero di geni codificanti "PR-proteins" aumenta drasticamente durante la maturazione, tuttavia non è ancora stato chiarito in maniera soddisfacente il ruolo che esse svolgono (Robinson and Davies, 2000).

Tra le cinque sequenze codificanti chitinasi, risultate modulate dall'analisi microarray, due sequenze mostrano una sovra regolazione a partire dall'invaiaitura, fino agli stadi di appassimento. Tale andamento viene confermato dall'analisi enzimatica su piastra, che mostra la presenza di attività, anche se in misura minore rispetto agli stadi precedenti, anche durante l'appassimento. Rizzini et al., (2009) hanno inoltre osservato che la sequenza corrispondente ad una chitinasi di classe IV, GSVIVT00034647001, risultava sovra regolata in seguito a disidratazione lenta o rapida della bacca.

Durante la maturazione, l'accumulo degli zuccheri nella bacca è accompagnato da un concomitante flusso d'acqua, in modo tale che il rapporto tra l'incremento del peso secco e l'incremento del volume della bacca mantenga un valore costante (Picaud et al., 2003). Questo implica che all'interno della bacca vi sia un bilanciamento tra la presenza di acqua e la sostanza secca (Coombe, 1989). L'aumento di peso nella seconda fase dello sviluppo della bacca è dovuto quindi all'accumulo di acqua e zuccheri e l'aumento di volume è attribuibile all'espansione cellulare (Coombe, 1992). Fouquet et al., 2008 hanno osservato che la maggior parte dei geni codificanti acquaporine che mostrano una variazione significativa nell'espressione, venivano espressi prima o comunque fino all'invaiaitura, stadio dopo il quale l'andamento dei trascritti risulta globalmente decrescente. Deluc et al., (2007) e Pilati et al., (2007) hanno ottenuto risultati simili, confermando così l'espressione genica preferenziale durante la pre-invaiaitura. I nove geni codificanti acquaporine, risultati differenzialmente espressi dall'analisi microarray, hanno un andamento globalmente decrescente a partire dall'invaiaitura; un'eccezione è rappresentata dalla sequenza GSVIVT00003903001 (*VvNIP8;2*), codificante per un'acquaporina nodulina 26-simile, la cui funzione è tutt'ora incerta, che appare sovra regolata durante gli stadi di appassimento. I geni GSVIVT00026881001 (*VvPIP1;2*), GSVIVT00000605001 (*VvTIP1;2*), GSVIVT00026881001 (*VvPIP1;2*), e GSVIVT00036133001 (*VvPIP2;2*), la cui espressione diminuisce all'invaiaitura (Fouquet et al., 2008) risultano sotto regolati anche in fase di appassimento. Anche nel caso del gene GSVIVT00000433001 (*VvPIP1;3*), la cui espressione diminuisce dopo l'invaiaitura, viene mantenuto l'andamento decrescente. Se si attribuisce alle acquaporine la sola funzione di canali dell'acqua, l'espressione preferenziale osservata prima dell'invaiaitura potrebbe essere associata ai meccanismi di divisione ed espansione cellulare, caratteristici della fase di crescita I, come dimostrato da Schlosser et al., (2008). Greenspan et al., (1994), hanno osservato che prima dell'invaiaitura, l'acqua è fornita soprattutto attraverso le tracheidi dello xilema, mentre il floema costituisce il pathway preferenziale per la bacca post-invaiaitura; inoltre Tyerman et al., (2004), riportano una riduzione fino a dieci volte della conduttanza idraulica dell'intera bacca, nel periodo che intercorre tra l'invaiaitura e la fase di raccolta. Gli stessi autori suggeriscono che oltre a possibili cambiamenti nell'anatomia dello xilema, le acquaporine potrebbero avere un ruolo nella regolazione della conduttanza idraulica. Una diminuzione della conduttanza idraulica di membrana potrebbe essere la conseguenza della modificazione dell'abbondanza di acquaporine nel plasmalemma (Hachez et al., 2006), che a livello trascrizionale si tradurrebbe nella riduzione della quantità di trascritti codificanti acquaporine. In ogni caso, sembra che l'espressione delle acquaporine obbedisca ad un complesso pattern di sviluppo, che probabilmente si aggiunge alla diversità della loro espressione nei vari organi, in risposta allo stress idrico (Galmes et al., 2007).

Espansine in vite

Le expansine sono regolatori chiave dell'estensione della parete cellulare durante la crescita della pianta (Cosgrove, 2005). La loro azione procederebbe attraverso un meccanismo non enzimatico, nel quale le expansine distruggerebbero i legami non covalenti che legano i polisaccaridi di matrice alla superficie delle micro fibrille di cellulosa o tra di loro (Cosgrove, 2000). Sono inoltre implicate nel controllo della crescita cellulare, nella separazione tra cellule, nella dissoluzione della parete, nel contatto tra il tubetto pollinico e lo stigma e in tutti quei processi in cui avvengono modificazioni di parete (Brummel et al., 1999; Cosgrove et al., 2002; Pien et al., 2003; Choi et al., 2006).

Le expansine appartengono ad una superfamiglia di geni suddivisi in sottofamiglie che si sono evolute a partire da un "antenato" comune e che codificano per alfa-expansine (EXPAs), la famiglia più numerosa, beta-expansine (EXBs), expansine-simili A (EXLA), expansine-simili B (EXLB). Le proteine appartenenti alle quattro sottofamiglie presentano una struttura analoga, caratterizzata da due domini separati preceduti da un peptide segnale (Cosgrove, 2000). Il dominio 1 mostra omologia con la famiglia 45 delle glicoside idrolasi (GH45), mentre il dominio 2, che presenta residui aromatici altamente conservati, è probabilmente coinvolto nel legame con i polisaccaridi di parete. Le expansine A sono caratterizzate dalla presenza di una grande inserzione (inserzione alfa) nel dominio 1, le expansine simili A e B sono invece prive del dominio HFD, dato che suggerisce che l'azione di EXLA e EXLB differisca da quella delle altre expansine. Inoltre le expansine simili A presentano un dominio conservato (CRDC) all'estremità ammino-terminale del dominio 1, ed un'estensione di circa 17 amminoacidi nel dominio 2, assenti nelle altre sottofamiglie. In tutte e quattro le famiglie sono presenti due box conservati (BOX1 e BOX2), caratteristici delle expansine (Fig.1).

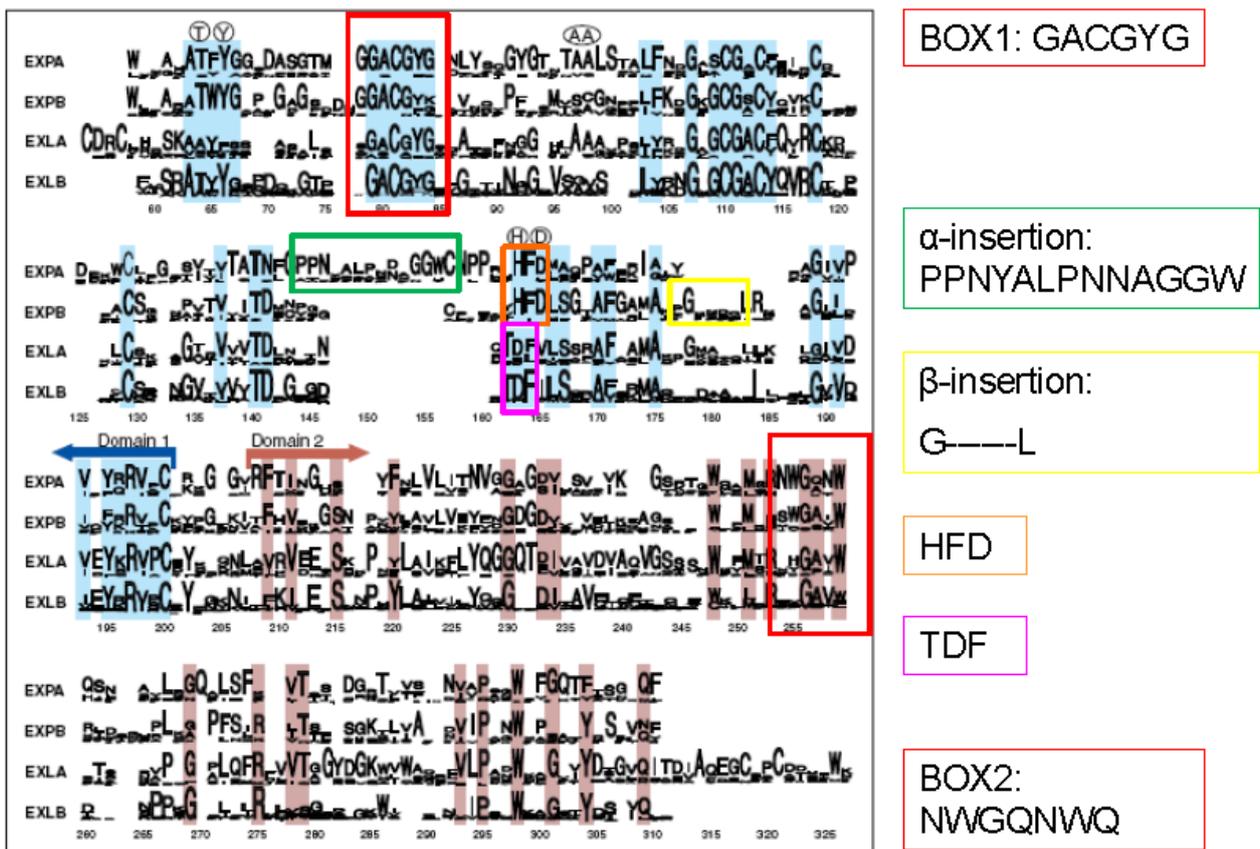


Figura 1: sequenze conservate delle expansine (Sanpedro and Cosgrove, 2005)

È stato dimostrato sperimentalmente che EXPA e EXPB causano il “cell-wall loosening” (McQuenn-Mason et al., 1992; Cosgrove et al., 1997), mentre EXLA e EXLB sono note solamente per la loro sequenza genica.

Il numero di geni di ciascuna sottofamiglia è stato riportato per tre specie vegetali i cui genomi sono stati sequenziati (Sampedro et al., 2006) (Fig.2).

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oriza sativa</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	<i>Vitis vinifera</i>
EXPA	26	33	27	20
EXPB	6	18	3	4
EXLA	3	4	2	1
EXLB	1	1	4	4

Figura 2. numero di geni di expansina in alcune specie sequenziate

Si può osservare che la sottofamiglia EXPA è più piccola rispetto alle altre specie, mentre EXPB, EXLA e EXLB mostrano un numero simile di geni, in particolare rispetto al pioppo.

I risultati di integrazione di analisi filogenetiche basate sulla sequenza e sulla posizione, suggeriscono che le expansine appartengono a 17 diversi “clades” (Sampedro et al., 2006). Ciascun clade includerebbe tutti quei geni che discendono da un singolo gene presente nell’ultimo “ancestor” comune: 12 geni per EXPA, 2 geni per EXPB e un gene per EXLA e EXLB.

Ad oggi, sono pochi i lavori in letteratura che riportano dati riguardanti la caratterizzazione di geni di expansine in vite, tuttavia è stato recentemente dimostrato il coinvolgimento delle expansine nello sviluppo della vite, in particolare nella maturazione e nel softening della bacca (Schlosser et al., 2008). Attraverso un’analisi BlastP effettuata sul genoma di vite 12X, sono state identificate 20 EXPAs, 4 EXPBs, 1 EXLA e 4 EXLBs. Le sequenze delle proteine trovate sono state allineate tramite clustalW e mostrano le caratteristiche, precedentemente descritte, tipiche delle expansine (Fig.3).

È stato inoltre costruito l'albero filogenetico di tutte le espansine di vite e di sequenze selezionate provenienti da Arabidopsis, riso e pioppo, che rappresentano tutti i clades di mono e dicotiledoni presenti nelle tre specie. Tutti i clades proposti per la famiglia genica delle espansine vengono ritrovati nel genoma di vite (Fig.4).

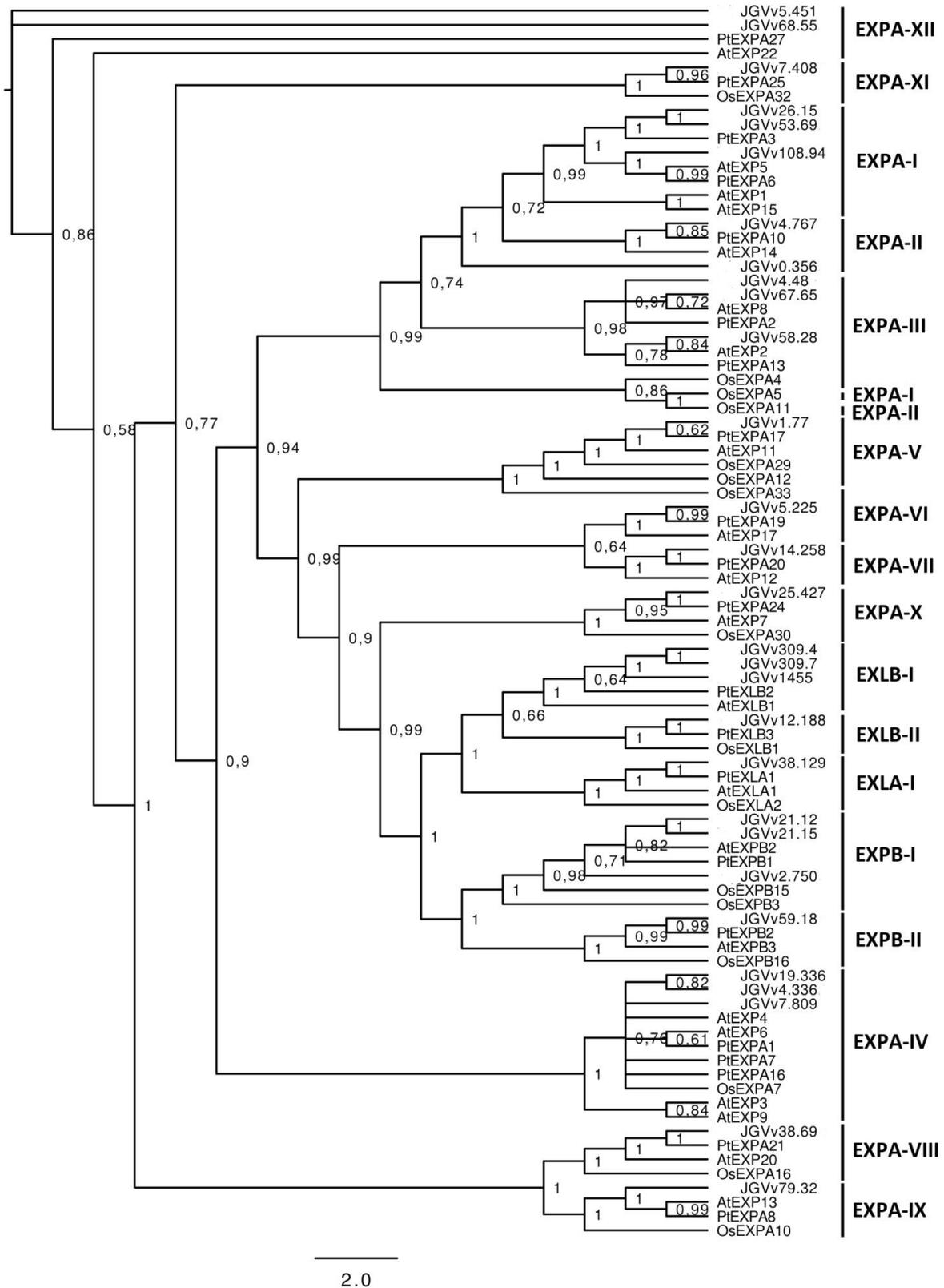


Figura 4. albero filogenetico delle espansine di vite e di alcune sequenze selezionate

Al fine di poter confrontare le informazioni ottenute dalle sequenze di espansine identificate nel genoma 12X con i dati dell'ibridazione microarray, si è cercata la corrispondenza tra i codici relativi alle espansine nei sequenziamenti 8.4X e 12X. Tutte le sequenze identificate nel genoma 8.4X vengono mantenute nel genoma 12X e corrispondono ad una sequenza proteica univoca, ad eccezione dell'alfa espansina GSVIVT00000851001 (Tab.1).

Codice 8.4X	Codice 12X	Funzione
GSVIVT00016318001	lcl JGVv0.356.t01	ALFA
GSVIVT00021324001	lcl JGVv7.809.t01	ALFA
GSVIVT00036942001	lcl JGVv26.15.t01	ALFA
GSVIVT00029445001	lcl JGVv67.65.t01	ALFA
GSVIVT00036225001	lcl JGVv38.129.t01	EXLA
GSVIVT00024306001	lcl JGVv4.336.t01	ALFA
GSVIVT00023470001	lcl JGVv79.32.t01	ALFA
GSVIVT00019194001	lcl JGVv21.12.t01	BETA
GSVIVT00015487001	lcl JGVv1.77.t01	ALFA
GSVIVT00018468001	lcl JGVv19.336.t01	ALFA
GSVIVT00033241001	lcl JGVv2.750.t01	BETA
GSVIVT00019189001	lcl JGVv21.15.t01	BETA
GSVIVT00025829001	lcl JGVv59.18.t01	BETA
GSVIVT00008223001	lcl JGVv309.4.t01	EXLB
GSVIVT00023946001	lcl JGVv4.48.t01	ALFA
GSVIVT00028201001	lcl JGVv5.225.t01	ALFA
GSVIVT00028456001	lcl JGVv5.451.t01	ALFA
GSVIVT00000596001	lcl JGVv5.451.t01	ALFA
GSVIVT00027653001	lcl JGVv14.258.t01	ALFA
GSVIVT00001065001	lcl JGVv25.427.t01	ALFA
GSVIVT00036296001	lcl JGVv38.69.t01	ALFA
GSVIVT00000851001	lcl JGVv53.69.t01, lcl JGVv4.767.t01	ALFA
GSVIVT00037484001	lcl JGVv58.28.t01	ALFA
GSVIVT00038010001	lcl JGVv68.55.t01	ALFA
GSVIVT00020991001	lcl JGVv108.94.t01	ALFA
GSVIVT00015809001	lcl JGVv12.188.t01	EXLB
GSVIVT00013491001	lcl JGVv309.7.t01	EXLB
GSVIVT00011230001	lcl JGVv1455.1.t01	EXLB

Tabella 1. corrispondenza tra i codici 8.4X-12X

Delle 29 sequenze identificate nel genoma, riportate nell'appendice 10, solamente 14 sono presenti sul chip Grape Array 1.2 e 5 di queste risultano modulate in maniera significativa nei sei stadi di sviluppo presi in esame (Tab.2).

Codice 8.4X	Grape Array 1.2	NON ESPRESSI	ELIMINATI PER CV	MODULATI	NON MODULATI
GSVIVT00016318001	TC53065			*	
GSVIVT00021324001	TC60639			*	
GSVIVT00036942001	TC68202			*	
GSVIVT00029445001	TC68519			*	
GSVIVT00036225001	TC54149			*	
GSVIVT00024306001	TC65754				*
GSVIVT00023470001	TC55820				*
GSVIVT00019194001	GSVIVT00019194001	*			
GSVIVT00015487001	TC57659		*		
GSVIVT00018468001	TC58404		*		
GSVIVT00033241001	CF413649		*		
GSVIVT00019189001	GSVIVT00019189001		*		
GSVIVT00025829001	TC55336		*		
GSVIVT00008223001	GSVIVT00008223001				*

Tabella 2. andamento dei geni codificanti EXP nell'analisi microarray

Codice 8.4X	INV	PREMAT	MAT	APP1	APP2	APP3
GSVIVT00016318001	1,00	1,50	-1,11	-2,58	-3,06	-3,76
GSVIVT00021324001	1,00	-4,36	-4,98	-8,94	-5,82	-4,92
GSVIVT00036942001	1,00	1,06	-1,02	-1,29	-2,20	-2,10
GSVIVT00029445001	1,00	-1,64	-1,97	-4,20	-3,52	-2,88
GSVIVT00036225001	1,00	-3,42	-2,43	-5,21	-3,58	-3,34

Tabella 3. andamento dei geni modulati

Tutte le sequenze geniche modulate presentano un andamento decrescente negli stadi di appassimento rispetto all'invaiaitura; GSVIVT00016318001 e GSVIVT00036942001 mostrano un picco di espressione alla prematurazione, per poi diminuire negli altri stadi (Tab.3), (Fig.5).

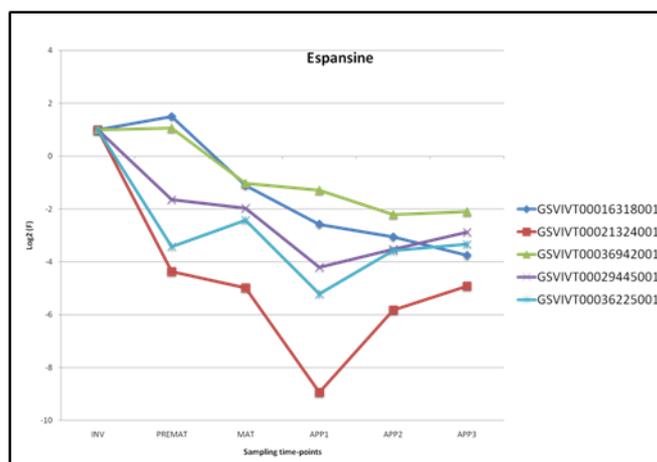


Figura 5. grafico dell'andamento dei geni modulati

L'espressione di alcuni geni di espansina è stata studiata mediante Real time RT-PCR; la quantità di trascritto relativa alla sequenza GSVIVT00029445001 è massima alla prematurazione, mentre è praticamente assente nelle fasi di appassimento (Fig.6). Ishimaru et al.,(2006) hanno studiato l'espressione dello stesso gene, *Vlexp3*, su bacche intere della varietà Kyoho, durante 9 diversi stadi che vanno da 2 settimane dopo la fioritura fino a maturazione. Segnali di ibridazione cominciano a comparire alla pre-invaiatura, ma l'intensità massima viene raggiunta 8 settimane post antesi, quando circa il 50% delle bacche appare colorato. Schlosser et al., (2008) hanno osservato che l'espressione dello stesso gene su bacche della varietà Cabernet Sauvignon risulta massima a 71 giorni post antesi nelle bacche rosse, sia per l'endocarpo, sia per il mesocarpo.

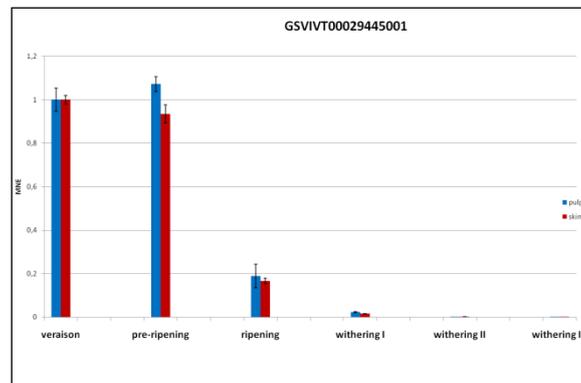


Figura 6. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00029445001

L'espressione del gene GSVIVT00036225001 è confinata quasi esclusivamente nella polpa ed è presente in quasi tutti gli stadi analizzati, compresi quelli di appassimento (Fig.7). Nella varietà Cabernet Sauvignon lo stesso gene (*EXPL*) è sottoespresso fino a 71 giorni post antesi, dove raggiunge un picco, per poi riscendere.

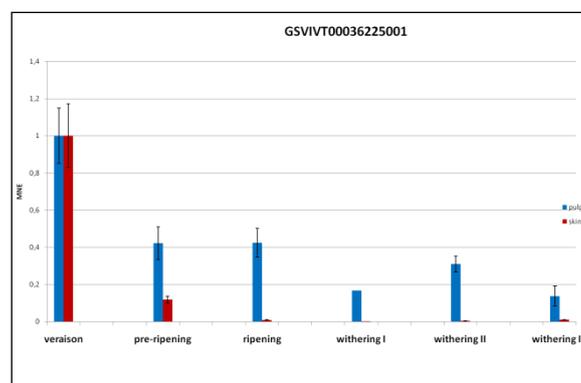


Figura 7. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00036225001

Il livello di trascritto del gene GSVIVT00016318001 presenta un picco nella polpa durante la prematurazione, mentre durante l'appassimento è maggiormente espresso nella buccia (Fig.8).

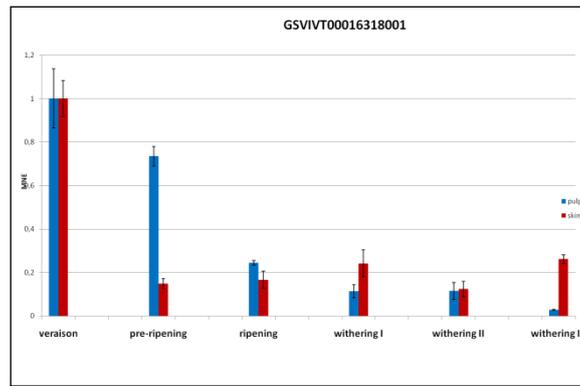


Figura 8. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00016318001

Sono state poi studiate le espressioni di altri geni di espansine, non modulati significativamente dall'analisi statistica. GSVIVT00000851001, è espresso quasi esclusivamente durante l'invaiaitura e la prematurazione (Fig.9). Analogamente, nella varietà Kyoho, il trascritto corrispondente al gene *Vlexp1*(GSVIVT00000851001) è massimo a 8 settimane post antesi e diminuisce negli stadi successivi.

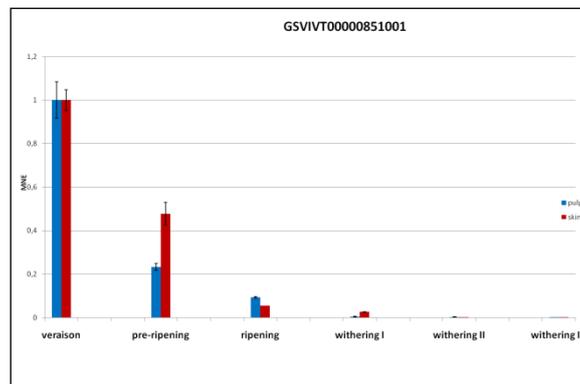


Figura 9. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00000851001

GSVIVT00023470001 ha espressione preferenziale nella polpa (Fig.10), mentre il gene GSVIVT00024306001 è espresso a bassi livelli già durante la prematurazione (Fig.11).

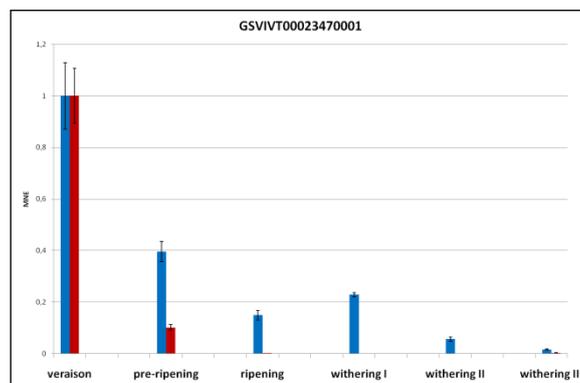


Figura 10. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00023470001

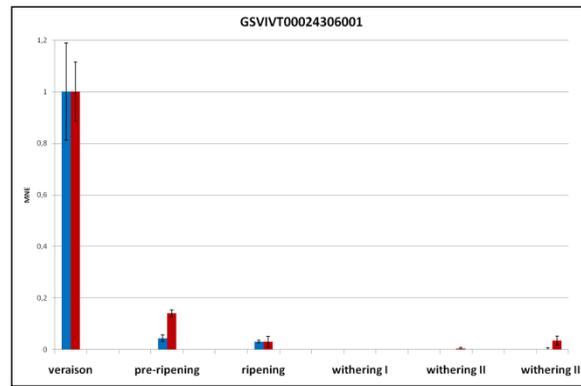


Figura 11. analisi Real time RT PCR del gene GSVIVT00024306001

Ishimaru et al., (2006) riportano anche informazioni riguardanti il gene GSVIVT00020991001 (*Vlexp2*), non presente sul chip Grape Array 1.2, ma identificato come espansina A in base alla sequenza amminoacidica. L'espressione aumenta man mano che procede lo sviluppo della bacca, raggiunge un picco a maturazione e rimane alta fino a maturità

Infine GSVIVT00015487001 e GSVIVT00018468001, denominate rispettivamente EXP1 e EXP3 da Schlosser et al.,(2008) e catalogate come EXPA, hanno comportamento analogo nei tessuti di endo e mesocarpo; EXP1 è sovra regolato durante il secondo periodo di crescita attiva della bacca, mentre il trascritto corrispondente a EXP3 decresce man mano che procede lo sviluppo.

Conclusioni

L'ammorbidimento della bacca di vite è stato studiato fino ad ora in termini di cambiamenti nei componenti di parete e a livello di espressione genica. Studi effettuati da Ishimaru et Kobayashi nel 2002 hanno suggerito come il gene *VXET1* giochi un ruolo critico nel softening all'invaiaitura e che la proteina VXET1 tagli il network cellulosa-xiloglucano nelle pareti delle bacche della varietà Kyoho.

Le espansine hanno invece mostrato la capacità di estendere rapidamente le pareti cellulari attraverso la distruzione di legami non covalenti che tengono insieme le microfibrille di cellulosa (Sanpedro and Cosgrove, 2005).

La sovra-regolazione e la conseguente sotto-regolazione delle espansine GSVIVT00036225001(EXPL) e GSVIVT00018468001(EXP3) osservate nell'esocarpo a 85 e a 99 giorni post antesi, corrisponderebbero a cambiamenti che si verificano nello spessore delle pareti cellulari localizzate tra i tessuti dell'epi e dell'ipodermide; questo dato indicherebbe che le espansine agiscano modulando l'espansione dei tessuti sottostanti del mesocarpo (Schlosser et al., 2008). La capacità dei tessuti dell'epidermide di controllare l'espansione dei tessuti sottostanti è stata documentata anche in pomodoro (Thompson et al., 1998); esistono inoltre evidenze che la buccia delle bacche di uva possa controllare la crescita post-invaiaitura (Matthews et al., 1987; Huang and Huang 2001; Huang et al., 2005).

È stato inoltre proposto che le espansine regolino l'accessibilità di altri enzimi implicati nella degradazione della parete ai propri substrati polimerici; Rose and Bennet (1999) hanno suggerito un modello nel quale l'azione enzimatica sinergica è probabilmente cruciale per un disassemblaggio coordinato, sia nei tessuti vegetativi, sia nei frutti in fase di maturazione. Hiwasa et al., (2003) hanno osservato in pero che due geni codificanti PG avevano un pattern di espressione simile a quello di quattro geni di espansina considerati marcatori della maturazione; questo dato suggerirebbe che le PG agiscano in modo cooperativo con le espansine, diminuendo la "firmness" del frutto.

Ishimaru et al., (2006) hanno riportato la presenza di tre cDNA codificanti putative espansine, nelle bacche di *V. labruscana* cv Kyoho; i profili di espressione mostrano che i tre geni sono associati alla divisione o all'espansione cellulare e alla maturazione e che la proteina Vlexp3 (GSVIVT00029445001) avrebbe un ruolo fondamentale dell'ammorbidimento della bacca.

I geni di espansina analizzati in questo lavoro mostrano un andamento globalmente decrescente a partire dalla prematurazione e l'espressione genica sembra essere quasi nulla in fase di appassimento; una parziale eccezione è rappresentata dalle sequenze GSVIVT00036225001 e GSVIVT00016318001, espansina simile A ed espansina A rispettivamente, nelle quali la presenza di trascritto viene sensibilmente rilevata, anche se a bassi livelli, in fase di appassimento.

Zamboni et al.,(2010) hanno inoltre identificato il trascritto (TC70381), corrispondente all'espansina A GSVIVT00029445001, come putativo marcatore negativo tra le fasi di prematurazione e maturazione della bacca d'uva, confermando così che tale proteina è espressa prevalentemente nel precedente periodo di marcata divisione ed espansione cellulare.

APPENDICE 1: ELENCO PECTINMETILESTERASI

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession number	Iasma gene	Posizione
GSVIVT00026390001	TC69684	pectinesterase family	A7PYC8	VITISV_005130	15_5186767_5189092
GSVIVT00037264001	TC69415	pectinesterase family	A7QF40		16_8092452_8094500
GSVIVT00033996001	TC63941	pectinesterase PME1	A7P6A9	VITISV_034303	9_242275_244630
GSVIVT00021009001	TC63388	pectinesterase family	A7PMZ9		14_19009264_19012892
GSVIVT00033995001	TC54422	pectinesterase PME3	A7P6A8		9_237198_240242
GSVIVT00017261001	GSVIVT00017261001	pectinesterase family	A7PFV3		6_14670901_14672599
GSVIVT00000569001	GSVIVT00000569001	pectinesterase family	A7QJA8		8_17394065_17396171
GSVIVT00006213001	GSVIVT00006213001	pectinesterase family	A7QT93		1_15291928_15310313
GSVIVT00006345001	GSVIVT00006345001	pectinesterase family	A7QTI3		Unrandom_37893060_37894678
GSVIVT00006908001	TC62593	pectinesterase family	A7QUM5		10random_1412464_1414424
GSVIVT00009598001	DT016819	pectinesterase family	A7QY79	VITISV_009308	2_5575222_5577707
GSVIVT00012763001	GSVIVT00012763001	pectinesterase family	A7R980		Unrandom_151932182_151933313
GSVIVT00014144001	TC63208	pectinesterase family	A7PBL1		16_3733462_3735012
GSVIVT00014146001	GSVIVT00014146001	pectinesterase PPME1	A7PBL3		16_3806215_3840798
GSVIVT00014147001	GSVIVT00014147001	pectinesterase PPME1	A7PBL4		16_3841342_3842977
GSVIVT00014152001	GSVIVT00014152001	pectinesterase PPME1	A7PBL8		16_3887618_3889110
GSVIVT00014154001	GSVIVT00014154001	pectinesterase PPME1	A7PBL9		16_3923956_3925682
GSVIVT00014596001	GSVIVT00014596001	pectinesterase family	A7NTA9		18_10700414_10702963
GSVIVT00016357001	TC55346	pectinesterase PME3	A7PDP1		11_283822_287561
GSVIVT00016358001	GSVIVT00016358001	pectinesterase family	A7PDP2		11_291734_293902
GSVIVT00016359001	TC62346	pectinesterase family	A7PDP3		11_294936_296989
GSVIVT00016361001	GSVIVT00016361001	pectinesterase family	A7PDP4		11_313070_314442
GSVIVT00016379001	CV092849	pectinesterase PME2	A7PDQ9		11_472079_473966
GSVIVT00016383001	GSVIVT00016383001	pectinesterase PPME1	A7PDR3		11_498122_500374
GSVIVT00016652001	TC70982	pectinesterase family	A7PEG1	VITISV_037092	11_2401463_2404534
GSVIVT00017264001	GSVIVT00017264001	pectinesterase family	A7PFV5		6_14647103_14648645
GSVIVT00017266001	CX016892	pectinesterase family	A7PFV6		6_14633962_14635662
GSVIVT00017269001	EV230545	pectinesterase family	A7PFV8		6_14584238_14585934

GSVIVT00019719001	GSVIVT00019719001	Pectinesterase	A7NVZ1		5_2566339_2568134
GSVIVT00022520001	TC67636	pectinesterase family	A7PRI5	VITISV_037760	14_362089_363444
GSVIVT00022591001	GSVIVT00022591001	pectinesterase family	A7PRQ3		14_785229_803430
GSVIVT00022687001	GSVIVT00022687001	pectinesterase family	A7PRY8		14_1568074_1569939
GSVIVT00022688001	GSVIVT00022688001	Pectinesterase	A7PRY9		14_1570772_1572283
GSVIVT00026388001	TC69052	pectinesterase family	A7PYC6		15_5204239_5206754
GSVIVT00028033001	GSVIVT00028033001	pectinesterase family	A7Q0F7		7_3720079_3722095
GSVIVT00028034001	TC56317	pectinesterase family	A7Q0F8		7_3729392_3732128
GSVIVT00028162001	CV098869	pectinesterase family	A7Q0S5		7_4740856_4742761
GSVIVT00028250001	GSVIVT00028250001	pectinesterase family	A7Q105		7_5387925_5389740
GSVIVT00028252001	TC64421	pectinesterase family	A7Q106	VITISV_040170	7_5395160_5397008
GSVIVT00029902001	GSVIVT00029902001	pectinesterase family	A7Q4Y4		Unrandom_114431724_114433793
GSVIVT00029904001	TC56663	pectinesterase family	A7Q4Y5		Unrandom_114458610_114461150
GSVIVT00030551001	TC52948	pectinesterase family	A7P3R9	VITISV_026596	1_5026441_5028577
GSVIVT00033038001	GSVIVT00033038001	pectinesterase family	A7Q8F9		5_384667_386534
GSVIVT00033148001	GSVIVT00033148001	pectinesterase family	A7Q8R0		5_1221641_1223086
GSVIVT00033343001	GSVIVT00033343001	Pectinesterase QRT1	A5BC09		19_8137846_8139381
GSVIVT00033558001	TC67884	pectinesterase family	A7Q9N7		5_18089882_18092895
GSVIVT00033939001	GSVIVT00033939001	pectinesterase family	A7QAI2		Unrandom_126127520_126129300
GSVIVT00033941001	GSVIVT00033941001	pectinesterase family	A7QAI4		Unrandom_126158341_126159226
GSVIVT00034839001	GSVIVT00034839001	pectinesterase family	A7QB78		4_17668541_17684213
GSVIVT00034841001	GSVIVT00034841001	pectinesterase family	A7QB79		4_17651291_17652906
GSVIVT00034843001	TC58800	pectinesterase family	A7QB80		4_17645540_17647053
GSVIVT00035359001	TC53043	VvPME1 Nunan et al., 2001	A7QCE1	VITISV_003251	Unrandom_132080044_132081366
GSVIVT00036367001	GSVIVT00036367001	pectinesterase family	A7P8Z8		3_3458352_3460282
GSVIVT00036829001	DT017314	pectinesterase family	A7QE21		4_14444707_14446211
GSVIVT00037572001	GSVIVT00037572001	pectinesterase family	A7QFV3		Unrandom_141311380_141313915

APPENDICE 2: ELENCO POLIGALATTURONASI

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession number	Iasma gene	Posizione
GSVIVT00002441001	TC63732	Polygalacturonase GH28	A7QN93	VITISV_012807	2_1059365_1064881
GSVIVT00025571001	TC52034	VvPG1, Nunan et al., 2001	Q94B15		8_20688026_20690831
GSVIVT00028234001	TC59916	Polygalacturonase GH28	A7Q0Z0		7_5268820_5272556
GSVIVT00019678001	TC69174	Polygalacturonase GH28	A7NVV5	VITISV_044308	5_2251053_2253571
GSVIVT00000091001	TC56906	Polygalacturonase GH28	A7QI47		17_6208409_6211095
GSVIVT00000092001	GSVIVT00000092001	Polygalacturonase GH28	A7QI48		17_6211763_6213832
GSVIVT00000299001	GSVIVT00000299001	glycosyl hydrolase family 28 protein	A7QIK6		9_7128349_7132250
GSVIVT00000355001	GSVIVT00000355001	Polygalacturonase GH28	A7QIQ4		9_6558764_6561569
GSVIVT00000358001	CB913712	Polygalacturonase GH28	A7QIQ7	VITISV_039094	9_6538293_6541108
GSVIVT00000359001	GSVIVT00000359001	glycosyl hydrolase family 28 protein	A7QIQ8		9_6527903_6535119
GSVIVT00000362001	GSVIVT00000362001	glycosyl hydrolase family 28 protein	A7QIR0		9_6494509_6515469
GSVIVT00002554001	TC59719	Polygalacturonase GH28	A7QNJ7		2_185524_187534
GSVIVT00002737001	DT036758	Polygalacturonase GH28	A7QNZ6	VITISV_006410	1random_665605_669557
GSVIVT00002738001	TC60915	Polygalacturonase GH28	A7QNZ7	VITISV_006411	1random_675970_679075
GSVIVT00002763001	GSVIVT00002763001	Polygalacturonase GH28	A7QP20		1random_938898_941555
GSVIVT00004111001	GSVIVT00004111001	Polygalacturonase GH28	A7R416		Unrandom_93173329_93174867
GSVIVT00004112001	GSVIVT00004112001	Polygalacturonase GH28	A7R417		Unrandom_93176934_93178473
GSVIVT00005029001	CF609870	Polygalacturonase GH28	A7R576		Unrandom_102244557_102246516
GSVIVT00006625001	GSVIVT00006625001	polygalacturonase PGA3	A7QU02		Unrandom_41766680_41767515
GSVIVT00008523001	GSVIVT00008523001	Polygalacturonase GH28	A7R716		Unrandom_107727528_107728929
GSVIVT00008525001	GSVIVT00008525001	exopolygalacturonase	A7R718		Unrandom_107735041_107736041
GSVIVT00011991001	GSVIVT00011991001	Polygalacturonase GH28	A7R8L6		Unrandom_50294373_50295136
GSVIVT00011992001	GSVIVT00011992001	Polygalacturonase GH28	A7R8L7		Unrandom_50297196_50298815
GSVIVT00013450001	GSVIVT00013450001	Polygalacturonase GH28	A7R349		Unrandom_91577907_91579866
GSVIVT00016404001	TC52628	Polygalacturonase GH28	A7PDT4	VITISV_024399	11_666515_675665
GSVIVT00018823001	GSVIVT00018823001	Polygalacturonase GH28	A7PJP5		12_1906439_1907927
GSVIVT00018824001	GSVIVT00018824001	Polygalacturonase GH28	A7PJP6		12_1896226_1898310

GSVIVT00018826001	GSVIVT00018826001	Polygalacturonase GH28	A7PJP8		12_1881629_1883114
GSVIVT00020714001	TC70021	Polygalacturonase GH28	A7PM78		14_16715414_16717977
GSVIVT00022548001	GSVIVT00022548001	Glycosyde hydrolase family 28 protein	A7PRL2		14_550119_551973
GSVIVT00025514001	GSVIVT00025514001	polygalacturonase PG1	A7PW87		8_20211962_20214725
GSVIVT00025516001	GSVIVT00025516001	polygalacturonase PG1	A7PW88		8_20222428_20225240
GSVIVT00025518001	GSVIVT00025518001	polygalacturonase PG1	A7PW90		8_20232618_20235319
GSVIVT00025519001	TC63753	polygalacturonase PG1	A7PW91	VITISV_026267	8_20237802_20240523
GSVIVT00025529001	TC66168	Polygalacturonase GH28	A7PW99		8_20327132_20330573
GSVIVT00025571001	TC52034	polygalacturonase PG1	Q94B15		8_20688026_20690831
GSVIVT00026920001	TC56055	Polygalacturonase GH28	A7PZL3		15random_3111583_3113916
GSVIVT00027224001	GSVIVT00027224001	Polygalacturonase GH28	A7P0G7		19_7548011_7549506
GSVIVT00028037001	GSVIVT00028037001	polygalacturonase PGA4	A7Q0G1		7_3756351_3758417
GSVIVT00028050001	GSVIVT00028050001	Polygalacturonase GH28	A7Q0H4		7_3861030_3862344
GSVIVT00028122001	GSVIVT00028122001	polygalacturonase PG1	A7Q0N9		7_4419490_4421027
GSVIVT00028123001	GSVIVT00028123001	Polygalacturonase GH28	A7Q0P0		7_4421081_4421600
GSVIVT00028177001	GSVIVT00028177001	Glycoside hydrolase family 28 protein	A7Q0T9		7_4850601_4864871
GSVIVT00028778001	TC58604	Polygalacturonase GH28	A7Q284		13_14291281_14294795
GSVIVT00028779001	GSVIVT00028779001	Polygalacturonase GH28	A7Q285		13_14299408_14302761
GSVIVT00028783001	TC57725	Polygalacturonase GH28	A7Q287		13_14329112_14331045
GSVIVT00029160001	CF604302	exopolygalacturonase	A7Q358	VITISV_002009	12_9677678_9679275
GSVIVT00029161001	GSVIVT00029161001	polygalacturonase PGA3	A7Q359		12_9679954_9681583
GSVIVT00029164001	GSVIVT00029164001	exopolygalacturonase	A7Q362		12_9698092_9698992
GSVIVT00029165001	GSVIVT00029165001	exopolygalacturonase	A7Q363		12_9699649_9700561
GSVIVT00029166001	GSVIVT00029166001	Polygalacturonase GH28	A7Q364		12_9700614_9701180
GSVIVT00029167001	GSVIVT00029167001	exopolygalacturonase	A7Q365		12_9702763_9704249
GSVIVT00029168001	GSVIVT00029168001	exopolygalacturonase	A7Q366		12_9709134_9710217
GSVIVT00029169001	GSVIVT00029169001	Polygalacturonase GH28	A7Q367		12_9716969_9718457
GSVIVT00029171001	DT010865	exopolygalacturonase	A7Q369		12_9724569_9726222
GSVIVT00030024001	GSVIVT00030024001	glycosyl hydrolase family 28 protein	A7P2E3		1_360763_362254
GSVIVT00033044001	CF207353	Polygalacturonase GH28	A7Q8G4	VITISV_012014	5_430085_432532

GSVIVT00033045001	GSVIVT00033045001	exopolygalacturonase	A7Q8G5		5_433599_436383
GSVIVT00033059001	GSVIVT00033059001	Polygalacturonase GH28	A7Q8H9		5_515031_536608
GSVIVT00033721001	GSVIVT00033721001	glycosyl hydrolase family 28 protein	A7QA24		Unrandom_126940185_126949020
GSVIVT00033740001	GSVIVT00033740001	glycosyl hydrolase family 28 protein	A7QA37		Unrandom_127374521_127381117
GSVIVT00034593001	TC60288	Polygalacturonase GH28	A7P7T9		9_6219788_6223810
GSVIVT00034745001	GSVIVT00034745001	Polygalacturonase GH28	A5BNQ9		5_22964730_22966957
GSVIVT00034746001	GSVIVT00034746001	Polygalacturonase GH28	A5BNQ7		5_22969522_22981034
GSVIVT00034796001	EV230405	Polygalacturonase GH28	A7QB41		4_18301075_18304008
GSVIVT00035779001	GSVIVT00035779001	polygalacturonase PGA3	A7QDB8		Unrandom_133884030_133892545
GSVIVT00035782001	GSVIVT00035782001	Polygalacturonase GH28	A7QDC1		Unrandom_133936302_133937095
GSVIVT00035783001	GSVIVT00035783001	polygalacturonase PGA3	A7QDC2		Unrandom_133937172_133951194
GSVIVT00035784001	GSVIVT00035784001	exopolygalacturonase	A7QDC3		Unrandom_133951737_133953188
GSVIVT00036291001	GSVIVT00036291001	Polygalacturonase GH28	A7P8S7		3_2896879_2899366
GSVIVT00037720001	TC64309	Polygalacturonase GH28	A7QG67		Unrandom_139363383_139366950
GSVIVT00037721001	TC60770	Polygalacturonase GH28	A7QG68		Unrandom_139368097_139372766
GSVIVT00037722001	GSVIVT00037722001	Peptidase S26A, signal peptidase I	A7QG69		Unrandom_139374399_139377050
GSVIVT00037723001	GSVIVT00037723001	Polygalacturonase GH28	A7QG70		Unrandom_139377553_139379388

APPENDICE 3: ELENCO PECTATO LIASI

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession Number	IASMA gene	Posizione
GSVIVT00000608001	TC59761	pectate lyase	A7QJE6		8_17780315_17788067
GSVIVT00018131001	CF404655	pectate lyase	A7PHZ1		13_6749337_6753126
GSVIVT00020459001	TC68391	VvPL1 (Nunan et al, 2001)	A7NXS8	VITISV_004934	5_11607516_11611624
GSVIVT00030705001	TC53176	pectate lyase	A7P457	VITISV_007917	1_6884485_6886520
GSVIVT00001248001	TC54616	pectate lyase	A7QKS5	VITISV_008675	Unrandom_8235904_8241187
GSVIVT00015920001	TC59236	pectate lyase	A7PCL8	VITISV_004734	17_11777423_11779582
GSVIVT00018134001	GSVIVT00018134001	pectate lyase	A7PHZ4		13_6737949_6739358
GSVIVT00020601001	TC62787	VvPeI Papadakis G.N., Kanellis A.K.	A7PLX6		14_15682394_15684023
GSVIVT00023108001	CB340384	pectate lyase	A7PSW4	VITISV_005608	8_12657078_12663929
GSVIVT00029520001	GSVIVT00029520001	pectate lyase	A7Q434		13_2200269_2203037
GSVIVT00000098001	GSVIVT00000098001	Pectate lyase, N-terminal	A7QI53		17_6273106_6274701
GSVIVT00006874001	GSVIVT00006874001	pectate lyase like protein	A5AKT2		10random_1066956_1068440
GSVIVT00020887001	GSVIVT00020887001	pectate lyase	A5ACS2		14_18056203_18058141
GSVIVT00028997001	GSVIVT00028997001	Pectate lyase, N-terminal	A7Q2S4		1_9693626_9695513
GSVIVT00033372001	CB288313	pectate lyase 2	A7Q982		19_8578771_8580747

APPENDICE 4: ELENCO XILOGLUCANO ENDOTRANSGLICOSILASI

Codici 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession number	Iasma gene	Posizione
GSVIVT00031408001	TC58991	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q6I4	VITISV_019831	11_13159527_13160766
GSVIVT00031397001	GSVIVT00031397001	xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH3	A7Q6H4		11_13108271_13109518
GSVIVT00006236001	TC53508	VvXET2 Nunan et al., 2001	A7QTB5		1_15469337_15471661
GSVIVT00015670001	TC69342	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 30	A7PC14		2_9080053_9082156
GSVIVT00003478001	TC64184	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15	A7QQR8		Unrandom_28952398_28953928
GSVIVT00022167001	TC69305	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32	A7PQR5		6_22197138_22198875
GSVIVT00031410001	GSVIVT00031410001	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A5C3A3		11_13167706_13169049
GSVIVT00006913001	TC54445	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8	A7QUM9		10random_1432512_1434559
GSVIVT00028840001	DT005985	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 28	A7Q2D5		1_7687308_7688529
GSVIVT00031412001	GSVIVT00031412001	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A7Q6I8		11_13174580_13175869
GSVIVT00033487001	TC54729	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q9I0		5_17004648_17006332
GSVIVT00030638001	TC53835	xyloglucan endotransglycosylase	A7P3Z8	VITISV_018042	1_6183927_6186890
GSVIVT00007248001	TC55069	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7QV94		Unrandom_46243816_46245224
GSVIVT00026138001	GSVIVT00026138001	xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase precursor XTH-39	A7PXR0		15_7554041_7555054
GSVIVT00031407001	GSVIVT00031407001	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A7Q6I3		11_13156290_13157670
GSVIVT00031405001	CF206157	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q6I1		11_13144295_13146099
GSVIVT00037032001	GSVIVT00037032001	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9 precursor	A7QEI8		17random_383331_385779
GSVIVT00003480001	TC60314	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7QQS0		Unrandom_28965224_28966886
GSVIVT00003461001	DN947401	VvXET1 Nunan et al., 2001	A7QQQ6		Unrandom_28731058_28734404
GSVIVT00000619001	CF605130	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32	A7QJF7		8_17893779_17895396
GSVIVT00038589001	GSVIVT00038589001	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	A7QH23		3_8452980_8454163
GSVIVT00031402001	TC52577	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q6H9		11_13123732_13124955
GSVIVT00026115001	TC57673	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase 16	A5BHG3	VITISV_024798	12_5105866_5107896
GSVIVT00031398001	TC60614	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q6H5	VITISV_036640	11_13110829_13112125

GSVIVT00031406001	TC63269	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q6I2		11_13152661_13153889
GSVIVT00003361001	GSVIVT00003361001	xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase precursor XTH-21	A7QQH2		Unrandom_22843329_22844432
GSVIVT00011620001	GSVIVT00011620001	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	A7R0U2		Unrandom_75993614_76006081
GSVIVT00012058001	GSVIVT00012058001	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	A7R8R2		Unrandom_87587463_87588944
GSVIVT00012496001	GSVIVT00012496001	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	A7R1Z2		Unrandom_81130404_81131694
GSVIVT00016699001	GSVIVT00016699001	Xyloglucan endo-transglycosylase, C-terminal	A7PEK6		11_2807344_2809365
GSVIVT00022668001	GSVIVT00022668001	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	A7PRX1		14_1366393_1367590
GSVIVT00031392001	GSVIVT00031392001	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A7Q6G9		11_13102762_13103250
GSVIVT00031393001	GSVIVT00031393001	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A7Q6H0		11_13104158_13104499
GSVIVT00031395001	TC55095	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q6H2	VITISV_036642	11_13105195_13106229
GSVIVT00031399001	GSVIVT00031399001	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A7Q6H6		11_13112988_13114041
GSVIVT00031401001	CF206650	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A7Q6H8		11_13121296_13122346
GSVIVT00031411001	GSVIVT00031411001	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6	A7Q6I7		11_13171125_13172160
GSVIVT00031413001	DY474822	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23	A7Q6I9	VITISV_032594	11_13177414_13178733

APPENDICE 5: ELENCO ACQUAPORINE

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession number	IASMA gene	Posizione
GSVIVT00000433001	AF141899	VvPIP1;3	Q0MX16	VITISV_016461	2_2811240_2815181
GSVIVT00000446001	TC58458	VvNIP5;1	A7QIZ2		2_2709903_2713209
GSVIVT00000605001	TC66009	VvTIP1;2	A7QJE3	VITISV_032929	8_17764676_17766458
GSVIVT00003903001	GSVIVT00003903001	VvNIP8;2	A7R3R9		Unrandom_89055487_89058775
GSVIVT00013854001	TC64551	VvTIP3;1	A7PAW8		16_104891_106242
GSVIVT00022146001	TC55300	VvTIP1;3	A7PQP6		6_22421479_22426086
GSVIVT00023192001	TC60678	VvPIP2;3	A7PT31		8_11871846_11873416
GSVIVT00024536001	TC57468	Aquaporin PIP2B	Q2HZF5		6_3566724_3568318
GSVIVT00026881001	TC60619	VvPIP1;2	A3FA66		15random_2737396_2745107
GSVIVT00026882001	TC58734	VvPIP1;5	A7PZH6		15random_2748219_2751670
GSVIVT00029248001	AF141643	VvPIP;1	A3FA63	VITISV_038809	13_151279_152832
GSVIVT00032441001	TC59205	VvTIP4;1	A5ANK1	VITISV_020091	4_2901256_2902857
GSVIVT00033750001	GSVIVT00033750001	VvNIP6;1	A7QA46		Unrandom_127645141_127647409
GSVIVT00034350001	TC58032	VvTIP2;1	Q0MX09	VITISV_011435	9_3668354_3669879
GSVIVT00036133001	TC68434	VvPIP2;2	A7P8C9	VITISV_007541	3_1746277_1747844
GSVIVT00005226001	GSVIVT00005226001	Aquaporin TIP2;2	A7R511		Unrandom_101975114_101976312
GSVIVT00007127001	GSVIVT00007127001	VvNIP8;1	A7QV20		Unrandom_45152697_45189966
GSVIVT00011149001	DT015892	VvNIP4;1	A7R832		Unrandom_153709724_153711992
GSVIVT00018548001	AF271660	VvTIP1;1	A7PJ07	VITISV_007330	13_2514297_2515995
GSVIVT00019170001	GSVIVT00019170001	VvTIP5;2	A7PKH0		15_3958820_3959946
GSVIVT00019910001	GSVIVT00019910001	VvNIP7;1	A7NWX4		5_4366859_4368122
GSVIVT00022377001	GSVIVT00022377001	VvNIP3;1	A7PR88		14random_3172889_3223629
GSVIVT00024394001	AF271662	VvTIP1;4	A7NZ69		6_5052747_5054023
GSVIVT00029946001	GSVIVT00029946001	VvTIP5;1	A7Q518		Unrandom_115318404_115319312
GSVIVT00035815001	GSVIVT00035815001	VvNIP1;1	A7QDF1		10_2126400_2128291
GSVIVT00012703001	GSVIVT00012703001	VvTIP2;2	A7R938		Unrandom_151319537_151321552
GSVIVT00023346001	TC53276	VvSIP2;1	A7PTG3		8_10224144_10229077
GSVIVT00025504001	CD711726	VvSIP1;1	A7PW79	VITISV_037967	8_20152723_20158175

APPENDICE 6: ELENCO CHITINASI

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession number	Iasma gene	Posizione
GSVIVT00011588001	TC51703	Chitinase precursor	Q9FS45	VITISV_033490	Unrandom_77260231_77261798
GSVIVT00011591001	CB349103	Endochitinase C, basic	A7R0S4		Unrandom_77278568_77279607
GSVIVT00033113001	CF568854	endochitinase A2 precursor	A5B1C7	VITISV_034797	5_891630_894040
GSVIVT00033575001	TC62834	Chitinase	A7Q9Q3		5_18390295_18392526
GSVIVT00034626001	TC57889	Chitinase class IV	A7QAP0	VITISV_009137	5_21998475_21999387
GSVIVT00034638001	TC64563	Chitinase class IV	A7QAQ0		5_22062712_22065644
GSVIVT00034636001	GSVIVT00034636001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAP8		5_22048502_22049548
GSVIVT00034640001	GSVIVT00034640001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAQ2		5_22081857_22083401
GSVIVT00034644001	CF205270	Chitinase class IV	Q7XAU6		5_22106340_22107858
GSVIVT00034646001	CF202548	Chitinase class IV	A7QAQ7		5_22111188_22117922
GSVIVT00034647001	TC63731	Chitinase class IV	A5AJB3	VITISV_010460	5_22122704_22124101
GSVIVT00011587001	GSVIVT00011587001	chitinase [Vitis vinifera]	A7R0S0		Unrandom_77255826_77257185
GSVIVT00011868001	GSVIVT00011868001	chitinase [Vitis vinifera]	A7R1C1		Unrandom_78141713_78149894
GSVIVT00028231001	GSVIVT00028231001	chitinase Class I	A7Q0Y7		7_5250020_5250909
GSVIVT00034623001	DT007415	Chitinase class IV	A5BKN8		5_21977811_21978906
GSVIVT00034628001	CV099293	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAP2		5_22005566_22006476
GSVIVT00034629001	GSVIVT00034629001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAP3		5_22008862_22009792
GSVIVT00034631001	GSVIVT00034631001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAP5		5_22014448_22015153
GSVIVT00034632001	GSVIVT00034632001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAP6		5_22016660_22017572
GSVIVT00034634001	GSVIVT00034634001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAP7		5_22038337_22039278
GSVIVT00034637001	GSVIVT00034637001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A7QAP9		5_22050767_22051642
GSVIVT00034642001	GSVIVT00034642001	Chitinase, class IV [Vitis vinifera]	A5AK36		5_22098577_22100251
GSVIVT00036222001	CF205104	Endochitinase 1, basic	Q546P8	VITISV_016509	3_2444238_2445641

APPENDICE 7: ELENCO CELLULASI

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession number	Iasma gene	Posizione
GSVIVT00032287001	GSVIVT00032287001	endo-1,4-beta-glucanase	A7P4U5		4_1637841_1640696
GSVIVT00011357001	TC52380	Endo-1,4-beta-glucanase	A7R0A4	VITISV_025978	Unrandom_68717288_6872221
GSVIVT00028035001	TC61627	VvCEL1 Nunan et al., 2001	A7Q0F9		7_3740216_3742777
GSVIVT00036796001	GSVIVT00036796001	cellulase2	A7QDZ4		4_14664435_14667110
GSVIVT00006761001	TC66250	CEL Schlosser et al., 2008	A7QUA9	VITISV_031862	2_1195130_1199665
GSVIVT00009333001	CN006176	endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN (KOR)	A7QXR8	VITISV_016152	Unrandom_59822977_59826596
GSVIVT00023037001	CK906709	Endo-1,4-beta-glucanase	A7PSQ7	VITISV_032305	6_15382092_15384434
GSVIVT00014277001	GSVIVT00014277001	cellulase	A7NSI7		18_13660046_13662305
GSVIVT00030207001	GSVIVT00030207001	endo-1,4-beta-glucanase	A7P2W2		1_1832376_1835508
GSVIVT00032288001	GSVIVT00032288001	cellulase	A7P4U6		4_1641780_1644733
GSVIVT00035959001	GSVIVT00035959001	endo-1,4-beta-glucanase	A7P7X9		3_562651_565135
GSVIVT00000510001	AY043235	VvCEL2 Nunan et al., 2001	A7QJ52		2_2237852_2239824
GSVIVT00014445001	TC53433	Endo-1,4-beta-glucanase	A7NSX3		18_11943393_11948109
GSVIVT00002534001	CF609661	cellulase	A7QNH8		2_323715_327182
GSVIVT00027271001	GSVIVT00027271001	endo-beta-1,4-glucanase	A7P0K6		19_7076642_7083896
GSVIVT00029312001	GSVIVT00029312001	cellulase	A7Q3J5		13_650262_652973
GSVIVT00029313001	GSVIVT00029313001	cellulase	A7Q3J6		13_653809_656126
GSVIVT00029899001	GSVIVT00029899001	endo-1,4-beta-glucanase	A7Q4Y1		Unrandom_114385933_114390935
GSVIVT00029901001	GSVIVT00029901001	endo-1,4-beta-glucanase	A7Q4Y3		Unrandom_114416413_114422776
GSVIVT00032043001	GSVIVT00032043001	endo-1,4-beta-glucanase	A7Q7X8		18_15210760_15214021

APPENDICE 8: ELENCO CELLULOSA-SINTASI

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession Number	IASMA gene	Posizione
GSVIVT00002977001	TC62957	cellulose synthase CESA2	A7QPK7		18_143885_148891
GSVIVT00010946001	TC53451	cellulose synthase CSLE1	A7R028		Unrandom_69955244_69960031
GSVIVT00010950001	CB978247	cellulose synthase CSLE1	A7R031	VITISV_017330	Unrandom_69977489_69980826
GSVIVT00014029001	TC68390	Cellulose synthase CSLD3	A7PBB7	VITISV_042740	16_2095003_2100041
GSVIVT00019341001	GSVIVT00019341001	cellulose synthase CESA2	A5BQN2		7_13336448_13343743
GSVIVT00028062001	CF608110	Cellulose synthase CSLD5	A7Q0I5		7_3956388_3960149
GSVIVT00031177001	GSVIVT00031177001	cellulose synthase CSLD1	A7Q609		14_6914014_6917835
GSVIVT00032621001	GSVIVT00032621001	cellulose synthase CESA1	A7P5Q6		4_4718555_4725204
GSVIVT00036318001	TC56773	cellulose synthase CESA2	A7P8V1	VITISV_002674	3_3048888_3057086
GSVIVT00006707001	TC69075	cellulose synthase CSLG3	A7QU57	VITISV_000324	2_1609950_1612908
GSVIVT00006719001	GSVIVT00006719001	cellulose synthase CSLG3	A7QU69		2_1537689_1541378
GSVIVT00006720001	TC56091	cellulose synthase CSLG3	A7QU70		2_1526411_1530419
GSVIVT00015671001	TC68684	Cellulose synthase CSLD2	A7PC15	VITISV_038092	2_9042810_9047120
GSVIVT00020164001	TC55634	cellulose synthase CSLG2	A7NX35	VITISV_002996	5_6844287_6848574
GSVIVT00020166001	TC63179	cellulose synthase CSLG3	A7NX37		5_6880194_6880993
GSVIVT00021276001	GSVIVT00021276001	pentatricopeptide	A7PNI8		1_14007174_14044108
GSVIVT00025577001	CO818493	cellulose synthase CESA3	A7PWE3		8_20736516_20759371
GSVIVT00025911001	DN945715	Cellulose synthase CSLB04	A7PX60		12_6921789_6925448
GSVIVT00028523001	TC56114	Cellulose synthase CESA4	A7Q1M3		7_7599199_7603699
GSVIVT00031746001	CK906598	cellulose synthase CESA2	A7Q795		18random_1687927_1695563
GSVIVT00033396001	TC57597	cellulose synthase CSLE1	A7Q9A3	VITISV_036212	19_8799300_8800752
GSVIVT00035840001	TC59569	Cellulose synthase CESA8	A7QDH4		10_1805091_1811754
GSVIVT00006704001	TC66037	cellulose synthase CSLG3	A7QU54	VITISV_011913	2_1624286_1627740
GSVIVT00006709001	GSVIVT00006709001	cellulose synthase CSLG3	A7QU59		2_1597277_1602777
GSVIVT00010948001	CF207346	cellulose synthase CSLE1	A7R030	VITISV_043855	Unrandom_69965983_69969088
GSVIVT00010209001	GSVIVT00010209001	cellulose synthase CSLG2	A7R7S9		Unrandom_146503827_146504341
GSVIVT00010942001	CF403259	cellulose synthase CSLE1	A7R024		Unrandom_69923655_69928548
GSVIVT00011243001	GSVIVT00011243001	cellulose synthase CSLG3	A7R893		Unrandom_133331_134127

GSVIVT00017182001	CX016848	cellulose synthase IRX3	A7PFP0	VITISV_013112	11_6396208_6400831
GSVIVT00025904001	GSVIVT00025904001	Cellulose synthase CSLB04	A7PX54		12_7037141_7045825
GSVIVT00028223001	TC57717	cellulose synthase CESA3	A7Q0Y0	VITISV_029179	7_5181310_5188022
GSVIVT00003352001	GSVIVT00003352001	cellulose synthase CESA3	A7QQG6		Unrandom_24527280_24528699
GSVIVT00006699001	EV239788	cellulose synthase CSLG3	A7QU50		2_1645184_1648320
GSVIVT00006701001	CF605300	cellulose synthase CSLG3	A7QU52	VITISV_005381	2_1634022_1637822
GSVIVT00006702001	GSVIVT00006702001	cellulose synthase CSLG3	A7QU53		2_1630371_1633294
GSVIVT00006705001	GSVIVT00006705001	cellulose synthase CSLG3	A7QU55		2_1616202_1619329
GSVIVT00006708001	GSVIVT00006708001	cellulose synthase CSLG3	A7QU58		2_1603954_1608414
GSVIVT00006710001	GSVIVT00006710001	cellulose synthase CSLG3	A7QU60		2_1591775_1596029
GSVIVT00006711001	GSVIVT00006711001	cellulose synthase CSLG2	A7QU61		2_1579087_1591289
GSVIVT00006712001	GSVIVT00006712001	cellulose synthase CSLG3	A7QU62		2_1575050_1578414
GSVIVT00006715001	GSVIVT00006715001	cellulose synthase CSLG3	A7QU65		2_1562741_1566285
GSVIVT00006716001	GSVIVT00006716001	cellulose synthase CSLG3	A7QU66		2_1552337_1559688
GSVIVT00008761001	GSVIVT00008761001	Cellulose synthase CSLD5	A7QWQ4		16random_3839140_3839903
GSVIVT00010208001	GSVIVT00010208001	cellulose synthase CSLG3	A7R7S8		Unrandom_146495540_146501267
GSVIVT00010943001	GSVIVT00010943001	cellulose synthase CSLE1	A7R025		Unrandom_69930736_69932010
GSVIVT00010944001	TC64887	cellulose synthase CSLE1	A7R026		Unrandom_69937412_69940586
GSVIVT00010945001	EV235423	cellulose synthase CSLE1	A7R027		Unrandom_69942293_69951124
GSVIVT00010947001	GSVIVT00010947001	cellulose synthase CSLE1	A7R029		Unrandom_69960591_69964374
GSVIVT00011246001	GSVIVT00011246001	cellulose synthase CSLG3	A7R896		Unrandom_137657_139759
GSVIVT00020165001	CD011937	cellulose synthase CSLE1	A7NX36		5_6849209_6873652
GSVIVT00020168001	DT004980	cellulose synthase CSLG2	A7NX38		5_6882959_6884980
GSVIVT00020169001	CF983803	cellulose synthase CSLG2	A7NX39		5_6892708_6925586
GSVIVT00025901001	GSVIVT00025901001	Cellulose synthase CSLB04	A7PX51		12_7098977_7114933
GSVIVT00025903001	GSVIVT00025903001	Cellulose synthase CSLB04	A7PX53		12_7049072_7085394
GSVIVT00025905001	CF513786	Cellulose synthase CSLB04	A7PX55		12_7026004_7030079
GSVIVT00025906001	GSVIVT00025906001	Cellulose synthase CSLB04	A7PX56		12_7002858_7010023
GSVIVT00025907001	GSVIVT00025907001	Cellulose synthase CSLB04	A7PX57		12_6975398_6978316
GSVIVT00025908001	GSVIVT00025908001	Cellulose synthase CSLB04	A7PX58		12_6944682_6969298

GSVIVT00025909001	EV228467	Cellulose synthase CSLB04	A7PX59		12_6942719_6944644
GSVIVT00025913001	GSVIVT00025913001	Cellulose synthase CSLB04	A7PX62		12_6896941_6902992
GSVIVT00028800001	TC52068	cellulose synthase CESA3	A7Q2A3		13_14522455_14530245
GSVIVT00032622001	TC63356	Cellulose synthase CESA1	A7P5Q7	VITISV_018069	4_4725205_4725859
GSVIVT00033394001	EV232046	cellulose synthase CSLE1	A7Q9A1		19_8780014_8783638
GSVIVT00033397001	GSVIVT00033397001	cellulose synthase CSLE1	A7Q9A4		19_8800835_8802937
GSVIVT00034867001	GSVIVT00034867001	cellulose synthase CSLE1	A7QBA0		4_17266502_17281851
GSVIVT00036303001	GSVIVT00036303001	cellulose synthase CSLD4	A7P8T8		3_2964250_2968446

APPENDICE 9: ELENCO INVERTASI

Codice 8.4X	Geni/TC grape array 1.2	Funzione	Accession number	Iasma gene	Posizione
GSVIVT00004764001	TC57719	Vacuolar invertase 2, GIN2	A7R4X6		Unrandom_143168483_143172097
GSVIVT00029907001	TC60693	Vacuolar invertase 1, GIN1	A7Q4Y8	VITISV_034734	Unrandom_114513529_114518023
GSVIVT00021585001	GSVIVT00021585001	beta-fructofuranosidase	A7PPB4		8_16034545_16037773
GSVIVT00023945001	TC64975	metalloendopeptidase	A7NY13	VITISV_010856	6_8638467_8715878
GSVIVT00034185001	TC56057	Cell wall apoplatic invertase	A7P6S6	VITISV_003872	9_2103334_2107257
GSVIVT00032195001	GSVIVT00032195001	beta-fructosidase (BFRUCT1)	A7P4L3		4_943556_946595
GSVIVT00032196001	CN006911	beta-fructosidase (BFRUCT1)	A7P4L4		4_947775_950632
GSVIVT00004598001	GSVIVT00004598001	cell wall invertase	A7R4N4		Unrandom_101868038_101868466
GSVIVT00015039001	GSVIVT00015039001	Invertase, neutral/alkaline	A7NUG5		18_6560296_6562171
GSVIVT00017349001	GSVIVT00017349001	Invertase, neutral/alkaline	A7PG26		6_13204674_13206340
GSVIVT00017350001	GSVIVT00017350001	VvNI9 (Nonis et al., 2008)	A7PG27		6_13175320_13177856
GSVIVT00031814001	CV099369	VvNI7 (Nonis et al., 2008)	A7Q7F4		18random_2662729_2673261
GSVIVT00034936001	GSVIVT00034936001	VvNI5 (Nonis et al., 2008)	A7QBF0		13_9340522_9354127
GSVIVT00036029001	TC52800	VvNI1 (Nonis et al., 2008)	A7P844		3_1010600_1014009
GSVIVT00033188001	TC67908	VvNI2 (Nonis et al., 2008)	A7Q8U5	VITISV_029106	5_1558376_1562437
GSVIVT00022575001	TC66468	VvNI3 (Nonis et al., 2008)	A7PRN8		14_668231_672442
GSVIVT00022057001	TC70860	VvNI4 (Nonis et al., 2008)	A7PQG4		6_23629966_23638970
GSVIVT00014421001	GSVIVT00014421001	VvNI6 (Nonis et al., 2008)	A7NSV5		18_12149471_12151638
GSVIVT00008639001	DV222226	VvNI8 (Nonis et al., 2008)	A7QWG0		Unrandom_51283491_51286704

APPENDICE 10: ELENCO ESPANSINE

Codice 8.4X	Codice 12X	Funzione	Geni/TC grape array 1.2	Accession number	Iasma gene	Posizione
GSVIVT00016318001	Id JGVv0.356.t01	ALFA	TC53065	A7PDK6	VITISV_038036	17_7003205_7004987
GSVIVT00021324001	Id JGVv7.809.t01	ALFA	TC64448	A5BPE2	VITISV_000251	8_13700759_13702760
GSVIVT00036942001	Id JGVv26.15.t01	ALFA	CN605208	A5AIN5		1random_1542115_1543994
GSVIVT00029445001	Id JGVv67.65.t01	ALFA, EXP2 Schlosser et al., 2008, Vlexp-3 Ishimaru et al., 2006	CV094542	A5BMT9		13_1549970_1551810
GSVIVT00036225001	Id JGVv38.129.t01	EXLA, EXPL Schlosser et al., 2008	TC54149	A7P8L6	VITISV_025068	3_2468736_2470433
GSVIVT00024306001	Id JGVv4.336.t01	ALFA	TC62108	A7NYZ1		6_5777545_5779899
GSVIVT00023470001	Id JGVv79.32.t01	ALFA	TC55820	A7PTQ3		Unrandom_109874624_109879334
GSVIVT00019194001	Id JGVv21.12.t01	BETA	TC58750	A7PKI7		15_4279490_4281367
GSVIVT00015487001	Id JGVv1.77.t01	ALFA, EXP1 Schlosser et al., 2008	TC67284	A7NVM0		18_1751038_1752596
GSVIVT00018468001	Id JGVv19.336.t01	ALFA, EXP3 Schlosser et al., 2008	TC58404	A7PIT6	VITISV_027049	13_3211706_3215281
GSVIVT00033241001	Id JGVv2.750.t01	BETA	GSVIVT00033241001	A7Q8Y6		9_8012807_8015729
GSVIVT00019189001	Id JGVv21.15.t01	BETA	GSVIVT00019189001	A7PKI2		15_4216773_4218165
GSVIVT00025829001	Id JGVv59.18.t01	BETA	TC55336	A7PWY5	VITISV_004796	12_7713482_7715623
GSVIVT00008223001	Id JGVv309.4.t01	EXLB	TC55770	A7R6J1		Unrandom_105020119_105021529
GSVIVT00023946001	Id JGVv4.48.t01	ALFA	DT010047	A7NY14		6_8627556_8629539
GSVIVT00028201001	Id JGVv5.225.t01	ALFA	GSVIVT00028201001	A7Q0W2		7_5035685_5044108
GSVIVT00028456001	Id JGVv5.451.t01	ALFA	GSVIVT00028456001	A7Q1G6		7_8508064_8510904
GSVIVT00000596001	Id JGVv5.451.t01	ALFA	GSVIVT00000596001	A7QJD4		8_17625844_17627165
GSVIVT00027653001	Id JGVv14.258.t01	ALFA	GSVIVT00027653001	A7P1K6		19_3021208_3022368
GSVIVT00001065001	Id JGVv25.427.t01	ALFA	GSVIVT00001065001	A7QKC7		2_4188030_4189533

GSVIVT00036296001	Id JGVv38.69.t01	ALFA	GSVIVT00036296001	A7P8T2		3_2912589_2913558
GSVIVT00000851001	Id JGVv53.69.t01, Id JGVv4.767.t01	ALFA, Vlexp1 Ishimaru et al., 2006	AB104442	A5C506	VITISV_001302	Unrandom_6702776_6705130
GSVIVT00037484001	Id JGVv58.28.t01	ALFA	GSVIVT00037484001	A7QFM9		8_9578895_9579739
GSVIVT00038010001	Id JGVv68.55.t01	ALFA	GSVIVT00038010001	A5AUC8		14_13517544_13518399
GSVIVT00020991001	Id JGVv108.94.t01	ALFA, Vlexp2 Ishimaru et al., 2006	TC53122	A5BA94	VITISV_012111	14_18835736_18837402
GSVIVT00015809001	Id JGVv12.188.t01	EXLB	GSVIVT00015809001	A7PCC8		2_6773972_6775716
GSVIVT00013491001	Id JGVv309.7.t01	EXLB	EV239462	A7R374		Unrandom_85169794_85171406
GSVIVT00011230001	Id JGVv1455.1.t01	EXLB	GSVIVT00011230001	A7R883		Unrandom_263273_265027

BIBLIOGRAFIA

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

Amati A., Ferrarini R., Riponi C., Zironi R. 1983. Una nuova tecnologia per l'appassimento delle uve-Vigne e Vini, 10 (9): 27-35.

Ali ZM, Chin L-H, Lazan H (2004) A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Sci* 167: 317–327

Allen, M.S, M.J. Lacey, BROWN W. V. and HARRIS R.L.N., 1989. Occurrence of methoxypyrazine in grapes of *Vitis vinifera* cv. cabernet-cauvignon and sauvignon blanc. In *Actualités OEnologiques* 89, Compte Rendu du IV e Symposium d'OEnologie de Bordeaux, Dunod, Paris, 25-30.

Allen, M.S, and M.J. Lacey. 1999. Methoxypyrazines of grapes and wines. In *Chemistry of Wine Flavor*. A.L. Waterhouse and S.E. Ebeler (Eds.), pp. 31–38. ACS Symp. Ser. 714. Am. Chemical Society, Washington, DC

Bais, A. J., P. J. Murphy and I. B. Dry (2000). The molecular regulation of stilben phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 425-433.

Barnavon L.; Doco T.; Terrier N.; Ageorges A.; Romieu C.; Pellerin P., (2001), Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methylesterification of cell wall pectins, *Phytochemistry*, **58(5)**: 693–701.

Bellincontro A, De Santis D, Botondi R, Villa I, Mencarelli F. 2004. Different post-harvest dehydration rates affect quality characteristics and volatile compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese grape for wine production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1791–1800.

Blanpied GD, Wilde MH (1968) A study of cells in outer flesh of developing McIntosh apple fruits. *Bot Gaz* 129: 173–183

Bogs J, Jaffé FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP. . 2007; The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology*143:1347–1361.

Bosch S, Grof CPL, Botha FC (2004) Expression of neutral invertase in sugarcane. *Plant Sci* 166:1125–1133

BOSS, P. K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S.; 1996 b: Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.* **32**, 565-569.

Brownleader M. D., Ahmed N., Trevan M., Chaplin M. F. and Dey P. M. 1995 Purification and Partial Characterization of Tomato Extensin Peroxidase *Plant Physiology* vol. 109 no. 3 1115-1123

Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P. (1999);Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11:2203–16.

Brummel D.A., Dal Cin V., Crisosto C.H., Labavitch J.M. (2004), Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit, *J. Exp. Bot.* 55 2009-2039.

Bruno, R., Ghisolfi, L., Prilla, M., Nicolin, A., Bertelli, A., 2003. Wine and tumors: study of resveratrol. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 29 (5–6), 257–261.

Burton RA, Wilson SM, Hrmova M, Harvey AJ, Shirley NJ, Stone BA, Newbiggin EJ, Bacic A, Fincher GB (2006): Cellulose synthase-like CslF genes mediate the synthesis of cell wall (1,3;1,4)-beta-D-glucans. *Science (New York, NY)*, 311(5769):1940-1942.

Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G. 2007a; Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruit of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment.* 30:1381–1399.

Castellarin SD, Matthews MA, Di Gaspero G, Gambetta GA. 2007b; Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulation flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta.* 227:101–112.

Chervin, C.; El-Kereamy, A.; Roustan, J. P.; Latche, A.; Lamon, J.; Bouzayen, M.; 2004: Ethylene seems required for the ripening of grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci.* **167**, 1301-1305.

Choi,D.; Cho,H.T.; Lee,Y. (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum* 126 (4):511-518.

Christelle Deytieux-Belleau, Amélie Vallet, Bernard Donèche, Laurence Geny, *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (2008) 638-646

Cocuron JC, Lerouxel O, Drakakaki G, Alonso AP, Liepman AH, Keegstra K, Raikhel N, Wilkerson CG (2007): A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20):8550-8555

Coombe B.G, (1989) The grape berry as a sink. *Acta Horticulturae*, 239, 149-158.

Coombe BG (1992) Research on development and ripening of the grape berry. *Am J Enol Vitic* 43:101–110

B.G. Coombe, M.G. McCarthy (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening *Australian Journal of Grape and Wine Research* Volume 6, Issue 2, pages 131–135

Cosgrove, DJ, Bedinger P, and Durachko DM (1997) Group I allergens of grass pollen as cell wall loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6559-6564

Cosgrove DJ. Loosening of plant cell walls by expansins. (2000);*Nature* 407:321–6.

Cosgrove, D.J., Li, L.-C., Cho, H.T., Hoffmann-Benning, S. Moore, R.C., Blecker, D. (2002) The growing world of expansins. *Plant & Cell Physiology* 43: 1236-1244

Costantini V., Bellincontro A., DE Santis D., Botondi R. and Mencarelli F., 2006. Metabolic changes of Malvasia grapes for wine production during postharvest drying. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3334-3340.

Davies C, Robinson SP (1996) Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. *Plant Physiol* 111:275–283

Davies C, Robinson SP (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* 122:803–812

Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde JP, Mérillon JM, Hamdi S. Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*. 2006;140:499–511. [

Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC and Cramer GR (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8: 429

Deluc L, Bogs J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon JM, Robinson SP, Barrieu F. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*. 2008 10.1104/pp.108.118919.

Doco T, Williams P, Pauly M, O'Neill MA, Pellerin P (2003) Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr Polym* 53: 253–261

Dominguez-Puigjaner E, Llop I, Vendrell M and Prat S (1997) A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiol* 114: 1071–1076

Downie B, Dirk LMA, Hadfield K, Wilkins TA, Bennett AB, Bradford KJ. A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Anal Biochem*. 1998;264:149–157.

Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, et al.: Guar seed betamannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family. *Science (New York, NY)* 2004, 303(5656):363-366.

Doblin MS, Pettolino FA, Wilson SM, Campbell R, Burton RA, Fincher GB, Newbigin E, Bacic A: A barley cellulose synthase-like CSLH gene mediates (1,3;1,4)-beta-D-glucan synthesis in transgenic Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, 106(14):5996-6001.

Draye Mallory, Van Cutsem Pierre Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening *Journal of Plant Physiology* 165 (2008) 1152—1160

Dreier LP, Hter JJ, RuVner HP (1998) Invertase activity, grape berry development and cell compartmentation. *Plant Physiol Biochem* 36:865–872

Ebel, J.: Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays*, 20, 569-576 (1998).

El-Zoghbi, M. (1994) Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. *Food Chemistry* 49 , pp. 33-37.

Fischer R.L., Bennet A.B., Role of cell wall hydrolases in fruit ripening, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 42 (1991) 675-703

Fouquet R, Léon C, Ollat N and Barrieu F (2008) Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries *Plant Cell Reports* 27:1541-1550

Fremont, L., 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* 66 (8), 663–673

Gallagher JA, Pollock CJ (1998) Isolation and characterization of a cDNA clone from *Lolium temulentum* L. encoding for a sucrose hydrolytic enzyme which shows alkaline/neutral invertase activity. *J Exp Bot* 49:789–795

Galmes J, Pou A, Alsina M.M, Tomas M, Medrano H, Flexas J, (2007) Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis sp.*): relationship with ecophysiological status. *Planta*, 26, 671-681.

Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16, S170–S180.

Glissant D, Dedaldechamp F and Delrot S (2008) Transcriptomic analysis of grape berry softening during ripening. *J Int Sci Vigne Vin* 42: 1–13

Goffinet MC, Robinson TL, Lakso AN (1995) A comparison of Empire apple fruit size and anatomy in unthinned and hand-thinned trees. *J Hortic Sci* 70: 375–387

Goldberg, R., Morvan, C., Jauneau, A., and Jarvis, M. C (1996).: Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall, in: *Pectins and Pectinases*, edited by: Visser, J. and Voragen, A. G. J., Elsevier Science, Amsterdam, 151–172.

Gonzalez-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA (2002) Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*;128:534-543

Greenspan MD, Shackel KA, Matthews MA (1994) Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant Cell Environ* 17:811–820

Gray, J. , Picton, S. , Shabbeer, J. , Schuch, W. and Grierson, D. (1992) Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Molecular Biology* 19 , pp. 69-87.

Grimplet J, Deluc LG, Tillett RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC. (2007). Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8, 187.

Hachez C, Zelazny E, Chaumont F (2006) Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? *Biochim Biophys Acta* 1758:1142–1156

Hadfield, K. A., and A. B. Bennett. (1998). Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology* 117: 337–343.

Hallett IC, Macrae EA, Wegrzyn TF (1992) Changes in kiwifruit cell wall ultrastructure and cell packing during postharvest ripening. *Int J Plant Sci* 153: 49–60

Hardie WJ, O'Brien TP, Jaudzems VG (1996) Morphology, anatomy, and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Aust J Grape Wine Res* 2: 97–142

- Harikrishna K, Jampatesbeale R, Milligan SN, Gasser CS** (1996) An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. *Plant Mol Biol* 30 899-911
- Herrera-Estrella, A. and Chet, I.**: Chitinases in biological control, p. 171-184. In Muzzarelli, R. A. (ed), *Chitin and chitinase*. Birkhauser Verlag, Basel (1999).
- Higashi K, Hosoya K, Ezura H** (1999) Histological analysis of fruit development between two melon (*Cucumis melo L. reticulatus*) genotypes setting a different size of fruit. *J Exp Bot* 50: 1593–1597
- Hiwasa K, Rose JKC, Nakano R, Inaba A, Kubo Y.** (2003); Differential expression of seven U-expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiol Plant* 117:564–72.
- Hobson GE and Grierson D** (1993) Tomato. In: GB Seymour, JE Taylor and GA Tucker (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall, London/New York, pp 405–442
- Hsiao TC.** 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 519–570.
- Huang, XM, Huang, HB** (2001) "Early post-veraison growth in grapes: evidence for a two-step mode of berry enlargement" *Aust J Grape Wine Res* 7: 132-136
- Huang, XM, Huang, HB, Wang, HC** (2005) "Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins" *Sci Hortic* 104: 249-263
- Huber DJ** (1984) Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *J Food Sci* 47: 1310–1315
- Huber DJ, Lee JH** (1986) Comparative analysis of pectins from pericarp and locular gel in developing tomato fruit. In ML Fishman, JJ Joseph, eds, *Chemistry and Function of Pectins*, American Chemical Society Symposium Series 310. American Chemical Society, Washington, DC, pp 141-156
- Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M.** Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 2005;579:5814–5820.
- Ishimaru M, Kobayashi S,** (2002) Expression of a xyloglucan *endo*-transglycosylase gene is closely related to grape berry softening, *Plant Science* 162 621-628.
- Ishimaru M, Smith D, Gross K, Kobayashi S,** (2006) Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries, *J. Plant Physiology*.
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al.;** French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-467.
- Jimenez, A. , Rodriguez, R. , Fernandez-caro, I. , Guillen, R. , Fernandez-Bolanos, J. and Heredia, A.** (2001) Olive fruit cells wall: Degradation of pectic polysaccharides during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 , pp. 409-415.

- Johanson U., Karlsson M., Johansson I., Gustavsson S., Sjövall S., Fraysse L., Weig A.R., and Kjellbom P.**, 2001, The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants, *Plant Physiol.*, 126: 1358-1369
- John, M.A. and P. M. Dey.** 1986. Postharvest changes in fruit cell wall. *Adv. Food Res.* 30: 139-193
- Kaldenhoff, R. and Fischer, M.** (2006), Aquaporins in plants. *Acta Physiologica*, 187: 169–176
- Knee M, Sargent JA, Osborne DJ** (1977) Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *J Exp Bot* 28: 377–396
- Kobayashi, S.; Ishimaru, M.; Hiraoko, K.; Honda, C.;** 2002: *Myb* related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**, 924–933.
- Kuhn, K. et al.** (2004) A novel, high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling. *Genome Res.*, 14, 2347–2356.
- Langcake P, Pryce RJ**, 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **33**, 151–2.
- Lazan H, Ali Z, Lee K, Voon J, Chaplin G** (1986) The potential role of polygalacturonase in pectin degradation and softening of mango fruit. *ASEAN Food J* 2: 93–95
- Leubner-Metzger G, Frundt C, Vogeli-Lange R, Meins F Jr** (1995) Class I P-1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol* 109: 751-759
- Licker J. L., Acree T. E. and Henick-Kling T., 1998.** What is « Brett » (Brettanomyces) Flavor ? *Chemistry of Wine Flavor*. A. L. Waterhouse and S. E. Ebeler, eds, ACS symposium series, 714 : pp 96-115.
- Liepman AH, Wilkerson CG, Keegstra K:** Expression of cellulose synthase-like (Csl) genes in insect cells reveals that CslA family members encode mannan synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(6):2221-2226
- Linthorst, H. J.:** Pathogenesis-related proteins of plant. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10, 123-150 (1991).
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L.** Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. 1996. *Nature Biotechnology* 14: 1675–1680.
- Lotan T, Ori N, Fluhr R** (1989) Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* 1:881-887
- Luu DT, Maurel C** (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ* 28: 85–96
- Marcelis LFM, Hofmaneijer LRB** (1993) Cell division and expansion in the cucumber fruit. *J Hortic Sci* 68: 665–671
- Marin-Rodriguez MC, Smith DL, Manning K, Orchard J and Seymour GB** (2003) Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Mol Biol* 51: 851–857

Matthews, MA, Cheng, G, Weinbaum, SA (1987) "Changes in water potential and dermal extensibility during grape berry development" *J Am Soc Hortic Sci* 112: 314-319

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. (1992); Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4:1425–33.

Medina-Escobar N, Cardenas J, Moyano E, Caballero JL and Munoz-Blanco, J (1997) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol Biol* 34: 867–877

Mullins, M.G., Bouquet, A. and Williams, L.E. 1992. *Biology of the Grapevine*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

Naleway John Joseph, Coleman Daniel John , Hawley Robin Michelle and Cook Gabriele Maria
Cellulase assay as a method of monitoring grape ripening *The FASEB Journal*. 2008;22:841.2

Nonis A, Ruperti B, Falchi R, Casatta E, Thamashebi SE, Vizzotto G (2007) Differential expression and regulation of a neutral invertase encoding gene from peach (*Prunus persica*): evidence for a role in fruit development. *Physiol Plant* 129:436–446

Nonis A, Ruperti B, Pierasco A, Canaguier A, Adam-Blondon A.F, Di Gaspero G and Vizzotto G Neutral invertases in grapevine and comparative analysis with *Arabidopsis*, poplar and rice *Planta* Volume 229, Number 1, 129-142

Nunan K.J., Davies C., Robinson S.P., Fincher G.B., Expression patterns of cell wall modifying enzymes during grape berry development, *Planta* 214 (2001) 257-264.

Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP, Fincher GB. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*. 1998;118:783–792.

Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J.M. et al. (2008). Anthocyanin and tannins in four grape varieties (*Vitis Vinifera* L.). Evolution on their content and extractability. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 42, 147–156.

Paull, R. E. and Chan, N. J. (1983) Postharvest variation in cell wall degrading enzymes of papaya (L.) during fruit ripening. *Plant Physiology* 72 , pp. 382-385.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.

Picaud, S, Becq, F, Dedaldechamp, F, Ageorges, A, Delrot, S (2003) "Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during the ripening of grape berry" *Funct Plant Biol* 30: 621-630

Pilati S, Perazzolli M, Malossini A, Cestaro A, Demattè L, Fontana P, Dal Ri A, Viola R, Velasco R and Moser C (2007) Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics* 8: 428

- Pilnik, W. and Voragen, A. G. J. Hulme, A. C.** (ed) (1970) Pectic substances and other uronides. *The Biochemistry of Fruits and their Products I*, pp. 53-87. Academic Press, London & New York
- Prasanna V, Prabha TN and Tharanathan RN** (2007). Fruit ripening phenomena—an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47: 1-19.
- Ramos IN, Silva CLM, Sereno AM, Aguilera JM.** 2004. Quantification of microstructural changes during first stage air drying of grape tissue. *Journal of Food Engineering* 62, 159–164.
- Redgwell RJ, MacRae E, Hallett J, Ficher M, Perry J and Harker R** (1997) In vivo and in vitro swelling of cell-walls during fruit ripening. *Planta* 203: 162–173
- Richmond TA, Somerville CR:** The cellulose synthase superfamily. *Plant physiology* 2000, **124(2)**:495-498
- Rizzini FM, Bonghi C and Tonutti P** (2009) Postharvest water loss induced marked changes in transcript profiling in skin of wine grape berry. *Postharvest Biol Technol* **52**: 247–253
- N. Robert, K.Roche, Y. Lebeau, C Breda, M. Boulay, R. Esnault, D. Buffard** (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens, *Plant Science* 162 389–400
- Robinson SP, Jacobs AK, Dry IB, 1997.** A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology* **114**, 771–8.
- Robinson, S. P. and Davies, C. (2000),** Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6: 175–188
- Roe B and Bruemmer JH** (1981) Changes in pectic substances and enzyme during ripening and storage of Keitt mango. *J Food Sci* 54: 186–189
- Roitsch T, Gonzalez M-C** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* 9:606–613
- Rose JKC, Bennett AB** (1999). Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci*;4:176–83.
- Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., and Maeshima M.,** 2005, Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function, *Plant Cell Physiol.*, 46(9): 1568-1577
- Sampedro, J, Cosgrove, DJ** (2005) "The expansin superfamily" *Genome Biol* 6: 242-253
- Sampedro J, Carey R. E, and Cosgrove D. J (2006)** Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs. *J.Plant Res.* DOI 10.1007/s10265-005-0253-z,
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.**(1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467–470.

- Schlosser J, Olsson N, Weis M, Reid K, Peng, Lund S and Bowen P** (2008) Cellular expansion and gene expression in the developing grape (*Vitis vinifera* L.) 232: 255-265,
- Scorza R, May LG, Purnell B, Upchurch B** (1991) Differences in number and area of mesocarp cells between small-fruited and large-fruited peach cultivars. J Am Soc Hortic Sci 116: 861–864
- Simon P. Robinson, Andrew K. Jacobs, and Ian B. Dry** A Class IV Chitinase is Highly Expressed in Grape Berries during Ripening, Plant Physiol. (1997) 114: 771-778
- Smith NJ, Tucker GA and Jeger MJ** (1989) Softening and cell wall changes in bananas and plantains. In: Tropical Fruit: Technical Aspects of Marketing. Asp Appl Biol 20: 57–65
- Stedle E, Wieneke J** (1985) Changes in water relations and elastic properties of apple fruit cells during growth and development. J Am Soc Hortic Sci 110: 824–829
- Sturm A, Tang G-Q** (1999) The sucrose-cleaving enzymes of planta are crucial for development, growth and carbon partitioning. Trends Plant Sci 4:401–407
- Sturm A, Hess D, Lee HS, Lienhard S** (1999) Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. Physiol Plant 107:159–165
- Swanson CA, Elshishiny EDH** (1958) Translocation of sugars in the Concord grape. Plant Physiol 33: 33-37
- Tang G-Q, Lüscher M, Sturm A** (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. Plant Cell 11:177–189.
- Terras FRG, Schoofs HME, De Bolle MFC, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF** (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Xanthopus sativus* L.) seeds. J Biol Chem 267: 15301-15309
- Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verrie`s C, Cheynier V, Romieu C** (2009) Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. Plant Physiol 149: 1028–1041
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, et al.** Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta. 2005;222:832–847.
- Thompson, DS, Davies, WJ, Ho, LC** (1998) "Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes" Plant Cell Environ 21: 589-599
- Tieman, D. M. , Harriman, R. W. , Ramamohan, G. and Handa, A. K.** (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *The Plant Cell* 4 , pp. 667-679.
- Tornielli GB.** Evoluzione di alcuni composti fenolici durante la maturazione e appassimento dell'uva. PhD thesis. Padua University, Italy; 1998.

- Tyerman SD, Tilbrook J, Pardo C, Kotula L, Sullivan W, Steudle E** (2004) Direct measurements of hydraulic properties in developing berries of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz and Chardonnay. *Aust J Grape Wine Res* 10:170–181
- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M** (1998) The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv Bot Res* 28:71–117.
- Tucker GA**, 1993 Introduction. In *Biochemistry of Fruit Ripening*. G.B. Seymour, J.E. Taylor and A. Tucker, Eds, Chapman and Hall, London pp.3-43
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, et al** (2007) A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PLoS One* 2(12): e1326
- Versari A, Parpinello GP, Tornielli GB, Ferrarini R, Giulivo C.** 2001. Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5531–5536.
- Vicens A, Fournand D, Williams P, Sidhoum L, Moutounet M and Doco T** (2009) Changes in polysaccharide and protein composition of cell walls in grape berry skin (cv. Shiraz) during ripening and over-ripening. *J Agric Food Chem* 57: 2955–2960
- Vidal S, Williams P, O'Neill MA, Pellerin P** (2001) Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydr Polym* 45: 315–323
- Wakabayashi K., Chub J.P., Huber J.D.,** Extensive solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides during avocado (*Persea americana*) ripening involves concerted action of polygalacturonase and pectinmethylesterase, *Physiol. Planta.* 108 (2000) 345-352.
- Waters DLE, Holton TA, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ.** cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) skin. *Functional and Integrative Genomics.* 2005;5:40–58.
- Watson, B. 2003.** Evaluation of Winegrape Maturity. In: E.W. Hellman (ed.) *Oregon Viticulture*. Oregon State University Press. Corvallis, Oregon. Pp. 235-245.
- Wemmer T, Kaufmann H, Kirch HH, Schneider K, Lottspeich F, Thompson RD** (1994) The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.) is an endochitinase. *Planta* 194: 264-273
- Willats WGT, McCartney L, Mackey W, Knox JP.** 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47, 9±27.
- Wong, D. W. S.** (1995) Pectic enzymes. *Food Enzymes. Structure and Mechanisms* pp. 212-236. Chapman and Hall, New York
- Yakushiji H, Sakurai N, Morinaga K.** (2001) Changes in cellwall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. *Physiol Plant*;111: 188–95.
- Yin Yanbin, Huang Jinling and Xu Ying,** (2009) The cellulose synthase superfamily in fully sequenced plants and algae *BMC Plant Biology* 9:99

Zamboni A, Minoia L, Ferrarini A, Torielli GB, Zago E, Delledonne M and Pezzotti M (2008) Molecular analysis of post-harvest withering in grape by AFLP transcriptional profiling. *J Exp Bot* **59**: 4145–4159

Zamboni A, Di Carli M, Guzzo F, Stocchero M, Zenoni S, Ferrarini A, Tononi P, Toffali K, Desiderio A, Lilley K, Pè E, Benvenuto E, Delledonne M, Pezzotti M (2010) Identification of Putative Stage-Specific Grapevine Berry Biomarkers and Omics Data Integration into Networks. *Plant Physiology* **154**: 1439-1459.

Zanchin A, Bonghi C, Casadoro G, Ramina A, Rascio N (1994) Cell enlargement and cell separation during peach fruit development. *Int J Plant Sci* **155**: 49–56

Zhang XY, Wang XL, Wang XF, Xia GH, Pan QH, Fan RC, Wu FQ, Yu XC, Zhang DP (2006) A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiol* **142**:220–232