

EFFETTI DELL'UTILIZZO DI ESTRATTI DI LIEVITO INATTIVATO SULLA MATURAZIONE DELLA CV. SANGIOVESE

Pastore C., Allegro G., Pizziolo A., Valentini G., Colucci E., Filippetti I.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari – DISTAL, Università degli Studi di Bologna

email: ilaria.filippetti@unibo.it

Introduzione

Il cambiamento climatico in atto sta avendo molteplici effetti in viticoltura, incluso un disaccoppiamento sempre più evidente tra maturità tecnologica e fenolica nelle bacche, con conseguente squilibrio tra accumulazione zuccherina ed estraibilità dei composti polifenolici. Nella cv. Sangiovese gli antociani, molecole responsabili della colorazione delle bacche e dei vini rossi, sono tra le più sensibili alle alte temperature, poiché incrementi termici anche di medio-bassa entità, causati da periodi prolungati durante la maturazione con temperature superiori a 30°C, possono ridurre la loro sintesi e aumentare la loro degradazione (Movahed et al. 2016; Pastore et al. 2017). Tra le diverse tecniche colturali sviluppate in viticoltura per fare fronte agli effetti negativi legati al cambiamento climatico, l'utilizzo di elicitori (composti di diversa natura quali oligo e polisaccaridi, peptidi, proteine, lipidi, ormoni e microrganismi) rappresenta una soluzione di considerevole interesse, poiché è stato dimostrato che essi sono in grado di indurre nella pianta una risposta fisiologica che porta alla sintesi di metaboliti secondari, polifenoli inclusi. Gli elicitori, una volta applicati sulla pianta, vengono percepiti da recettori di membrana portando a generare molteplici segnali a livello cellulare, che a loro volta possono causare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), in grado di stimolare la sintesi di metaboliti secondari e di attivare meccanismi antiossidanti (Luciano et al. 2017).

Gli estratti di lievito inattivato presenti in commercio e usati nell'industria enologica sono ottenuti in seguito ad inattivazione termica di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* dopo crescita in condizioni aerobiche su mezzi di coltura ad alta concentrazione zuccherina. La loro composizione, pur altamente variabile essendo costituita dalle pareti cellulari e dai metaboliti derivanti dall'autolisi dei lieviti stessi, è caratterizzata da aminoacidi, peptidi, proteine, polisaccaridi, nucleotidi e acidi grassi (Pozo-Bayón et al. 2009). Su queste basi, sono stati condotti recentemente studi per comprendere il loro effetto quando applicati direttamente sulle uve in campo. Tali ricerche hanno mostrato come l'applicazione di estratti di lievito inattivato sulle uve sia in grado di stimolare la sintesi di metaboliti secondari. In Tempranillo, trattamenti con metil-jasmonato ed estratto di lievito inattivato hanno causato un incremento nella concentrazione di antociani e stilbeni (Portu et al. 2016; Portu et al. 2015) e simili risultati sono stati osservati anche per le varietà Merlot e Monastrell (Gómez-Plaza et al. 2017). In altre prove condotte in diverse aree e annate su differenti cultivars (Merlot, Cabernet Sauvignon, Nebbiolo, Syrah, Tempranillo, Gaglioppo, Corvina, Rondinella e Moscato d'Amburgo) è stato confermato che l'applicazione di estratti di lievito inattivato sulle uve è in grado di incrementare, la concentrazione di antociani, dei polifenoli totali, e il livello di polimerizzazione dei tannini e di diminuire la concentrazione di metossipirazine, responsabili dei sentori di vegetale ed erbaceo nei vini (Portu et al. 2015; Villangó et al. 2015; Rio Segade et al. 2016).

In generale, tutti gli studi condotti fino ad ora concordano nell'affermare che l'applicazione di lieviti inattivati sulle uve sia in grado di determinare un miglioramento delle caratteristiche organolettiche dei vini da essi derivati, che presentano una complessiva migliore qualità rispetto a quelli ottenuti da uve non trattate. Nonostante ciò poche ricerche, spesso condotte solo su colture cellulari (Delaunois et al. 2014), hanno focalizzato la loro attenzione sul meccanismo di azione con cui essi esercitano l'attività elicitoria e sul possibile effetto che possano avere a livello molecolare sui geni che presiedono alla biosintesi dei polifenoli e in particolare degli antociani.

In questo contesto, la presente ricerca ha quindi valutato nel triennio 2016-2018 attraverso un approccio integrato biochimico e molecolare, l'effetto dell'applicazione di un estratto di lievito

inattivato sulla maturazione e sulla sintesi di antociani e nella cv Sangiovese, tipicamente caratterizzata da una bassa potenzialità di accumulo di questi composti.

Materiale e metodi

Materiale vegetale

La prova è stata condotta nel triennio 2016-2018 su 6 piante in vaso, uniformate per numero di germogli e di grappoli alla fioritura, presso la stazione sperimentale del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) dell'Università di Bologna, situata a Cadriano (Bo). Tre piante di controllo non trattate (C), sono state confrontate con un uguale numero di piante trattate con un estratto di lievito inattivato commerciale (L), seguendo le istruzioni fornite dalla azienda produttrice. In ciascuna annata il trattamento è stato ripetuto per due volte durante la maturazione, ad inizio invaiatura (A1) e quando l'invaiatura aveva raggiunto circa il 70% (A2). La soluzione contenente il lievito disciolto in acqua (alla concentrazione di 1 kg/ha) è stata distribuita su tutta la chioma.

Durante la maturazione sono stati effettuati diversi campionamenti di acini per monitorare la maturità tecnologica, la concentrazione di antociani via HPLC e l'espressione dei principali geni coinvolti nella biosintesi degli antociani. In particolare, gli acini sono stati prelevati subito prima del primo trattamento (tempo 0, T0), 48 ore dopo il primo trattamento, 48 ore dopo il secondo trattamento, una e tre settimane dopo il secondo trattamento. In seguito alle condizioni climatiche estreme del 2017, un campionamento extra per monitorare la concentrazione di antociani è stato effettuato solo per quest'annata una settimana prima della vendemmia.

Alla vendemmia, ogni pianta è stata raccolta separatamente per valutare il numero di grappoli, la produzione per pianta e il peso medio del grappolo. La compattezza è stata stimata visivamente seguendo la scala OIV (1983).

Analisi della maturità tecnologica e della concentrazione di antociani via HPLC

Nel triennio di sperimentazione per ogni data di campionamento 10 acini per pianta sono stati prelevati per l'analisi di °Brix, pH e acidità titolabile. In contemporanea, 20 acini per pianta sono stati prelevati tagliando attentamente il pedicello con delle forbicine per l'analisi degli antociani via HPLC. Il metodo di analisi utilizzato è riportato in Mattivi et al. 2006 con opportune modifiche, con uno strumento HPLC marca Waters (1525 HPLC) dotato di una colonna a fase inversa RP18 (250 mm x 4 mm, 5 µM, Phenomenex, Castel Maggiore, BO, Italia).

Analisi di espressione genica: estrazione di RNA e Real-Time PCR

Ad ogni campionamento, eccetto la vendemmia, 15-20 acini per pianta a seconda della data di campionamento, sono stati prelevati per le analisi di espressione genica. L'estrazione di RNA è stata condotta sulla buccia degli acini utilizzando il kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich). Tutti i campioni di RNA estratti sono stati successivamente trattati con la DNasi RQ1 (Promega, Madison, USA) per eliminare qualsiasi contaminazione da DNA. Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA trattato con DNasi utilizzando il sistema Improm-II™ (Promega, Madison, USA). Le analisi Real-Time sono state condotte sul cDNA diluito (1:20), utilizzando una master mix contenente SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), i primers per i geni di interesse e per i geni di riferimento. L'analisi Real-Time è stata condotta su uno strumento ABI PRISM StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), escludendo la presenza di prodotti PCR aspecifici attraverso analisi delle curve di dissociazione. Ogni reazione è stata condotta in triplicato, usando i geni per l'actina (Pastore et al., 2011) e l'ubiquitina come geni di riferimento (Bogs et al. 2005). I primers per i principali geni coinvolti nella biosintesi dei flavonoidi e in modo specifico degli antociani sono stati recuperati dalla letteratura: PAL1 (fenilalanina ammonio liasi 1) in Belhadj et al. (2008), DFR (diidroflavonol reductasi), LDOX (leucoantocianidina diossigenasi) e UFGT (UDP glucosio:flavonoid 3-O-glucosiltransferasi) in Goto-Yamamoto et al. (2002), MYBA1 in Jeong et al. (2004). L'efficienza di amplificazione è stata calcolata con il software LinRegPCR e poi

utilizzata per il calcolo del dato di espressione media normalizzata (MNE), come riportato in Simon (2003).

Risultati

Condizioni climatiche, maturità tecnologica e analisi produttive alla vendemmia.

Le tre annate in prova sono risultate molto differenti in termini climatici (Tabella 1), soprattutto nel mese di agosto, quando nel 2017 si sono registrate temperature medie superiori di 0,7 e 2,6 °C rispetto al 2016 e al 2018. Anche a livello delle precipitazioni il 2017 si è distinto per essere stato un anno particolarmente secco con un totale di 261 mm di pioggia caduti nel semestre aprile-settembre rispetto a 317 e 319 mm registrati rispettivamente nel 2016 e 2018.

| | T media (°C) | | | Totale precipitazioni (mm) | | |
|-----------|--------------|------|------|----------------------------|-------|------|
| | 2016 | 2017 | 2018 | 2016 | 2017 | 2018 |
| Aprile | 14,6 | 14,1 | 16,0 | 45 | 33,4 | 65 |
| Maggio | 17,3 | 18,4 | 19,6 | 72,4 | 55,8 | 78,3 |
| Giugno | 21,7 | 24,5 | 23,4 | 107,0 | 21 | 63,6 |
| Luglio | 25,5 | 25,8 | 25,9 | 27,8 | 8 | 42,8 |
| Agosto | 23,7 | 26,3 | 25,9 | 31,8 | 25,2 | 33,5 |
| Settembre | 21,1 | 18,3 | 21,6 | 33,2 | 117,8 | 36 |

Tabella 1. Temperatura minima, media e massima mensile dell'aria da Aprile a Settembre in ciascuna delle annate in prova.

Queste differenze stagionali hanno avuto ripercussione nell'andamento della maturazione e nel determinare il momento di inizio della fase di invaiatura, corrispondente alla prima applicazione con il lievito inattivato, che nel 2017 è risultata anticipata di circa 10 giorni (19/07) rispetto al 2016 (26/07) e al 2018 (28/07). Nonostante ciò, non si sono registrate differenze né in termini di accumulo di solidi solubili (°Brix, Fig. 1) né in termini di acidità titolabile (dati non mostrati) nelle piante controllo (C) rispetto alle piante trattate con il lievito inattivato (L) in nessuna delle annate di prova.

Anche i dati produttivi alla vendemmia non sono stati influenzati nel triennio in prova dal trattamento, che non ha perciò esercitato nessun effetto sul peso dell'acino, del grappolo, sulla produzione per pianta e nemmeno sulla compattezza del grappolo (dati non mostrati).

Accumulo di antociani durante la maturazione e composizione alla vendemmia.

Il primo trattamento con il lievito inattivato è stato effettuato in tutti gli anni di prova in corrispondenza dell'inizio dell'accumulo degli antociani e, pertanto, le piante di entrambe le tesi hanno presentato un incremento lineare nella concentrazione di antociani dopo il trattamento. Tale aumento, peraltro, è risultato significativamente superiore specialmente dopo la seconda applicazione nelle piante trattate con l'estratto di lievito inattivato rispetto al controllo sia nel 2016 che nel 2018, fino alla raccolta (Fig. 2A e Fig. 2C). Nel 2017, invece, non si è avuta alcuna influenza in seguito al trattamento, nonostante un lieve incremento fosse stato osservato in seguito alla seconda applicazione (Fig. 2B).

Il lievito inattivato non ha comportato alcuna modifica nella composizione antocianica delle bacche alla vendemmia che, nelle tre annate di prova, hanno conservato il profilo tipico del Sangiovese (Tab. 2), caratterizzato quasi unicamente dalla forma glucosilata delle 5 antocianine presenti in vite.

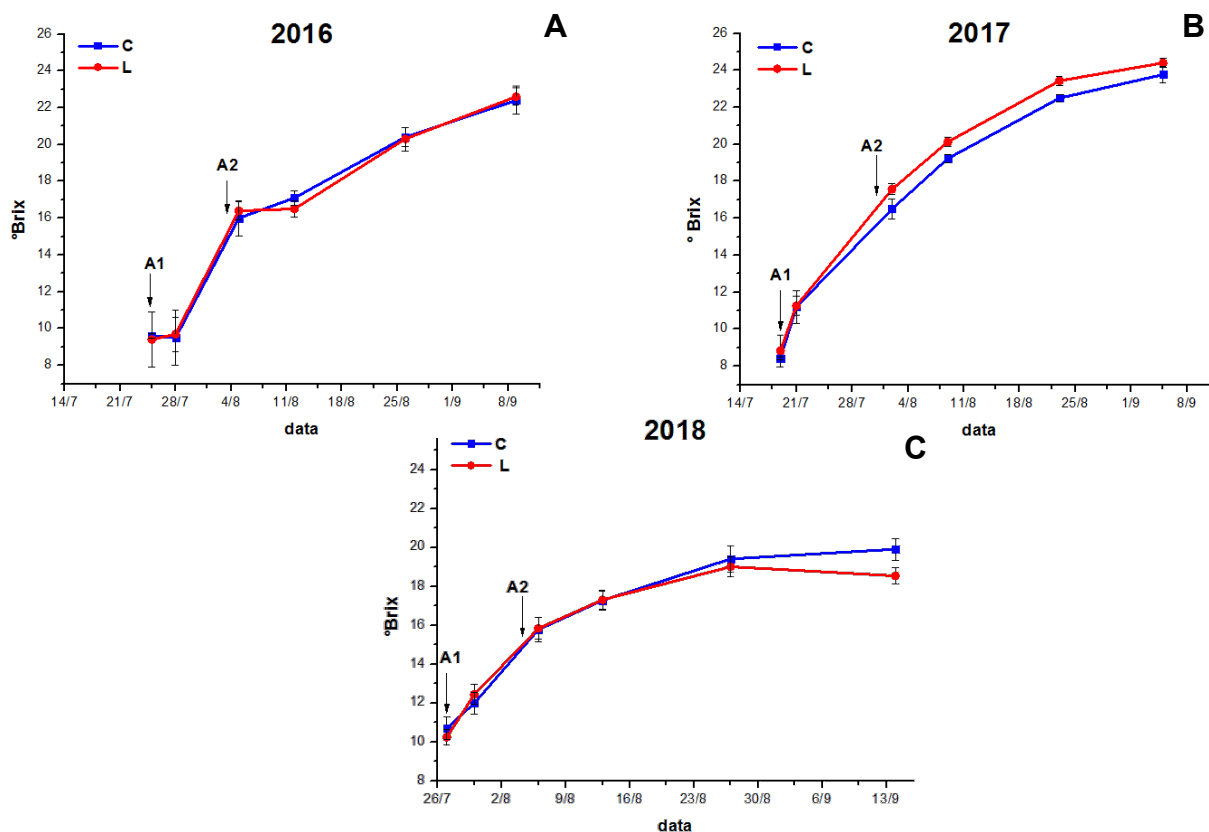


Fig. 1. Accumulo di solidi solubili in bacche C e L durante le stagioni 2016 (A), 2017 (B) e 2018 (C). Le barre di errore indicano l'errore standard (n=3). A1 e A2 corrispondono alle date dei trattamenti.

Analisi di espressione sui geni chiave coinvolti nella biosintesi di antociani nelle bacche.

Le analisi di espressione genica sono state condotte nelle tre annate in prova su alcuni dei principali geni coinvolti nella biosintesi dei flavonoidi (PAL1, DFR e LDOX) e in maniera specifica degli antociani (UFGT e MYBA1) a partire dalla buccia di acini di piante C e L. Nel caso del gene PAL, essendo presente nel genoma di vite in diverse isoforme, è stato scelto il gene codificante per PAL1, risultato coinvolto nella risposta agli elicitatori (Belhadj et al., 2008). In generale, è stato possibile osservare un incremento nell'espressione genica associato al trattamento con il lievito nelle bacche L, nelle annate 2016 e 2018 in cui è stato evidenziato un incremento della concentrazione di antociani. In entrambe le annate, inoltre, nei geni coinvolti in maniera specifica nella biosintesi degli antociani, come UFGT e MYBA1, l'incremento si è verificato a partire dal primo trattamento e si è mantenuto anche successivamente (Fig. 3). Nel caso dei geni coinvolti più a monte nella via biosintetica come PAL1, DFR e LDOX, è stato rilevato nel 2018 un effetto più immediato del trattamento, con un incremento già dopo la prima applicazione dell'espressione genica, mentre nel 2016 l'aumento si è avuto solo a partire dalla seconda applicazione (Fig. 4).

Diversamente dagli altri anni, nel 2017 nessun effetto significativo è stato riscontrato sull'espressione genica in nei geni analizzati, confermando anche a livello molecolare quanto precedentemente visto a livello biochimico (Fig. 3 e Fig. 4).

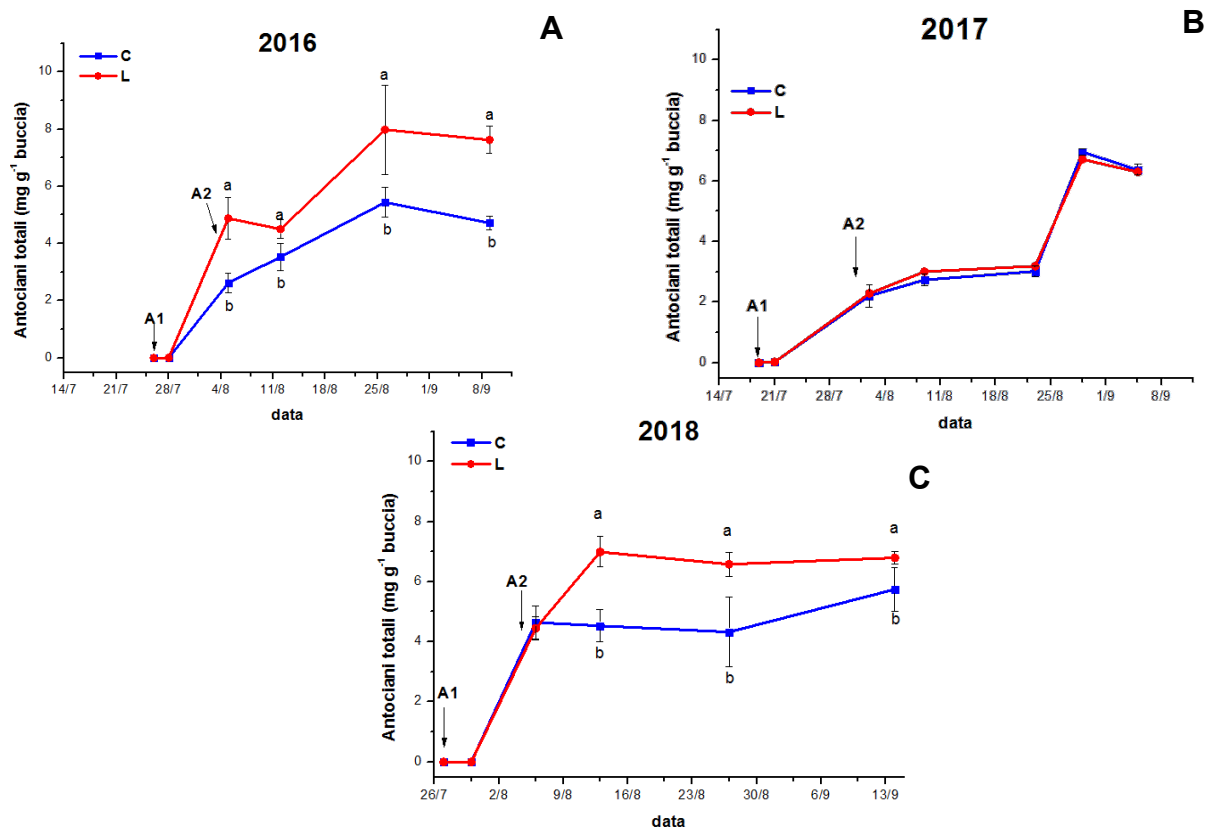


Fig. 2. Accumulo di antociani in bacche C e L durante le stagioni 2016 (A), 2017 (B) e 2018 (C). Le barre di errore indicano l'errore standard (n=3). A1 e A2 corrispondono alle date dei trattamenti.

Tabella 2. Composizione percentuale degli antociani in bacche C e L alla vendemmia nelle annate in prova.

| | | Delfinidina-3-glucoside | Cianidina-3-glucoside | Petunidina-3-glucoside | Peonidina-3-glucoside | Malvidina-3-glucoside |
|------|-------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2016 | C | 14,8 | 28,0 | 14,6 | 13,5 | 29,1 |
| | L | 13,0 | 31,5 | 12,2 | 17,2 | 26,1 |
| | Sign. | ns | ns | ns | ns | Ns |
| 2017 | C | 15,1 | 37,6 | 12,9 | 16,0 | 18,4 |
| | L | 16,9 | 40,1 | 13,0 | 14,4 | 15,6 |
| | Sign. | ns | ns | ns | ns | Ns |
| 2018 | C | 12,1 | 23,3 | 13,8 | 18,0 | 32,8 |
| | L | 11,7 | 21,2 | 13,7 | 18,0 | 35,4 |
| | Sign. | ns | ns | ns | ns | Ns |

Discussione

Nel contesto del cambiamento climatico in atto, l'utilizzo di elicitori in viticoltura può rappresentare una pratica agronomica utile per incrementare la concentrazione antocianica delle cultivar a bacca rossa. In questo triennio di prove, un estratto di lievito inattivato è stato applicato due volte durante la fase di invaiatura in Sangiovese per valutare gli effetti sulla maturazione e sull'accumulo di antociani, cercando di comprendere se ci fossero anche effetti a livello molecolare. Diversi studi condotti in vite hanno mostrato come l'utilizzo di elicitori non

abbia effetto sulla maturazione tecnologica. In particolare, nessun effetto è stato rilevato su Syrah, Merlot, Gallioppo, Glera e Pinot Grigio trattati con lievito inattivato (Battista et al. 2016), in Tempranillo trattato con metil-jasmonato (Portu *et al.* 2016) e in Cabernet Sauvignon in seguito all'applicazione di oligosaccaridi derivati da pectina (Villegas *et al.* 2016). Anche nella presente sperimentazione, in accordo con quanto visto su diverse varietà e con differenti elicitori, la maturità tecnologica non è stata minimamente influenzata dall'applicazione dell'estratto di lievito inattivato in nessuno degli anni di prova, seppur molto diversi climaticamente. Al contrario, l'applicazione del lievito inattivato ha stimolato l'accumulo di antociani in due stagioni di prova (2016 e 2018) su tre e l'attività elicitoria è sembrata essere legata all'andamento stagionale e in particolare a quello delle temperature registrate in fase di invaiatura, ovvero nel momento di applicazione del lievito. Nel 2017 infatti, in seguito alla seconda applicazione del lievito inattivato si sono avuti 7 giorni consecutivi con temperature massime che sfioravano 40°C (Fig. 5). Anche questa prova sperimentale conferma quindi come elevate temperature durante la fase di sintesi degli antociani in Sangiovese, possano condizionarne negativamente l'accumulo come già dimostrato da diverse recenti ricerche (Movahed *et al.*, 2016; Pastore *et al.*, 2017).

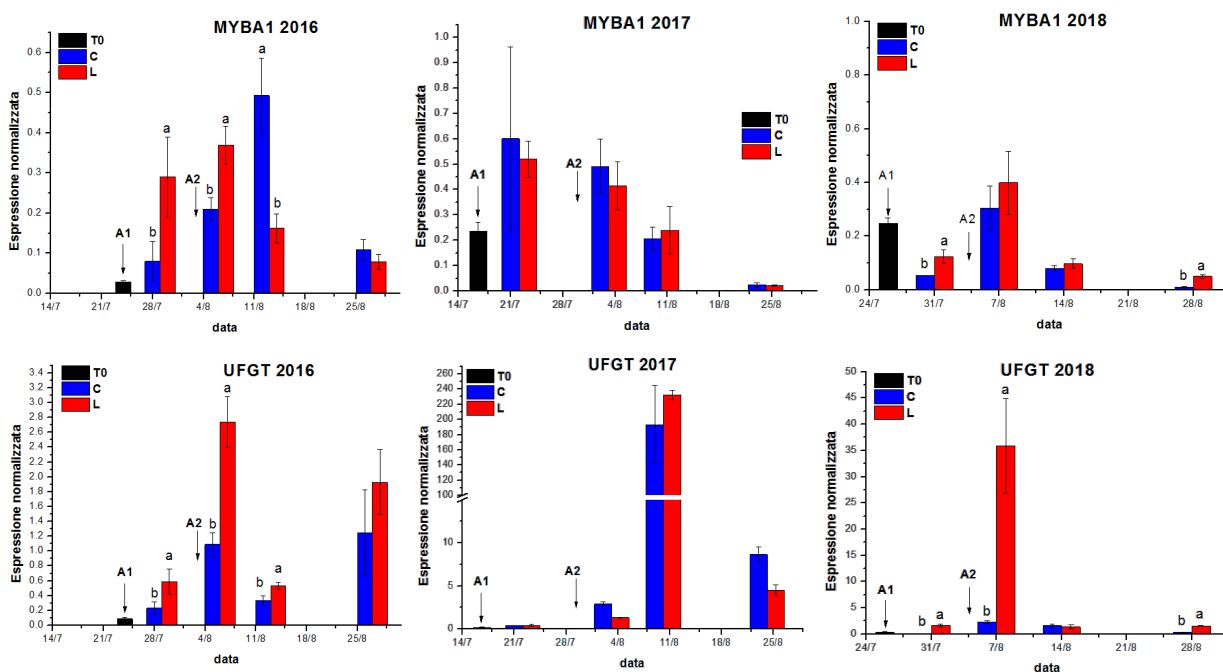


Fig. 3. Espressione normalizzata dei geni MYBA1 e UFGT in bacche C e L durante la maturazione in ciascun anno di prova. A1 e A2 corrispondono alle date dei trattamenti.

Le analisi molecolari sull'espressione dei geni responsabili della sintesi di antociani hanno permesso di evidenziare, nelle bacche trattate con il lievito inattivato, la presenza di una buona correlazione tra l'induzione di alcuni geni coinvolti nella biosintesi degli antociani e dei loro precursori e l'aumentato accumulo di tali composti. Viceversa, laddove non si è avuto alcun incremento nell'espressione genica rispetto al controllo, come verificatosi nel 2017 in seguito al perdurare di ondate di calore, non sono state riscontrate significative differenze tra controllo e trattato nemmeno nell'accumulo di antociani e si può presupporre che l'effetto negativo delle alte temperature abbia prevalso su quello positivo dell'elicitore.

Il meccanismo con cui gli elicitori agiscono nello stimolare l'espressione genica è ancora oggetto di studio, proprio perché è tipico di ogni elicitore, del dosaggio, dell'epoca del trattamento e della specie vegetale che viene trattata. In termini generali è stato dimostrato che l'applicazione di elicitori esogeni, sia di tipo biotico che abiotico, innesca nella pianta uno stress del tutto simile a quello che la pianta avverte in seguito all'attacco di un patogeno, che

può indurre l'espressione di geni, la produzione di metaboliti secondari e modifiche alla struttura delle proteine (Narayani e Srivastava 2017). I risultati di questa prova confermano che l'estratto di lievito applicato non ha influito in alcun modo sulla maturità tecnologica, ma è stato in grado di incrementare l'accumulo di antociani, senza alterarne la composizione, attraverso l'induzione dell'espressione dei geni coinvolti nella loro sintesi in quelle annate in cui si registrano picchi termici intorno ai 35 °C nel periodo di invaiatura. In caso di stagioni climaticamente anomale, caratterizzate invece da ondate di calore durature (5-7 giorni con temperature decisamente superiori a 35 °C) proprio in corrispondenza del trattamento, l'effetto termico pare prevalere, almeno in Sangiovese, su quello elicitorio...

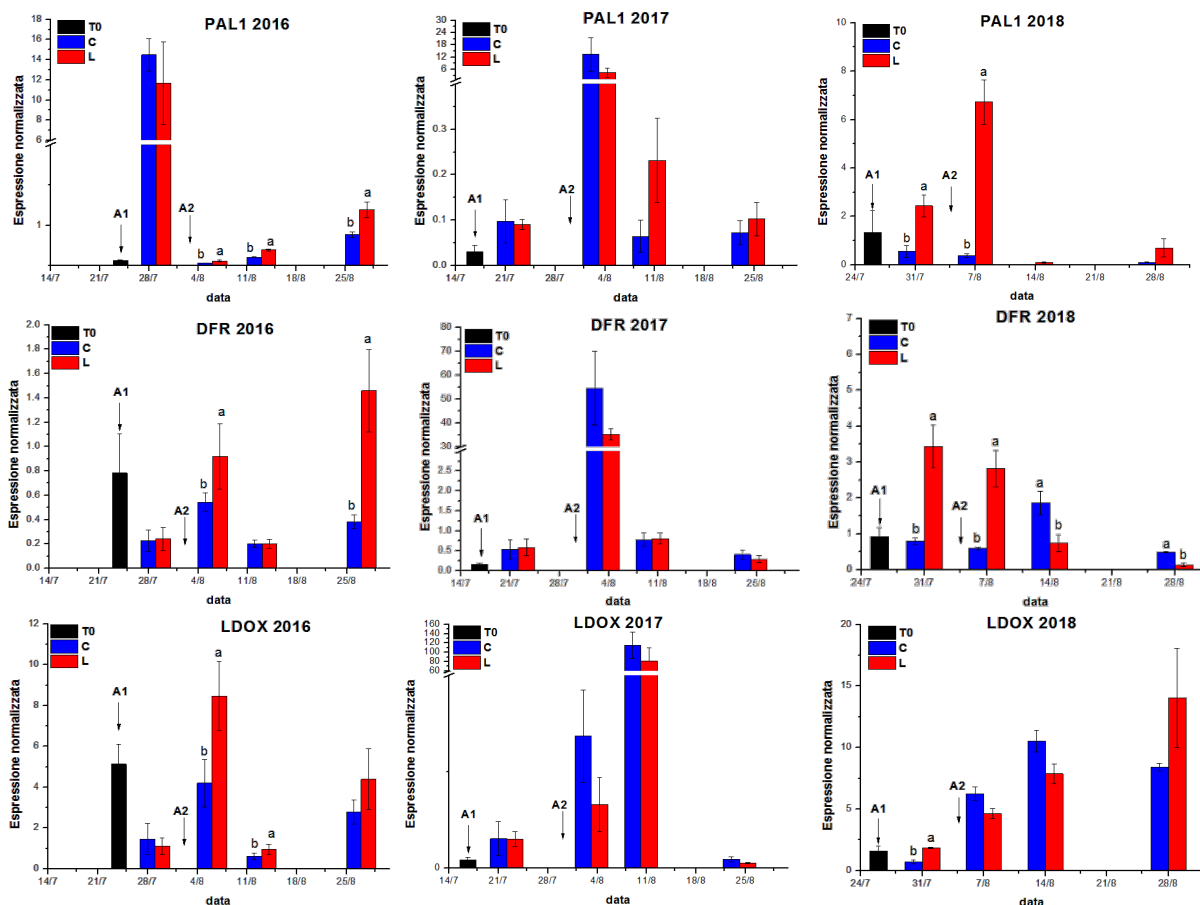


Fig. 4. Espressione normalizzata dei geni PAL1, DFR e LDOX in bacche C e L durante la maturazione in ciascun anno di prova. A1 e A2 corrispondono alle date dei trattamenti.

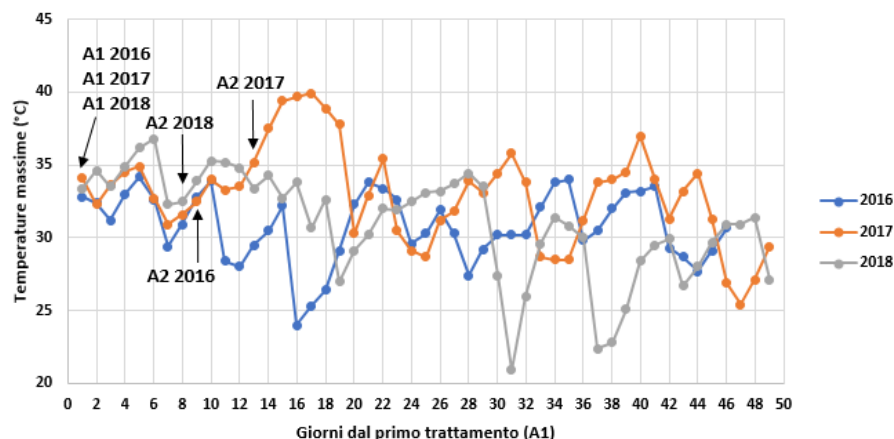


Fig. 5. Confronto dell'andamento delle temperature massime dell'aria nelle tre annate di prova a partire dalla prima applicazione del lievito inattivato (A1) fino alla data di raccolta. Per ogni anno A1 e A2 corrispondono alle date dei trattamenti.

Bibliografia

- Battista, F., Panighel, A., Flamini, R., Tomasi, D. (2016). L'uso di lieviti inattivati su vite migliora la qualità del vino. *L'informatore agrario* 22: 41-45.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., Mérillon, J. M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493–499. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.001>
- Bogs, J. (2005). Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves. *Plant Physiology*, 139(2), 652–663. <http://doi.org/10.1104/pp.105.064238>
- Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieux, F., Dorey, S., Cordelier, S. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4837–4846. <http://doi.org/10.1007/s11356-013-1841-4>
- Gómez-Plaza, E., Bautista-Ortín, A. B., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J. I., Gil-Muñoz, R. (2017). Effect of elicitors on the evolution of grape phenolic compounds during the ripening period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 977–983. <http://doi.org/10.1002/jsfa.7823>
- Goto-Yamamoto, N., Wan, G. H., Masaki, K., Kobayashi, S. (2002). Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Science*, 162(6), 867–872. [http://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00042-0](http://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00042-0)
- Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., Esaka, M. (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167(2), 247–252. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.021>
- Luciano, Á.-J., Irineo, T.-P., Rosalía Virginia, O.-V., Ana Angélica, F.-P., Andrés, C. H., Ramón Gerardo, G.-G. (2017). Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health; a Review. *International Journal of Agriculture and Biology*, (May). <http://doi.org/10.17957/IJAB/15.0297>
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grapes: flavonols and anthocyanins. *J Agric Food Chem*, 54, 7692–7702. <http://doi.org/10.1021/jf061538c>
- Movahed, N., Pastore, C., Cellini, A., Allegro, G., Valentini, G., Zenoni, S., ... Filippetti, I. (2016). The grapevine VviPrx31 peroxidase as a candidate gene involved in anthocyanin degradation in ripening berries under high temperature. *Journal of Plant Research*, 129(3), 513–526.
- Narayani, M., Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1227–1252. <http://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>
- Pastore, C., Santo, S. D., Zenoni, S., Movahed, N., Allegro, G., Valentini, G., ... Tornielli, G. B. (2017). Whole plant temperature manipulation affects flavonoid metabolism and the transcriptome of grapevine berries. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Pastore, C., Zenoni, S., Tornielli, G. B., Allegro, G., Dal Santo, S., Valentini, G., ... Filippetti, I. (2011).

- Increasing the source/sink ratio in *Vitis vinifera* (cv Sangiovese) induces extensive transcriptome reprogramming and modifies berry ripening. *BMC Genomics*, 12.
- Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chemistry*, 201, 213–221. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.086>
- Portu, J., Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., Garde-Cerdán, T. (2015). Methyl jasmonate foliar application to tempranillo vineyard improved grape and wine phenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(8), 2328–2337. <http://doi.org/10.1021/jf5060672>
- Rio Segade, S., Giacosa, S., Passignoni, M.A., Ossola, C., Gerbi, V., Suárez Martínez, C., Battista, F., Téllez Quemada, J., Vagnoli, P., Rolle, L. (2016). Influence of specific inactive dry yeast treatments during grape ripening on postharvest berry skin texture parameters and phenolic compounds extractability. *Macrowine*, 26-30/06/2016 Changins (Nyon, Vaud, Switzerland).
- Simon, P. (2003). Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 19(11), 1439–1440. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157>
- Tornielli, G. B., Movahed, N., Allegro, G., Pastore, C., Zenoni, S., Dal Santo, S., ... Valentini, G. (2017). Whole Plant Temperature Manipulation Affects Flavonoid Metabolism and the Transcriptome of Grapevine Berries. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.00929>
- Villangó, S., Pásti, G., Kállay, M., Leskó, A., Balga, I., Donkó, A., ... Zsófi, Z. (2015). Enhancing phenolic maturity of Syrah with the application of a new foliar spray. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 304–315.
- Villegas, D., Handford, M., Alcalde, J. A., Perez-Donoso, A. (2016). Exogenous application of pectin-derived oligosaccharides to grape berries modifies anthocyanin accumulation, composition and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 104(March), 125–133. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.020>