

Lo sviluppo delle conoscenze genomiche in vite e il loro potenziale utilizzo nella viticoltura attuale e futura

Sara Zenoni, Anita Zamboni, Silvia Dal Santo, Marianna Fasoli, Mario Pezzotti e Giovanni Battista Tornielli*

Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

Ricezione: 5 aprile 2012; Accettazione: 17 maggio 2012

The potential of grapevine genome-derived knowledge for present and future viticulture

Abstract. In 2007 two high-quality drafts of the genome sequence of grapevine (*Vitis vinifera*) were published by two separate initiatives, the French-Italian public Consortium and the Italian-American collaboration. In the modern view, the genome is considered as the total content of the genetic material (DNA) of a cell of an organism, and it represents the potentiality of an organism. Grapevine is one of the world's most important fruit crops, widely distributed and with a high economic impact. It also represents, through its products, the historical, social and traditional symbol of many geographical regions. By decoding the genome, new and advanced investigative tools are progressively being developed that, when used properly, will provide an enormous amount of basic, new, valuable and powerful information such as phylogeny, disease resistance, abiotic stresses, phenotypic plasticity, molecular breeding and system biology. Large-scale methods for the analysis of systems expression evolved from genomic sequencing by the Sanger method, and involved the census sequencing of cDNA libraries to generate collections of expressed sequence tags (ESTs) or short markers that were joined together in techniques such as serial analysis of gene expression (SAGE). For a period of about 10 years, sequence-based methods were largely replaced with microarrays, which allowed large numbers of transcripts to be quantified by hybridisation. In the last few years, the ultra-high-throughput potential of next-generation sequencing methods has allowed massive cDNA census sequencing technologies (collectively RNA-seq) to become more and more prevalent and, as the cost of sequencing continues to fall, it is likely to become the dominant approach once more. The development of high-throughput sequencing technologies enables the sequencing of total cDNA to derive an accurate measure of individual gene expression

and differential splicing activity, and to discover novel regions of transcription, dramatically changing the way that the functional complexity of transcriptomes can be studied. The ability to analyse transcriptional changes in grapevine has yielded large amounts of data, beginning with the detection and quantification of single transcripts but now encompasses techniques that allow thousands of transcripts to be monitored simultaneously. Furthermore, the availability of the complete grapevine genome sequence allows for comprehensive transcriptomic experiments. Therefore, it is now much easier to identify candidate genes governing the key processes underlying organ development, particularly those relating to berry quality traits and stress responses. Such candidate genes represent a valuable pool of material for functional analyses, and particular research is still required to confirm genomic annotations and avoid annotation errors that would otherwise result in the misinterpretation of transcriptomic data. Altogether, these results constitute the basis for future studies and pay the way for the adoption of innovative methods to develop and support the Italian and worldwide viticulture of the XXI century. In this review we discuss the potential of technologies derived from knowledge of the genome such as the development of tools for the analysis of gene expression on a large scale, and some examples of their use in present and future viticulture.

Key words: genome, sequencing, transcriptome, gene expression, *Vitis vinifera*.

Introduzione

Forse l'anno 2007 non resterà nella storia enologica come una grande annata viti-vinicola, ma di certo sappiamo che è stato l'anno cruciale per la ricerca scientifica che riguarda la vite. Nel 2007, infatti, sono stati pubblicati i risultati del sequenziamento e dell'analisi dettagliata del genoma di *Vitis vinifera* L. (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007). Due iniziative, una italo-francese e l'altra italo-americana,

* giovannibattista.tornielli@univr.it

hanno rivelato rispettivamente il genoma di un clone sperimentale di Pinot Nero (PN40024), altamente omozigote e non coltivato, e il genoma del clone di Pinot Nero ENTAV 115, altamente eterozigote e largamente coltivato. Questi risultati, di grande valenza internazionale e motivo di grande orgoglio scientifico per il nostro Paese, costituiscono la base di partenza per gli studi futuri e gettano le fondamenta per l'adozione di metodologie innovative derivanti dalla conoscenza del genoma per sviluppare e rafforzare la viticoltura italiana e mondiale del XXI secolo. Il genoma rappresenta il potenziale di una cellula, di un individuo, di una specie, la cui manifestazione dipende dalle complesse interazioni tra le componenti genetiche e ambientali. I genomi dei cloni sequenziati dalle due iniziative internazionali sono da ritenersi solo l'inizio dell'epoca genomica. In questa review verranno illustrate le potenzialità delle tecnologie derivate dalla conoscenza del genoma come ad esempio lo sviluppo di strumenti per l'analisi di espressione genica su larga scala, e illustrati alcuni esempi inerenti al loro impiego attuale e futuro in viticoltura (tab. 1).

La sequenza del genoma di riferimento di *Vitis vinifera* e il futuro del risequenziamento

Entrambe le iniziative di sequenziamento del genoma di *Vitis vinifera* hanno richiesto l'impiego di importanti risorse intellettuali ed economiche. La sequenza del clone PN40024, altamente omozigote, ha presentato minori difficoltà di assemblamento e il genoma di PN40024 è stato perciò scelto dalla comunità internazionale come quello di riferimento per la vite. L'assemblaggio è un processo computazionale/informatico che consente l'allineamento delle milioni di sequenze, ottenute dai sequenziatori, in frammenti lunghi milioni di basi, rappresentanti teoricamente i singoli cromosomi. La sequenza assemblata di PN40024 risulta molto affidabile, presenta un limitato numero di errori ed è la base di partenza per tutte le possibili applicazioni genomiche successive. Per l'ottenimento di questa sequenza sono stati impiegati circa 10 milioni di Euro, ripartiti tra i governi di Italia e Francia, oltre ad un buon contributo da parte di alcuni industriali e produttori di vino italiani. Dalla sequenza alla sua interpretazione funzionale, in linguaggio genomico "annotazione", il passaggio non è né immediato né tantomeno infallibile. Utilizzando strumenti bionformatici, la sequenza può essere interpretata, sia strutturalmente che funzionalmente sulla base delle conoscenze, anche parziali, già disponibili per sequenze simili di altre specie. La sequenza del genoma della vite è stata cronologicamente decifrata

dopo quella di *Arabidopsis*, riso e pioppo, per cui l'annotazione del genoma di vite ha potuto avvantaggiarsi delle conoscenze relative a queste tre specie nonché delle informazioni molecolari già ottenute in vite. In breve, il genoma di *Vitis vinifera* è costituito per il suo 7% da circa 30.000 geni (Jaillon *et al.*, 2007) e da almeno 140 regioni trascritte come microRNA (Mica *et al.*, 2010); il 40% è costituito da elementi genetici mobili e il resto da sequenze intergeniche, il cui ruolo rimane attualmente sconosciuto. Questi dettagli molecolari, seppur molto interessanti, non sono di per sé utilizzabili quali strumenti innovativi, ma ne consentono lo sviluppo. Due importanti esempi di applicazioni genomiche sono rispettivamente la caratterizzazione della collezione nazionale italiana di germoplasma di *Vitis vinifera* di Conegliano Veneto (Cipriani *et al.*, 2010) e quella delle collezioni americane di *Vitis* spp di Davis e Geneva (Myles *et al.*, 2011), rese possibili dallo sviluppo di nuovi marcatori genetici molecolari, basati su microsatelliti (Cipriani *et al.*, 2008) e sul polimorfismo del singolo nucleotide (SNP) (Myles *et al.*, 2010), definiti sulla base della sequenza genomica di vite. L'uso di 34 microsatelliti derivati dalla sequenza del genoma su 1.005 accessioni della collezione italiana, costituita da sola *Vitis vinifera* da vino e da tavola, ha consentito l'individuazione di 200 gruppi di sinonimia (il profilo molecolare di 260 varietà era identico ad uno o più profili di altre varietà in esame), riducendo l'analisi delle differenze a 745 genotipi unici. Sono stati definiti 74 pedigree completi con l'identificazione di entrambi i parentali, alcuni anche di grande interesse storico. Alcuni rilevanti esempi sono: Chenin blanc (Sauvignon X Traminer rot), Covè (Harslevelu auto-fecondato), Incrocio Manzoni 2-14 e 2-15 (Cabernet franc X Prosecco), Lagrein (Schiava gentile X Teroldego), Malvasia nera di Bolzano (Perera X Schiava gentile), Manzoni moscato (Raboso veronese X Moscato d'Amburgo), Moscato violetto (Moscato bianco X Duraguzza), Moscato di Alessandria (Muscat blanc à petit grain X Axina de tres bias). Inoltre, i dati genetici hanno evidenziato come generalmente non vi sia nessuna similitudine significativa tra accessioni attribuibile all'area geografica di provenienza, facendo ipotizzare che la storica attività commerciale e il continuo flusso di popolazioni su tutto il territorio nazionale abbiano determinato un frequente rimescolamento genetico tra le varietà locali e quelle più largamente coltivate. Solo in rari casi, come ad esempio per le cv Corvina, Rondinella, Oseleta, Corvinone, tutte coltivate in aree vitivinicole del veronese, è stato possibile stabilire una stretta somiglianza su base genetica.

I ricercatori americani hanno sviluppato, per l'analisi genetica, una tecnologia nuovissima basata su DNA chip, impossibile da realizzare senza la disponibilità della sequenza, che consente l'analisi di 8898 SNPs. Con questo strumento essi hanno analizzato circa 1.000 accessioni, appartenenti per lo più a *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* con una buona rappresentanza della specie ancestrale selvatica *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. Queste approfondite analisi genetiche hanno permesso di riaffermare l'origine della *Vitis vinifera* nel Vicino Oriente e di dimostrare sperimentalmente l'introggressione del genoma della sottospecie *sylvestris* in *Vitis vinifera* durante il suo trasferimento in Europa. Hanno anche constatato che la vite selvatica e quella coltivata presentano livelli similmente alti di diversità genetica, spiegabili da una moderata limitazione all'incrocio operata durante la fase di domesticazione. La successiva millenaria propagazione vegetativa ha eliminato quasi totalmente la sessualità, per cui attualmente l'importante diversità genetica che esiste in *Vitis vinifera* è comunque contenuta all'interno di una complessa rete di strette relazioni di parentela generate attraverso incroci tra genotipi di pregio. Sorprendentemente, il 75% delle varietà studiate sono risultate strettamente imparentate, suggerendo l'esistenza di un'unica grande famiglia (Myles *et al.*, 2011), a differenza di quanto ipotizzato da alcuni in passato.

Sono ormai passati oltre 4 anni dal sequenziamento di *Vitis vinifera* durante i quali le tecnologie di sequenziamento sono molto progredite. In particolare sono ora disponibili strumenti molto veloci, ad alta processività, che tuttavia generano frammenti di sequenza corti (100/200 basi), difficili da assemblare se non si dispone di un genoma di riferimento. Se invece esiste un genoma di riferimento, il sequenziamento moderno diventa un utile strumento d'analisi, grazie anche al costo divenuto sempre più accessibile. E' attualmente possibile "risequenziare" il genoma di un qualunque genotipo di *Vitis vinifera* con poche decina di migliaia di Euro nell'arco di una settimana. Il risequenziamento di molti genotipi di *Vitis vinifera* e delle specie selvatiche di *Vitis* potrà essere applicato con successo allo studio della struttura genetica del germoplasma e impiegato attivamente nei programmi di miglioramento genetico per l'ottenimento di nuove varietà. Per esempio in Italia è attualmente in corso un progetto basato sul risequenziamento dal titolo "Valorizzazione dei principali vitigni autoctoni italiani e del loro terroir", che ha come obiettivo la caratterizzazione della struttura e della funzione dei genomi di 50 vitigni autoctoni italiani e di alcuni loro cloni.

Le prime applicazioni trascrittomiche in vite

Tra gli aspetti più sviluppati a seguito delle sempre maggiori conoscenze nel campo della biologia molecolare applicata alla vite, vi sono certamente gli studi basati sulle analisi di espressione genica. Questi studi hanno mosso i primi passi negli anni '90 con analisi limitate a singoli o pochi geni e si sono evolute rapidamente fino alle prime applicazioni dell'analisi di espressione genica su larga scala (trascrittomica) che prevede la rilevazione contemporanea dei livelli di centinaia o migliaia di trascritti di un determinato campione.

Il trascrittoma consiste nell'intera collezione di molecole di RNA presenti all'interno di una cellula, di un tessuto, di un organo o di un intero organismo. Questa collezione include molecole di mRNA, che codificano proteine, e altre molecole di RNA che invece non codificano proteine come ad esempio l'rRNA, il tRNA o i micro RNA. Tra queste gli mRNA rappresentano certamente le molecole che posseggono il maggior potenziale informativo e pertanto le applicazioni trascrittomiche hanno riguardato quasi esclusivamente l'analisi dei cambiamenti qualitativi e quantitativi proprio di mRNA. La caratterizzazione dei cambiamenti del trascrittoma risulta essere molto informativa poiché fornisce una visione globale riguardo ai processi molecolari associati allo sviluppo e/o alle interazioni di un organismo con l'ambiente esterno. Le analisi trascrittomiche in vite sono state principalmente rivolte allo studio del processo di sviluppo della bacca, dall'allegagione fino alla maturazione e post-maturazione, e all'influenza dell'ambiente (fattori biotici e abiotici) sullo sviluppo della bacca stessa e sulle sue caratteristiche qualitative alla raccolta (tab. 1). Ulteriori e più recenti studi si sono rivolti alla delucidazione dei meccanismi molecolari sottesi alla risposta di altri organi della pianta (principalmente la foglia) a varie condizioni ambientali o in risposta ad agenti patogeni.

Diversi approcci analitici possono essere utilizzati per caratterizzare l'espressione genica su larga scala (tab. 2). La caratterizzazione del trascrittoma di un campione può essere effettuata, ad esempio, attraverso metodologie basate sul sequenziamento (es. cDNA-AFLP, sequenziamento di librerie a cDNA, RNA-seq) che non richiedono informazioni di sequenza a priori e generano esse stesse tale informazione. Questi approcci, ad esclusione dell'RNA-seq che si basa su tecniche di sequenziamento ad elevata processività sviluppate in anni recenti (vedi paragrafo dedicato di questa review), sono stati molto utilizzati nella vite quando l'informazione relativa a sequenze

Tab. 1 - Analisi trascrittomiche applicate alla vite.
 Tab. 1 - *Transcriptomic analyses in grapevine.*

Bibliografia	Tecnica utilizzata	Specie/Cultivar	Tessuto/Organo	Processo analizzato
Davies e Robinson, 2000	sequenziamento di librerie a cDNA	Shiraz	bacca	sviluppo della bacca
Ablett et al., 2000	sequenziamento di librerie a cDNA	Chardonnay	bacca e foglia	sviluppo di foglia e bacca
Moser et al., 2001	cDNA-AFLP	Pinot Nero	radice, gemma, foglia, fiore, germoglio e bacca	sviluppo di organi
Terrier et al., 2001	sequenziamento di librerie a cDNA	Shiraz	bacca	sviluppo della bacca
Venter et al., 2001	cDNA-AFLP	Chardonnay	bacca	sviluppo della bacca
Burger e Botha, 2004	cDNA-AFLP	Cabernet Sauvignon e Clairette Blanche	bacca	sviluppo della bacca
Fei et al., 2004	analisi EST <i>in silico</i>	TIGR Grape Gene Index	TIGR Grape Gene Index	sviluppo della bacca
Terrier et al., 2005	microarray	Chardonnay, Cabernet Sauvignon e Shiraz	bacca	espressione in organi/tessuti
da Silva et al., 2005	analisi EST <i>in silico</i>	Chardonnay	bacca	sviluppo della bacca
Waters et al., 2005	microarray	Shiraz	buccia	sviluppo della bacca
Mori et al., 2007	microarray	Cabernet Sauvignon; Clairette Blanche	buccia	risposta a stress termico
Grimplet et al., 2007	microarray	Cabernet Sauvignon	buccia, polpa e seme	espressione in organi/tessuti
Deluc et al., 2007	microarray	Cabernet Sauvignon	bacca	sviluppo della bacca
Pilati et al., 2007	microarray	Pinot Nero	bacca	sviluppo della bacca
Cramer et al., 2007	microarray	Cabernet Sauvignon	germoglio	stress idrico e salino
Peng et al., 2007	sequenziamento di librerie a cDNA	Cabernet Sauvignon e Muscat Hamburg	bacca	sviluppo della bacca
Chervin et al., 2008	microarray	Cabernet Sauvignon	bacca	etilene nello sviluppo della bacca
Gatto et al., 2008	macroarray	21 varietà	bacca	accumulo di stilbeni nella bacca
Ghissant et al., 2008	macroarray	Chardonnay	bacca	sviluppo della bacca
Lund et al., 2008	microarray	Cabernet Sauvignon	bacca	sviluppo della bacca
Zamboni et al., 2008	cDNA-AFLP	Corvina	bacca	sviluppo e appassimento della bacca
Polesani et al., 2008	cDNA-AFLP	Riesling	foglia	risposta a <i>Plasmopara viticola</i>
Denoeud et al., 2008	sequenziamento ad elevata processività	Pinot Nero PN40024	foglia, radice, fusto e callo	espressione in organi/tessuti
Carra et al., 2009	sequenziamento di librerie a cDNA	Nebbiolo	bacca	miRNA nello sviluppo della bacca
Deluc et al., 2009	microarray	Chardonnay e Cabernet Sauvignon	bacca	risposta a stress idrico
Rizzini et al., 2009	microarray	Raboso Piave	buccia	appassimento della bacca
D'Onofrio et al., 2009	microarray	Cabernet Sauvignon	culture cellulari generate da bacche	risposta al jasmonato

segue

segue

Bibliografia	Tecnica utilizzata	Specie/Cultivar	Tessuto/Organo	Processo analizzato
Hren <i>et al.</i> , 2009	microarray	Chardonnay	foglia	risposta a <i>Bois noir</i>
Rotter <i>et al.</i> , 2009	microarray	Cabernet Sauvignon	piante giovani	risposta a <i>Eutypa lata</i>
Xu <i>et al.</i> , 2009	sequenziamento di librerie a cDNA	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	foglia	risposta a <i>Uncinula necator</i>
Mathiason <i>et al.</i> , 2009	macroarray	Perlette e <i>Vitis riparia</i>	gemma	dormienza della gemma
Bellin <i>et al.</i> , 2009	sequenziamento ad elevata processività	Corvina	bacca	maturazione e appassimento
Zamboni <i>et al.</i> , 2009	microarray	<i>Vitis riparia</i> x <i>Vitis berlandieri</i>	colture cellulari	risposta a ciclostetrina (DIMEB)
Zenoni <i>et al.</i> , 2010	sequenziamento ad elevata processività	Corvina	bacca	sviluppo della bacca
Zamboni <i>et al.</i> , 2010	microarray	Corvina	bacca	sviluppo e appassimento della bacca
Koyama <i>et al.</i> , 2010	microarray	Cabernet Sauvignon	buccia	acido abscissico nello sviluppo della bacca
Choi <i>et al.</i> , 2010	sequenziamento di librerie a cDNA	Tammara	foglia	risposta a <i>Rhizobium vitis</i>
Daldoul <i>et al.</i> , 2010	sequenziamento di librerie a cDNA	Razegui e Syrah	foglia	risposta a stress salino
Pantaleo <i>et al.</i> , 2010	sequenziamento ad elevata processività	Pinot Nero	foglia, viticcio, infiorescenza, bacca	identificazione di miRNA
Pontin <i>et al.</i> , 2010	microarray	Malbec	foglia	risposta a radiazione UV-B
Polesani <i>et al.</i> , 2010	microarray	Pinot Nero e <i>Vitis riparia</i> cv. Gloire de Montpeller	foglia da <i>vitro</i>	risposta a <i>Plasmopara viticola</i>
Mica <i>et al.</i> , 2010	microarray/sequenziamento ad elevata	Pinot Nero	bacca	miRNA nello sviluppo della bacca
Carvalho <i>et al.</i> , 2011	microarray	Touriga Nacional	foglia	risposta a forte irraggiamento
Malacarne <i>et al.</i> , 2011	cDNA-AFLP/microarray	Merzling e Teroldego	foglia	risposta a <i>Plasmopara viticola</i>
Vega <i>et al.</i> , 2011	microarray	Cabernet Sauvignon	bacca	risposta a <i>Grapevine leaf-roll-associated virus-3</i>
Wang <i>et al.</i> , 2011a	sequenziamento ad elevata processività	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis Labrusca</i> cv. Summer Black	foglia, stelo, viticcio, infiorescenza, fiore e bacca	identificazione di miRNA
Guillaumiel <i>et al.</i> , 2011	microarray	Chardonnay	bacca	sviluppo della bacca
Ali <i>et al.</i> , 2011	microarray	Norton	buccia	sviluppo della bacca
Fortes <i>et al.</i> , 2011	microarray	Trincadeira	bacca	sviluppo della bacca
Pastore <i>et al.</i> , 2011	microarray	Sangiovese	bacca	risposta a diradamento dei grappoli
Hao <i>et al.</i> , 2012	sequenziamento di librerie a cDNA	grapevine rootstock SO4 (<i>V. berlandieri</i> × <i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis Labrusca</i> cv Summer	radici	risposta a <i>Xiphinema index</i>
Wang <i>et al.</i> , 2012b	sequenziamento di librerie a cDNA	<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis Labrusca</i> cv Summer	bacca e fiore	identificazione di marcatori
Perrone <i>et al.</i> , 2012	macroarray	Grenach	picciolo	risposta a stress idrico
Giraud <i>et al.</i> , 2012	microarray	Crimson seedless	bacca	risposta ad anidride solforosa
Wang <i>et al.</i> , 2012a	sequenziamento ad elevata processività	<i>Vitis amurensis</i>	fiori e bacca	identificazione di miRNA

Tab. 2 - Principali approcci per l'analisi trascrittomico a confronto.
 Tab. 2 - Comparison among the most used transcriptomic analytical approaches.

Metodologia	Descrizione	Vantaggi	Svantaggi
Librerie a cDNA/ Sequenze EST	Approccio basato sul sequenziamento di sequenze di RNA convertite in cDNA e clonate in vettori.	Non vi è la necessità di conoscere la sequenza genica a priori.	Metodo a bassa resa (basso numero di sequenze identificate). Sono richiesti costi elevati. Analisi poco informativa per quanto riguarda la modulazione dell'espressione genica.
cDNA-AFLP	Approccio basato sul sequenziamento di frammenti di sequenze di cDNA. L'RNA viene rerottrascritto, tagliato enzimaticamente, legato a degli adattatori e sottoposto ad amplificazione selettiva tramite PCR.	Non vi è la necessità di conoscere la sequenza genica a priori. Elevata sensibilità nell'identificazione di trascritti poco abbondanti.	Metodo molto laborioso. Sono richiesti elevati costi. Solo una parte dei trascritti possono essere identificati.
Ibridazione di array	Approccio basato sull'ibridazione di acidi nucleici. cDNA marcato con fluorescenza viene incubato con un supporto portante intere sequenze di cDNA o corte sequenze nucleotiche, definite sonde, che rappresentano sequenze geniche note.	Metodo veloce. Elevata resa (alto numero di sequenze analizzate). Relativamente poco costoso. Permette di ottenere un'analisi di espressione su scala genomica.	E' necessaria la conoscenza a priori delle sequenze che sono allocate sul supporto (sonde). Il segnale di geni poco e molto espressi è limitato dal <i>background</i> dovuto ad ibridazioni non specifiche e dalla saturazione del segnale di fluorescenza. L'analisi dei dati ottenuti richiede l'utilizzo di approcci statistici mirati.
RNA-seq	Approccio che si avvale di tecnologie di sequenziamento di ultima generazione ad elevata processività. L'RNA viene convertito in cDNA e si producono librerie di frammenti di cDNA che vengono sequenziate. Le corte sequenze ottenute vengono allineate contro un genoma di riferimento o assemblate tra loro per costruire sequenze geniche.	Metodo molto veloce. Non vi è segnale di <i>background</i> e limitazioni nel range di rivelazione del segnale. Permette di ottenere un'analisi di espressione su scala genomica. Si definiscono le strutture dei trascritti (esoni/introni, splicing alternativi, isoforme, SNP...). Si possono identificare geni non predetti nel genoma di riferimento.	Metodo in continuo sviluppo. I costi sono elevati. Senza la disponibilità di una sequenza genomica di riferimento l'elaborazione dei dati è molto complicata. L'elaborazione dei dati richiede l'utilizzo di approcci informatici e la disponibilità di potenti hardware per la gestione dell'enorme quantità di informazioni ottenute.

geniche era ancora limitata, e sono stati quasi esclusivamente rivolti allo studio delle variazioni dell'espressione genica che si verificano durante la formazione (fase di crescita erbacea) e la maturazione della bacca (Ablett *et al.*, 2000; Burger e Botha, 2004; Davies e Robinson, 2000; Moser *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2007; Terrier *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012b; Zamboni *et al.*, 2008). In alcuni casi sono state analizzate le risposte a diversi fattori abiotici (Daldoul *et al.*, 2010) e biotici (Choi *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2012; Malacarne *et al.*, 2011; Polesani *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). Nel complesso questi lavori hanno permesso per la prima volta di individuare il corpus di geni che modificano la loro espressione nei diversi processi studiati e, in base alla nota o ipotetica funzione delle proteine che essi codificano, è stato possibile tracciare una mappa dei metabolismi coinvolti.

La disponibilità sempre crescente di *Expressed Sequence Tags* (ESTs), sequenze di geni espressi, spesso non complete, ottenute da diversi tessuti in funzione di determinati processi di sviluppo e/o in risposta a stress abiotici e biotici, e la loro organizzazione e disponibilità in banche dati pubbliche, ha fornito il punto di partenza per lo sviluppo di altre meto-

dologie di analisi. In alcuni casi si tratta di analisi *in silico*, basate sul semplice censimento del numero di volte che una sequenza è rappresentata in una determinata collezione di EST. Questo approccio è stato utilizzato ad esempio per studiare i geni coinvolti nelle fasi di formazione e di maturazione della bacca (da Silva *et al.*, 2005; Fei *et al.*, 2004). In altri casi, invece, l'informazione ottenuta dalla sequenza di ESTs è stata utilizzata per lo sviluppo di strumenti di analisi basati sull'ibridazione degli acidi nucleici.

L'analisi trascrittomico basata sull'ibridazione degli acidi nucleici

La disponibilità di sequenze ESTs e la possibilità di produrre supporti miniaturizzati (array o chip) nei quali corte porzioni di DNA fissate al supporto solido sono utilizzate come sonde, ha permesso anche in vite di caratterizzare le variazioni dell'espressione genica su larga scala utilizzando tecniche di analisi basate sull'ibridazione degli acidi nucleici. La versatilità e la relativa facilità e rapidità di applicazione dell'analisi trascrittomico basata sull'ibridazione di array ha consentito un ampio utilizzo di questa tecnologia che ha sostituito molti degli approcci analitici precedente-

mente utilizzati per analisi trascrizionali su larga scala. I primi esperimenti sono stati condotti usando array le cui sonde erano costituite dalle stesse ESTs (Gatto *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2005) o da piccoli frammenti di DNA (oligo) della lunghezza di 35-50 nt (Glissant *et al.*, 2008; Terrier *et al.*, 2005) sintetizzati sulla base delle informazioni di sequenza ottenute dalle stesse ESTs. Queste prime applicazioni della tecnologia basata su array sono stati rivolti alla caratterizzazione delle variazioni di espressione genica durante lo sviluppo della bacca. Un altro esempio di sviluppo di un array simile a quelli sopra descritti è quello dello studio pubblicato da Mathiason *et al.* (2009), nel quale vengono utilizzate ESTs di gemma di *Vitis vinifera* cv Perlette e di *Vitis riparia*. Questo array è stato utilizzato per studiare le variazioni di espressione genica che avvengono all'interno delle gemme ibernanti durante il periodo di soddisfacimento del fabbisogno in freddo ai fini del superamento della dormienza endogena.

Nel 2004 Affymetrix ha reso disponibile il primo microarray commerciale (GeneChip® *Vitis vinifera* Genome Array) basato su oligonucleotidi della lunghezza di 25 nt. Le sonde di questo chip sono state sintetizzate sulla base delle informazioni di sequenza di vite disponibili al momento della realizzazione nelle banche dati GenBank®, dbEST and RefSeq. Il supporto permette di analizzare contemporaneamente l'espressione di 14.000 trascritti di *Vitis vinifera* e 1.700 trascritti di altre specie del genere *Vitis*. Questo chip è stato inizialmente utilizzato per caratterizzare l'espressione tessuto-specifica in bacca matura di Cabernet Sauvignon (Grimplet *et al.*, 2007) e per lo studio della dinamica delle fasi di formazione e maturazione della bacca in Cabernet Sauvignon (Deluc *et al.*, 2007; Lund *et al.*, 2008) e Pinot Nero (Pilati *et al.*, 2007). Lo stesso chip è stato utilizzato per lo studio dell'influenza di fattori esterni sul trascrittoma dell'acino in risposta allo stress idrico e salino in Chardonnay e Cabernet Sauvignon (Cramer *et al.*, 2007; Deluc *et al.*, 2009), in risposta al trattamento con ABA nella buccia di bacche di Cabernet Sauvignon (Koyama *et al.*, 2010) e per correlare l'espressione genica e la produzione di antociani in risposta al caldo in Cabernet Sauvignon (Mori *et al.*, 2007). Inoltre, il microarray Affymetrix è stato utilizzato per analizzare le variazioni dell'espressione genica in relazione a infezioni virali (Vega *et al.*, 2011), al trattamento conservante con anidride solforosa su uva da tavola cv Crimson Seedless (Giraud *et al.*, 2012), per studiare le risposte trascrizionali di piante propagate *in vitro* ed esposte ad alta luminosità dopo trasferimento *ex vitro* (Carvalho *et al.*, 2011), e in relazione

all'induzione della sintesi di metaboliti secondari in colture cellulari di vite (D'Onofrio *et al.*, 2009; Zamboni *et al.*, 2009). Una versione implementata del chip Affymetrix (GrapeGen GeneChip®) che permette l'analisi contemporanea di quasi 19.000 geni, è stata utilizzata per caratterizzare il processo di sviluppo dell'acino nella cv Norton, che contiene buona parte del genoma della specie *Vitis aestivalis* (Ali *et al.*, 2011), nella cv Trincadeira (Fortes *et al.*, 2011), e per studiare le variazioni di espressione genica in foglie di *Vitis vinifera* cv Malbec in risposta al trattamento con UV-B (Pontin *et al.*, 2010). Un altro array commerciale ad oligonucleotidi, il *Vitis vinifera* AROSE V1.0, è stato sviluppato dall'Operon Biotechnology usando l'informazione di sequenza depositata nel database Grape Gene Index (Release 3.0) dell'Institute for Genomic Research (TIGR). Questo supporto contiene sonde da 70 nt e permette di monitorare l'espressione di quasi 15.000 trascritti. Questo chip è stato utilizzato per studiare i cambiamenti nell'espressione genica in bacche di Cabernet Sauvignon in risposta al trattamento con etilene (Chervin *et al.*, 2008), in buccia di bacche di Raboso Piave in risposta a diverse condizioni di appassimento post-raccolta (Rizzini *et al.*, 2009) e per identificare geni modulati negli ultimi stadi di maturazione in Chardonnay (Guillaumie *et al.*, 2011). Per quanto riguarda le variazioni dell'espressione genica in vite in risposta a stress biotici e abiotici, il supporto ha permesso di studiare i profili trascrizionali di foglie di piante di Chardonnay infettate in campo da fitoplasmi (Hren *et al.*, 2009), la risposta di giovani piante all'infezione del fungo *Eutypa lata* responsabile della malattia del legno eutopiosi (Rotter *et al.*, 2009) e il profilo trascrizionale del picciolo fogliare di viti della cv Grenache durante il recovery dallo stress idrico (Perrone *et al.*, 2012).

Il completamento e la pubblicazione della sequenza del genoma di vite (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007) hanno fornito la possibilità di sviluppare nuovi microarray per l'analisi dell'espressione genica su scala genomica. Questa nuova generazione di array si è basata sulle diverse versioni della sequenza genomica del clone sperimentale di Pinot Nero PN40024 via via rilasciate e caratterizzate, partendo dalla versione "8.4X" fino ad arrivare alla "12X", da un grado di accuratezza sempre maggiore. Le sonde contenute in questi array sono sintetizzate sulla base delle sequenze geniche "predette", ovvero sequenze che hanno tutte le caratteristiche per essere geni ma delle quali spesso non si ha la certezza per quanto riguarda la struttura (la reale organizzazione in esoni e introni) e la loro effettiva espressione. Questa limitazione è

ampiamente compensata dal fatto di poter avere finalmente strumenti di analisi di espressione genica potenzialmente in grado di rilevare l'espressione di tutti i geni del genoma e fornire pertanto una rappresentazione globale del trascrittoma e delle sue variazioni. Il Centro di Genomica Funzionale Vegetale dell'Università degli Studi di Verona ha prodotto un primo array (CombiMatrix GrapeArray 1.2) ad oligonucleotidi che permette il monitoraggio simultaneo di circa 25.000 trascritti selezionati unendo le informazioni della banca dati TIGR Grape Gene Index (Release 5.0) e le putative regioni codificanti predette dalla sequenza 8.4X del genoma (Jaillon *et al.*, 2007). Con tale chip sono stati caratterizzati i profili di espressione della bacca di Corvina non solo durante lo sviluppo e la maturazione ma anche in risposta ad un processo tecnologico quale l'appassimento post-raccolta (Zamboni *et al.*, 2010). L'utilizzo dello stesso supporto ha permesso di confrontare le variazioni dell'espressione genica di *Vitis vinifera* con quella di *Vitis riparia* in risposta all'infezione da *Plasmopara viticola* (Polesani *et al.*, 2010).

Un nuovo e più completo chip basato sulla tecnologia NimbleGen (090918_Vitus_exp_HX12) è stato sviluppato utilizzando la predizione V1 (<http://genomes.cribi.unipd.it/DATA/>) del genoma 12X di vite (<http://ddlab.sci.univr.it/FunctionalGenomics/>) e permette di monitorare circa 29.500 trascritti. Il supporto NimbleGen consente, inoltre, di effettuare l'ibridazione simultanea di 12 campioni riducendo il costo degli esperimenti. L'utilizzo di questo chip ha permesso di studiare il trascrittoma in bacche di Sangiovese durante la maturazione, in risposta al diradamento dei grappoli applicato all'inizio della fase di invaiatura (Pastore *et al.*, 2011).

L'analisi trascrittomica basata sul sequenziamento ad elevata processività: RNA-seq

I metodi di analisi microarray, basati sull'ibridazione degli acidi nucleici, rappresentano la tecnologia ad oggi maggiormente utilizzata per l'analisi dell'espressione genica su larga scala. Tuttavia, la sensibilità e l'accuratezza di questo approccio sono limitate dalla diversa performance delle sonde dovuta alla loro diversa efficienza e dal fatto che molto spesso si ha un segnale di background che limita l'individuazione di geni poco espressi. Inoltre l'analisi microarray è applicabile solamente in organismi per i quali si dispone di una sequenza completa del genoma o di una grande collezione di sequenze di cDNA. Tramite analisi microarray è, infatti, possibile rivelare differenze di espressione solamente per i geni rappresenta-

ti sul supporto, senza possibilità di individuare nuove regioni genomiche trascritte.

Uno strumento molto potente alternativo alla tecnologia microarray è l'RNA-seq, che rappresenta ad oggi la metodologia analitica più accurata ed efficace per le misure di espressione genica. L'RNA-seq utilizza le recenti tecniche di sequenziamento ad elevata processività (*deep sequencing*) che consentono in pochi giorni di ottenere milioni di sequenze relativamente corte (poche centinaia di bp). Queste sequenze possono essere utilizzate per l'analisi di espressione determinando se e quante volte ogni sequenza viene ritrovata nella sequenza del genoma di riferimento. In alternativa, con un processo più complesso, queste possono essere conteggiate e contemporaneamente assemblate *ex novo* per ricostruire la sequenza complessiva di trascritti più lunghi (potenzialmente di interi geni espressi), senza l'aiuto dell'ancoraggio ad un genoma di riferimento (Bennett, 2004; Margulies *et al.*, 2005). Ciò che si ottiene è una precisa mappa trascrizione su scala genomica che fornisce informazioni sulla complessità e sulle dinamiche del trascrittoma. Inoltre la visione globale e la dettagliata organizzazione del trascrittoma fornite dall'approccio RNA-seq permettono di identificare nuovi trascritti, isoforme di *splicing*, polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) e di definire la precisa localizzazione dei confini di trascrizione (Li *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008). L'RNA-seq ha anche il vantaggio, rispetto all'approccio microarray, di generare misure di espressione assolute non limitate della presenza di segnali di background, che forniscono un range di espressione molto ampio e consentono un'analisi più accurata delle differenze di espressione tra i campioni in analisi.

La disponibilità di un genoma di riferimento di *Vitis vinifera* (cv Pinot Nero, clone PN40024) ha permesso di utilizzare, in un numero ancora molto limitato di casi, l'approccio RNA-seq per condurre analisi trascrizionali anche in vite. Il primo studio di RNA-seq riportato in vite è stato realizzato utilizzando RNA estratto da foglie, radici, callo e fusto del clone PN40024 di Pinot Nero (Denoëud *et al.*, 2008). Le corte sequenze sono state ottenute con la tecnologia Solexa/Illumina e mappate sul genoma di riferimento al fine di costruire modelli genici *ex novo*, identificare nuovi esoni e forme alternative di *splicing*.

Successivamente, la tecnologia di sequenziamento ad elevata processività 454 è stata applicata in vite nell'ambito di uno studio riguardante la creazione di un catalogo di trascritti finalizzato sia all'arricchimento della libreria di sequenze EST disponibili sia alla costruzione di una piattaforma microarray per studi di

espressione (Bellin *et al.*, 2009) utilizzando RNA estratto da bacche di Corvina durante la maturazione e l'appassimento. La prima analisi condotta con metodologia RNA-seq finalizzata alla caratterizzazione dell'espressione genica globale di vite durante lo sviluppo e maturazione della bacca è stata realizzata nella cv Corvina da Zenoni *et al.* (2010). In questo lavoro oltre ad una completa e dettagliata analisi del trascrittoma e delle sue dinamiche nel corso dello sviluppo, sono stati individuati geni con livelli di espressione molto bassi, nuove varianti trascrizionali, e SNP specifici di regioni genomiche trascritte.

Gli studi che si avvalgono della tecnologia RNA-seq in vite sono ancora limitati soprattutto per gli elevati costi richiesti per questo tipo di approccio. Tuttavia, i dati fino ad ora ottenuti dimostrano come questa metodologia sia di fondamentale utilizzo per una sempre maggiore precisione nella definizione delle sequenze geniche presenti nel genoma di vite e delle loro dinamiche trascrizionali. Queste informazioni permetteranno di caratterizzare in modo sempre più accurato le differenze tra varietà di vite, in termini sia di identità di geni presenti negli specifici genomi, sia di espressione genica intesa come l'insieme di tutte le dinamiche trascrizionali. L'evoluzione tecnologica di questo tipo di approccio permetterà in un futuro non molto lontano di rendere l'ottenimento di tutte queste informazioni indipendente dalla disponibilità di un genoma di riferimento, potendo quindi caratterizzare a livelli molecolari molto dettagliati le peculiarità delle singole varietà di vite.

Analisi di piccoli RNA non codificanti

Anche in vite una particolare attenzione è stata rivolta alle variazioni quantitative e/o qualitative che interessano le molecole di RNA non codificanti come i micro-RNA (miRNA) a cui è riconosciuto un ruolo nella regolazione dell'espressione genica. La caratterizzazione di questa particolare tipologia di trascritti è stata condotta utilizzando diversi approcci molecolari che vanno dalla creazione e sequenziamento di librerie alle più avanzate tecnologie di sequenziamento ad elevata processività. Analisi bioinformatiche condotte sulla base della sequenza genomica hanno evidenziato la presenza di 164 putativi miRNA raggruppati in diverse famiglie (Jaillon *et al.*, 2007). Una banca dati di 5.778 miRNA è stata successivamente creata utilizzando la sequenza e la predizione genica del genoma di Pinot Nero eterozigote (Lazzari *et al.*, 2009). Una prima validazione di putativi miRNA e un'analisi del loro possibile coinvolgimento nella formazione e maturazione della bacca è stata

condotta da Carra *et al.* (2009) tramite sequenziamento di una libreria di piccoli RNA generata per questo scopo. Altri putativi miRNA sono stati identificati attraverso una più accurata analisi bioinformatica della sequenza del genoma di Pinot Nero pubblicata da (Jaillon *et al.*, 2007) e la successiva validazione della loro espressione attraverso approcci di sequenziamento ad elevata processività (Mica *et al.*, 2010). Inoltre utilizzando un chip CombiMatrix opportunamente sviluppato lo stesso lavoro evidenzia la loro espressione differenziale durante la maturazione della bacca. (Mica *et al.*, 2010).

Attraverso le nuove tecnologie di sequenziamento ad elevata processività sono stati evidenziati altri putativi miRNA ed è stato dimostrato il loro profilo di espressione in diversi organi in Pinot Nero (Pantaleo *et al.*, 2010), nell'ibrido *Vitis vinifera* x *Vitis labrusca* cv Summer Black (Wang *et al.*, 2011a) e nella specie selvatica *Vitis amurensis* (Wang *et al.*, 2012a). La validazione della precisa sequenza di molecole di miRNA ottenute attraverso gli approcci di sequenziamento ad elevata processività (Wang *et al.*, 2011b) dimostra come questa tecnologia consenta di ottenere informazioni trascrittomiche fondamentali per studi di genomica funzionale in vite.

Organizzazioni dei risultati trascrittomici in banche dati

I progressi ottenuti in campo tecnologico nell'ultimo decennio e la disponibilità della sequenza del genoma di vite consentono attualmente di effettuare analisi trascrittomiche su larga scala a costi relativamente bassi e in tempi relativamente brevi. La crescita progressiva delle informazioni generate fino ad oggi ha reso necessaria la loro organizzazione in banche dati e ciò ha richiesto lo sviluppo di programmi di gestione, analisi e rappresentazione dei dati. MapMan, sviluppato inizialmente per la visualizzazione dei dati di espressione genica di *Arabidopsis thaliana*, è stato recentemente esteso alla vite sulla base dell'annotazione del TIGR Grape Gene Index (Release 5.0) (Rotter *et al.*, 2009) e permette la visualizzazione di dati generati con le piattaforme Affymetrix e Operon. Un altro strumento, VitisNet (Grimplet *et al.*, 2009), permette la visualizzazione integrata di trascritti, proteine e metaboliti in una mappa molecolare dove 13,145 geni sono stati assegnati a 219 network. Questi strumenti, sono molto utili per interpretare la mole informazioni che derivano dalle analisi trascrittomiche ed avere una visione globale delle vie metaboliche o dei processi di sviluppo interessati.

Conclusioni e prospettive future

Il progresso delle conoscenze scientifiche che riguardano la genomica e la trascrittomica della vite ha avuto negli ultimi anni una sorprendente accelerazione e una mole immensa di preziose informazioni è ora già disponibile alla viticoltura e all'enologia. L'utilizzo di queste informazioni e la loro applicazione pratica, facilitata dalle continue innovazioni nel campo delle nanotecnologie, dovrà essere indirizzato, nei prossimi anni per re-impostare la viticoltura di alcuni paesi del vecchio continente, Italia *in primis*, al fine di renderla sostenibile, competitiva e di qualità. Tutto ciò preservando gli aspetti legati alla territorialità e alla tipicità che distinguono la viticoltura del vecchio continente rispetto a quella dei paesi nei quali essa si è sviluppata più di recente.

Riassunto

Nel 2007 sono stati pubblicati i risultati del sequenziamento e dell'analisi dettagliata del genoma di *Vitis vinifera* frutto di due iniziative indipendenti, una italo-francese e l'altra italo-americana. Questi risultati costituiscono la base per studi futuri e gettano le fondamenta per l'adozione di metodologie innovative per sviluppare e rafforzare la viticoltura italiana e mondiale del XXI secolo. In questa review verranno illustrate le potenzialità delle tecnologie derivate dalla conoscenza del genoma come ad esempio lo sviluppo di strumenti per l'analisi di espressione genica su larga scala, e riportati alcuni esempi inerenti al loro impiego attuale e futuro in viticoltura.

Parole chiave: genoma, sequenziamento, trascrittoma, espressione genica, *Vitis vinifera*.

Bibliografia

- ABLETT E., SEATON G., SCOTT K., SHELTON D., GRAHAM M.W., BAVERSTOCK P., LEE L.S., HENRY R., 2000. *Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry*. Plant Sci. 159: 87-95.
- ALI M.B., HOWARD S., CHEN S., WANG Y., YU O., KOVACS L.G., QIU W., 2011. *Berry skin development in Norton grape: distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis*. BMC Plant Biol 11: 7.
- BELLIN D., FERRARINI A., CHIMENTO A., KAISER O., LEVENKOVA N., BOUFFARD P. AND DELLEDONNE M., 2009. *Combining next-generation pyrosequencing with microarray for large scale expression analysis in non-model species*. BMC Genomics 10: 555.
- BENNETT S., 2004. *Solexa Ltd*. Pharmacogenomics 5: 433-438.
- BURGER A.L., BOTHA F.C., 2004. *Ripening-related gene expression during fruit ripening in Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon and Clairette blanche*. Vitis 43: 59-63.
- CARRA A., MICA E., GAMBINO G., PINDO M., MOSER C., PE M.E.,

- SCHUBERT A., 2009. *Cloning and characterization of small non-coding RNAs from grape*. Plant J 59: 750-763.
- CARVALHO L.C., VILELA B.J., MULLINEAUX P.M., AMANCIO S., 2011. *Comparative transcriptomic profiling of Vitis vinifera under high light using a custom-made array and the Affymetrix GeneChip*. Mol Plant 4: 1038-1051.
- CHERVIN C., TIRA-UMPHON A., TERRIER N., ZOUINE M., SEVERAC D., ROUSTAN J.P., 2008. *Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase*. Physiol Plant 134: 534-546.
- CHOI Y.J., YUN H.K., PARK K.S., NOH J.H., HEO Y.Y., KIM S.H., KIM D.W., LEE H.J., 2010. *Transcriptional profiling of ESTs responsive to Rhizobium vitis from 'Tamnara' grapevines (Vitis sp.)*. J Plant Physiol 167: 1084-1092.
- CIPRIANI G., MARRAZZO M.T., DI GASPERO G., PFEIFFER A., MORGANTE M., TESTOLIN R., 2008. *A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (Vitis spp.) genotyping*. BMC Plant Biol 8: 127.
- CIPRIANI G., SPADOTTO A., JURMAN I., DI GASPERO G., CRESPIAN M., MENEGHETTI S., FRARE E., VIGNANI R., CRESTI M., MORGANTE M., PEZZOTTI M., PE E., POLICRITI A., TESTOLIN R., 2010. *The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (Vitis vinifera L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin*. Theor. Appl. Gen. 121: 1569-1585.
- CRAMER G.R., ERGUL A., GRIMPLET J., TILLET R.L., TATTERSALL E.A., BOHLMAN M.C., VINCENT D., SONDEREGGER J., EVANS J., OSBORNE C., QUILICI D., SCHLAUCH K.A., SCHOOLEY D.A., CUSHMAN J.C., 2007. *Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles*. Funct Integr Genomics 7: 111-134.
- DA SILVA F.G., IANDOLINO A., AL-KAYAL F., BOHLMANN M.C., CUSHMAN M.A., LIM H., ERGUL A., FIGUEROA R., KABULUGLU E.K., OSBORNE C., ROWE J., TATTERSALL E., LESLIE A., XU J., BAEK J., CRAMER G.R., CUSHMAN J.C., COOK D.R., 2005. *Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple Vitis species and development of a compendium of gene expression during berry development*. Plant Physiol 139: 574-597.
- DALDOUL S., GUILLAUMIE S., REUSTLE G.M., KRCZAL G., GHORBEL A., DELROT S., MLIKI A., HOFER M.U., 2010. *Isolation and expression analysis of salt induced genes from contrasting grapevine (Vitis vinifera L.) cultivars*. Plant Sci 179: 489-498.
- DAVIES C., ROBINSON S.P., 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.G., GRIMPLET J., WHEATLEY M.D., TILLET R.L., QUILICI D.R., OSBORNE C., SCHOOLEY D.A., SCHLAUCH K.A., CUSHMAN J.C., CRAMER G.R., 2007. *Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development*. BMC Genomics 8: 429.
- DELUC L.G., QUILICI D.R., DECENDIT A., GRIMPLET J., WHEATLEY M.D., SCHLAUCH K.A., MERILLON J.M., CUSHMAN J.C., CRAMER G.R., 2009. *Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay*. BMC Genomics 10: 212.
- DENOEUDE F., AURY J.M., DA SILVA C., NOEL B., ROGIER O., DELLEDONNE M., MORGANTE M., VALLE G., WINCKER P., SCARPELLI C., JAILLON O., ARTIGUENAVE F., 2008. *Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing*. Genome Biol 9: R175.
- D'ONOFRIO C.D., COX A., DAVIES C., BOSS P.K., 2009. *Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates*. Functional Plant Biology 36: 323-338.
- FEI Z., TANG X., ALBA R.M., WHITE J.A., RONNING C.M., MARTIN

- G.B., TANKSLEY S.D., GIOVANNONI J.J., 2004. *Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening*. Plant J 40: 47-59.
- FORTES A.M., AGUDELO-ROMERO P., SILVA M.S., ALI K., SOUSA L., MALTESE F., CHOI Y.H., GRIMPLET J., MARTINEZ-ZAPATER J.M., VERPOORTE R., PAIS M.S., 2011. *Transcript and metabolite analysis in Trincadeira cultivar reveals novel information regarding the dynamics of grape ripening*. BMC Plant Biol 11: 149.
- GATTO P., VRHOVSEK U., MUTH J., SEGALA C., ROMUALDI C., FONTANA P., PRUEFFER D., STEFANINI M., MOSER C., MATTIVI F., VELASCO R., 2008. *Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes*. J Agric Food Chem 56: 11773-11785.
- GIRAUD E., IVANOVA A., GORDON C.S., WHELAN J., CONSIDINE M.J., 2012. *Sulphur dioxide evokes a large scale reprogramming of the grape berry transcriptome associated with oxidative signalling and biotic defence responses*. Plant Cell Environ 35: 405-417.
- GLISSANT D., DEDALDECHAMP F., DELROT S., 2008. *Transcriptomic analysis of grape berry softening during ripening*. J. Int. Sci. Vigne Vin 42: 1-13.
- GRIMPLET J., CRAMER G.R., DICKERSON J.A., MATHIASON K., VAN HEMERT J., FENNEL A.Y., 2009. *VitisNet: "Omics" integration through grapevine molecular networks*. PLoS One 4: e8365.
- GRIMPLET J., DELUC L.G., TILLET R.L., WHEATLEY M.D., SCHLAUCH K.A., CRAMER G.R., CUSHMAN J.C., 2007. *Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues*. BMC Genomics 8: 187.
- GUILLAUMIE S., FOUQUET R., KAPPEL C., CAMPS C., TERRIER N., MONCOMBLE D., DUNLEVY J.D., DAVIES C., BOSS P.K., DELROT S., 2011. *Transcriptional analysis of late ripening stages of grapevine berry*. BMC Plant Biol 11: 165.
- HAO Z., FAYOLLE L., VAN TUINEN D., CHATAGNIER O., LI X., GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V., 2012. *Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode Xiphinema index involves priming of defence gene responses in grapevine*. J Exp Bot. (doi: 10.1093/jxb/ers046).
- HREN M., NIKOLIC P., ROTTER A., BLEJEC A., TERRIER N., RAVNIKAR M., DERMASTIA M., GRUDEN K., 2009. *'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine*. BMC Genomics 10: 460.
- JAILLON O., AURY J.M., NOEL B., POLICRITI A., CLEPET C., CASAGRANDE A., CHOISNE N., AUBOURG S., VITULO N., JUBIN C., VEZZI A., LEGEI F., HUGUENEY P., DASILVA C., HORNER D., MICA E., JUBLOT D., POULAIN J., BRUYERE C., BILLAULT A., SEGURENS B., GOUYVENOUX M., UGARTE E., CATTONARO F., ANTHOUARD V., VICO V., DEL FABBRO C., ALAUX M., DI GASPERO G., DUMAS V., FELICE N., PAILLARD S., JUMAN I., MOROLDO M., SCALABRIN S., CANAGUIER A., LE CLAINCHE I., MALACRIDA G., DURAND E., PESOLE G., LAUCOU V., CHATELET P., MERDINOGLU D., DELLEDONNE M., PEZZOTTI M., LECHARNY A., SCARPELLI C., ARTIGUENAVE F., PE M.E., VALLE G., MORGANTE M., CABOCHE M., ADAM-BLONDON A.F., WEISSENBACH J., QUETIER F., WINCKER P., 2007. *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*. Nature 449: 463-467.
- KOYAMA K., SADAMATSU K., GOTO-YAMAMOTO N., 2010. *Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape*. Funct Integr Genomics 10: 367-381.
- LAZZARI B., CAPRERA A., CESTARO A., MERELLI I., DEL CORVO M., FONTANA P., MILANESI L., VELASCO R., STELLA A., 2009. *Ontology-oriented retrieval of putative microRNAs in Vitis vinifera via GrapeMiRNA: a web database of de novo predicted grape microRNAs*. BMC Plant Biol 9: 82.
- LI H., RUAN J., DURBIN R., 2008. *Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores*. Genome Research 18: 1851-1858.
- LUND S.T., PENG F.Y., NAYAR T., REID K.E., SCHLOSSER J., 2008. *Gene expression analyses in individual grape (Vitis vinifera L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster*. Plant Mol Biol 68: 301-315.
- MALACARNE G., VRHOVSEK U., ZULINI L., CESTARO A., STEFANINI M., MATTIVI F., DELLEDONNE M., VELASCO R., MOSER C., 2011. *Resistance to Plasmopara viticola in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses*. BMC Plant Biol 11: 114.
- MARGULIES M., EGHOLM M., ALTMAN W.E., ATTIYA S., BADER J.S., BEMBEN L.A., BERKA J., BRAVERMAN M.S., CHEN Y.J., CHEN Z., DEWELL S.B., DU L., FIERRO J.M., GOMES X.V., GODWIN B.C., HE W., HELGESEN S., HO C.H., IRZYK G.P., JANDO S.C., ALENQUER M.L., JARVIE T.P., JIRAGE K.B., KIM J.B., KNIGHT J.R., LANZA J.R., LEAMON J.H., LEFKOWITZ S.M., LEI M., LI J., LOHMAN K.L., LU H., MAKHIJANI V.B., MCDADE K.E., MCKENNA M.P., MYERS E.W., NICKERSON E., NOBILE J.R., PLANT R., PUC B.P., RONAN M.T., ROTH G.T., SARKIS G.J., SIMONS J.F., SIMPSON J.W., SRINIVASAN M., TARTARO K.R., TOMASZ A., VOGT K.A., VOLKMER G.A., WANG S.H., WANG Y., WEINER M.P., YU P., BEGLEY R.F., ROTHBERG J.M., 2005. *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature 437: 376-380.
- MATHIASON K., HE D., GRIMPLET J., VENKATESWARI J., GALBRAITH D.W., OR E., FENNEL A., 2009. *Transcript profiling in Vitis riparia during chilling requirement fulfillment reveals coordination of gene expression patterns with optimized bud break*. Funct Integr Genomics 9: 81-96.
- MICA E., PICCOLO V., DELLEDONNE M., FERRARINI A., PEZZOTTI M., CASATI C., DEL FABBRO C., VALLE G., POLICRITI A., MORGANTE M., PESOLE G., PE M.E., HORNER D.S., 2010. *Correction: High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in Vitis vinifera*. BMC Genomics 11: 109.
- MORI K., GOTO-YAMAMOTO N., KITAYAMA M., HASHIZUME K., 2007. *Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature*. J Exp Bot 58: 1935-1945.
- MORTAZAVI A., WILLIAMS B.A., MCCUE K., SCHAEFFER L., WOLD B., 2008. *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods 5: 621-628.
- MOSER C., VENTER M., BURGER A.L., BOTHA F.C., 2001. *Molecular analysis of fruit ripening: the identification of differentially expressed sequences in Vitis vinifera using cDNA-AFLP technology*. Vitis 40: 191-196.
- MYLES S., BOYKO A.R., OWENS C.L., BROWN P.J., GRASSI F., ARADHYA M.K., PRINS B., REYNOLDS A., CHIA J.M., WARE D., BUSTAMANTE C.D., BUCKLER E.S., 2011. *Genetic structure and domestication history of the grape*. Proc Nat Ac Sci USA 108: 3530-3535.
- MYLES S., CHIA J.M., HURWITZ B., SIMON C., ZHONG G.Y., BUCKLER E., WARE D., 2010. *Rapid genomic characterization of the genus vitis*. PLoS One 5: e8219.
- PANTALEO V., SZITTYA G., MOXON S., MIOZZI L., MOULTON V., DALMAY T., BURGIAN J., 2010. *Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis*. Plant J 62: 960-976.
- PASTORE C., ZENONI S., TORNIELLI G.B., ALLEGRO G., DAL SANTO S., VALENTINI G., INTRIERI C., PEZZOTTI M., FILIPPETTI I., 2011. *Increasing the source/sink ratio in Vitis vinifera (cv Sangiovese) induces extensive transcriptome reprogramming and modifies berry ripening*. BMC Genomics 12: 631.
- PENG F.Y., REID K.E., LIAO N., SCHLOSSER J., LIJAVETZKY D., HOLT R., MARTINEZ ZAPATER J.M., JONES S., MARRA M., BOHLMANN J., LUND S.T., 2007. *Generation of ESTs in Vitis vinifera wine grape (Cabernet Sauvignon) and table grape (Muscat Hamburg) and discovery of new candidate genes with potential roles in berry development*. Gene 402: 40-50.

- PERRONE I., PAGLIARANI C., LOVISOLO C., CHITARRA W., ROMAN F., SCHUBERT A., 2012. *Recovery from water stress affects grape leaf petiole transcriptome*. *Planta*.
- PILATI S., PERAZZOLLI M., MALOSSINI A., CESTARO A., DEMATTE L., FONTANA P., DAL RI A., VIOLA R., VELASCO R., 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 veraison*. *BMC Genomics* 8: 428.
- POLESANI M., BORTESI L., FERRARINI A., ZAMBONI A., FASOLI M., ZADRA C., LOVATO A., PEZZOTTI M., DELLEDONNE M., POLVERARI A., 2010. *General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species*. *BMC Genomics* 11: 117.
- POLESANI M., DESARIO F., FERRARINI A., ZAMBONI A., PEZZOTTI M., KORTEKAMP A., POLVERARI A., 2008. *cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola**. *BMC Genomics* 9: 142.
- PONTIN M.A., PICCOLI P.N., FRANCISCO R., BOTTINI R., MARTINEZ-ZAPATER J.M., LIJAVETZKY D., 2010. *Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation*. *BMC Plant Biol* 10: 224.
- RIZZINI F.M., BONGHI C., TONUTTI P., 2009. *Postharvest water loss induces marked changes in transcript profiling in skins of wine grape berries*. *Postharv. Biol. Tech.* 52: 247-253.
- ROTTER A., CAMPS C., LOHSE M., KAPPEL C., PILATI S., HREN M., STITT M., COUTOS-THEVENOT P., MOSER C., USADEL B., DELROT S., GRUDEN K., 2009. *Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata*: extending MapMan ontology for grapevine*. *BMC Plant Biol* 9: 104.
- SHI X., BI J., MORSE J.G., TOSCANO N.C., COOKSEY D.A., 2010. *Differential expression of genes of *Xylella fastidiosa* in xylem fluid of citrus and grapevine*. *FEMS Microbiol Lett* 304: 82-88.
- TERRIER N., AGEORGES A., ABBAL P., ROMIEU C., 2001. *Generation of ESTs from grape berry at various developmental stages*. *J Plant Physiol* 158: 1575-1583.
- TERRIER N., GLISSANT D., GRIMPLET J., BARRIEU F., ABBAL P., COUTURE C., AGEORGES A., ATANASSOVA R., LEON C., RENAUDIN J.P., DEDALDECHAMP F., ROMIEU C., DELROT S., HAMDI S., 2005. *Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development*. *Planta* 222: 832-847.
- VEGA A., GUTIERREZ R.A., PENNA-NEIRA A., CRAMER G.R., ARCE-JOHNSON P., 2011. *Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera**. *Plant Mol Biol* 77: 261-274.
- VELASCO R., ZHARKIKH A., TROGGIO M., CARTWRIGHT D.A., CESTARO A., PRUSS D., PINDO M., FITZGERALD L.M., VEZZULLI S., REID J., MALACARNE G., ILIEV D., COPPOLA G., WARDELL B., MICHELETTI D., MACALMA T., FACCI M., MITCHELL J.T., PERAZZOLLI M., ELDREDGE G., GATTO P., OYZERSKI R., MORETTO M., GUTIN N., STEFANINI M., CHEN Y., SEGALA C., DAVENPORT C., DEMATTE L., MRAS A., BATTILANA J., STORMO K., COSTA F., TAO Q., SI-AMMOUR A., HARKINS T., LACKEY A., PERBOST C., TAILLON B., STELLA A., SOLOVYEV V., FAWCETT J.A., STERCK L., VANDEPOELE K., GRANDO S.M., TOPPO S., MOSER C., LANCHBURY J., BOGDEN R., SKOLNICK M., SGARAMELLA V., BHATNAGAR S.K., FONTANA P., GUTIN A., VAN DE PEER Y., SALAMINI F., VIOLA R., 2007. *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*. *PLoS One* 2: e1326.
- VENTER M., BURGER A.L., BOTHA F.C., 2001. *Molecular analysis of fruit ripening: The identification of differentially expressed sequences in *Vitis vinifera* using cDNA-AFLP technology*. *Vitis* 40: 191-196.
- WANG C., HAN J., LIU C., KORIR N.K., KAYESH E., SHANGGUAN L., LI X., FANG J., 2012a. *Identification of microRNAs from Amur grapes (*Vitis amurensis* Rupr.) by deep sequencing and analysis of microRNA variations with bioinformatics*. *BMC Genomics* 13: 122.
- WANG C., SHANGGUAN L., KIBET K.N., WANG X., HAN J., SONG C., FANG J., 2011a. *Characterization of microRNAs identified in a table grapevine cultivar with validation of computationally predicted grapevine miRNAs by miR-RACE*. *PLoS One* 6: e21259.
- WANG C., WANG X., KIBET N.K., SONG C., ZHANG C., LI X., HAN J., FANG J., 2011b. *Deep sequencing of grapevine flower and berry short RNA library for discovery of novel microRNAs and validation of precise sequences of grapevine microRNAs deposited in miRBase*. *Physiol Plant* 143: 64-81.
- WANG X.C., GUO L., SHANGGUAN L.F., WANG C., YANG G., QU S.C., FANG J.G., 2012b. *Analysis of expressed sequence tags from grapevine flower and fruit and development of simple sequence repeat markers*. *Mol Biol Rep.*
- WATERS D.L., HOLTON T.A., ABLETT E.M., LEE L.S., HENRY R.J., 2005. *cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin*. *Funct Integr Gen.* 5: 40-58.
- XU Y., ZHU Z., XIAO Y., WANG Y., 2009. *Construction of a cDNA Library of *Vitis pseudoreticulata* Native to China Inoculated with *Uncinula necator* and the Analysis of Potential Defence-related Expressed Sequence Tags (ESTs)*. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 30: 65-71.
- YU Y., XU W., WANG S., XU Y., LI H., WANG Y., LI S., 2011. *VpRFP1, a novel C4C4-type RING finger protein gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*, functions as a transcriptional activator in defence response of grapevine*. *J. Exp. Bot.* 62: 5671-5682.
- ZAMBONI A., DI CARLI M., GUZZO F., STOCCHERO M., ZENONI S., FERRARINI A., TONONI P., TOFFALI K., DESIDERIO A., LILLEY K.S., PE M.E., BENVENUTO E., DELLEDONNE M., PEZZOTTI M., 2010. *Identification of putative stage-specific grapevine berry biomarkers and omics data integration into networks*. *Plant Physiol* 154: 1439-1459.
- ZAMBONI A., GATTO P., CESTARO A., PILATI S., VIOLA R., MATTIVI F., MOSER C., VELASCO R., 2009. *Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor*. *BMC Genomics* 10: 363.
- ZAMBONI A., MINOIA L., FERRARINI A., TORNIELLI G.B., ZAGO E., DELLEDONNE M., PEZZOTTI M., 2008. *Molecular analysis of post-harvest withering in grape by AFLP transcriptional profiling*. *J. Exp. Bot.* 59: 4145-4159.
- ZENONI S., FERRARINI A., GIACOMELLI E., XUMERLE L., FASOLI M., MALERBA G., BELLIN D., PEZZOTTI M., DELLEDONNE M., 2010. *Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq*. *Plant Physiol* 152: 1787-1795.