



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO



UNIVERSITÀ
DI TORINO



Università di Foggia



Università
degli Studi
di Palermo



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
FOGGIA MILANO PALERMO SASSARI TORINO

*Corso di Laurea Magistrale
Interateneo Internazionale in Scienze Viticole ed Enologiche*

Titolo

**Sviluppo e maturazione del frutto in vite:
caratterizzazione fisiologica e molecolare in diverse
condizioni di crescita**

Relatore

Pozzi Carlo Massimo

Correlatore

Zenoni Sara

Candidato

Aloisi Alessandro

Matricola 1037192

Anno Accademico 2022/2023

1. Introduzione

- 1.1. La pianta di vite: caratteristiche principali ed importanza economica
- 1.2. Sviluppo e maturazione del frutto
- 1.3. Fattori che influenzano il processo di maturazione
- 1.4. Cambiamenti climatici e implicazioni ad essi associati
- 1.5. Aspetti molecolari del processo di maturazione
- 1.6. Master regulators
 - 1.6.1. *bHLH*
 - 1.6.2. *WRKY*
 - 1.6.3. *NAC*
 - 1.6.4. *MADS box*
 - 1.6.5. Analisi del profilo d'espressione per i geni d'interesse

2. Scopo della tesi

3. Materiali e Metodi

- 3.1. Fruiting cuttings
- 3.2. Campionamento periodico degli acini in ambiente controllato e in pieno campo per le analisi molecolari
- 3.3. Campionamento periodico degli acini in ambiente controllato e in pieno campo per le analisi dei parametri di maturazione
- 3.4. Estrazione dell'RNA da bacca
- 3.5. Quantificazione ed analisi della qualità dell'RNA estratto
- 3.6. Analisi dell'integrità
- 3.7. Retrotrascrizione
 - 3.7.1. Trattamento con DNasi
 - 3.7.2. Sintesi cDNA
 - 3.7.3. Controllo dell'avvenuta retrotrascrizione
- 3.8. Real Time PCR (qPCR)

4. Risultati e Discussione

- 4.1. Monitoraggio ambientale delle condizioni riscontrate in pieno campo
- 4.2. Analisi fenotipica e determinazione dei parametri di maturazione del frutto nelle due condizioni di crescita
- 4.3. Analisi fenotipica
- 4.4. Determinazione dei parametri di maturazione
- 4.5. Valutazione del profilo di espressione dei geni selezionati nelle due condizioni di crescita
- 4.6. Quantificazione e valutazione della qualità dell'RNA estratto
- 4.7. Sintesi del cDNA e conferma dell'avvenuta retrotrascrizione
- 4.8. Analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR (qPCR)
 - 4.8.1. *VviNAC33*
 - 4.8.2. *VviSGR1*
 - 4.8.3. *VviNAC60*
 - 4.8.4. *VviBHLH75*
 - 4.8.5. *VviWRKY19*
 - 4.8.6. *VviAGLa15*

5. Conclusioni e prospettive future

6. Referenze

1. Introduzione

1.1. La vite: caratteristiche principali ed importanza economica

Il genere *Vitis*, all'interno della famiglia delle *Vitaceae*, è una liana e una pianta acrotona appartenente al genere *Vitis* (Einset & Pratt, 1975). Questo genere è suddiviso in due sottogeneri, *Muscadinea* ed *Euvitis*. Il sottogenere *Euvitis* include la maggior parte delle specie di *Vitis*, tra cui *Vitis vinifera* L. (utilizzata per la produzione di uva da tavola e da vino) e le specie americane (*Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitis labrusca*, *Vitis aestivalis*, *Vitis cinerea*), che vengono impiegate come portinnesti e fonti di resistenza alle malattie. La vite (*Vitis vinifera* L.) è una pianta arborea pluriennale appartenente alla famiglia delle *Vitaceae*, la cui coltivazione risulta alla base dell'economia in molte regioni del mondo (Mullins et al., 1992). Terza al mondo tra le specie più coltivate, essa rappresenta un mercato complessivo che nel 2016 è stato valutato attorno ai 68 miliardi di dollari. Come detto, molti sono i paesi che possono contare su un'economia fortemente influenzata dalla coltivazione di tale pianta, dove a livello mondiale il 68% delle coltivazioni è destinata alla produzione di uva da vino, il 20% per uva da tavola, l'11% per uva da essiccare e l'1% per la produzione di succhi e prodotti industriali. Oltre al valore di mercato dei prodotti ottenuti dalla vigna, anche l'occupazione mondiale dei terreni agricoli è indice dell'importanza della coltivazione della vite tanto è vero che la dimensione del vigneto mondiale (indipendentemente dalla destinazione d'uso finale delle uve e comprese le vigne non ancora in produzione) si attestava essere, nel 2018, pari ai 7,4 milioni di ettari, ovvero un dato in leggera crescita rispetto agli anni precedenti (OIV, 2019). Nello specifico, essa è una specie caducifoglie, che entra in riposo vegetativo durante la stagione fredda e che riprende la crescita vegetativa in primavera e nei periodi estivi. Complessivamente, la pianta ha un ciclo biologico della durata di circa 40 anni, in cui però, per i primi tre anni, non è produttiva; il periodo più importante per quanto riguarda la resa, invece, è compreso dal quinto al venticinquesimo anno del ciclo (Mullins et al., 1992). La vite rientra nella categoria delle piante rampicanti: infatti essa cresce in altezza interagendo con dei sostegni mediante particolari strutture definite in botanica come viticci. In generale, questa pianta presenta radici fittonate costituite da numerose ramificazioni laterali, che possono raggiungere i sei metri di profondità. L'apparato epigeo, al contrario, non è caratterizzato quasi mai da grandi dimensioni ma è formato da una serie di organi specifici: il pedale (regione basale del fusto), il tronco (regione

mediana del fusto), le branche (rami di alcuni anni che si originano dal fusto), i tralci (rami di anno che si originano dalle branche) e i germogli (rami erbacei dell'annata in corso) (Mullins et al., 1992).

1.2. Sviluppo e maturazione del frutto

Il ciclo riproduttivo di tale pianta è biennale e si basa sulla ripresa vegetativa delle gemme dormienti sviluppatesi nella stagione precedente, dove si formeranno i germogli primaverili da cui si andranno, poi, ad originare i grappoli. Per quanto riguarda la differenziazione a fiore, essa avviene scalarmente iniziando in tarda primavera e si conclude nella primavera successiva, con un arresto al sopraggiungere dell'autunno. Col tempo, dunque, i germogli originatesi aumentano di dimensioni fino alla formazione dei grappoli differenziati. La fioritura vera e propria avviene più tardi, a partire dal distacco della corolla e il raddrizzamento degli stami. I fiori che si sviluppano sono di per sé molto piccoli, di colore verdastro e raggruppati in infiorescenze a racemo. Segue, poi, il processo di impollinazione e di fecondazione. Nelle varietà coltivate viene sfruttato il fatto che quest'ultime presentano solitamente fiori ermafroditi, caratterizzati, quindi, dal fenomeno dell'autofecondazione (Mullins et al., 1992). Dopo queste due fasi, segue l'allegagione, un processo molto importante per il corretto sviluppo dei frutti. Infatti, questa fase si sovrappone alla fioritura e ha inizio, a seconda dei vitigni e della zona, in un periodo che di norma si estende dalla fine di maggio alla seconda decade di giugno. Dopo l'allegagione, inizia il vero e proprio processo di sviluppo e accrescimento dei frutti, ossia la fase più importante nel ciclo di crescita annuale della vite. Nello specifico, questo processo può essere rappresentato da un modello di crescita riassumibile in una doppia curva sigmoideale, al termine della quale si ha solitamente la raccolta degli acini maturi ((Conde et al., 2007); (Kennedy, 2002)).

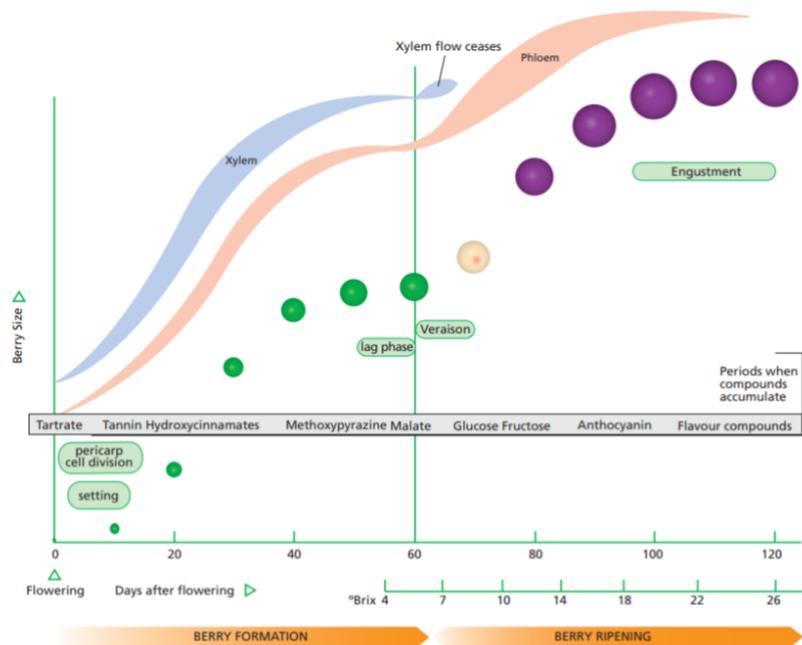


Figura 1: Rappresentazione delle fasi di crescita e maturazione del frutto di vite; si evidenzia la doppia curva sigmoideale (Conde et al., 2007).

Il processo di sviluppo e maturazione si suddivide, dunque, in una prima fase, in cui vi è un incremento della velocità alla quale avvengono le divisioni cellulari, portando ad un notevole aumento del numero di cellule presenti. Nella seconda fase avviene un marcato accrescimento delle cellule già presenti. Infatti, durante questo stadio avviene, la concreta formazione degli acini, associata alla produzione dei vinaccioli e l'accumulo di importanti soluti essenziali per il processo. Come si può vedere dalla fig. 1, questa importante prima fase è poi seguita da uno stadio di latenza in cui l'accrescimento è notevolmente rallentato e quasi assente. Dopo questo periodo, avviene un'ulteriore fase di crescita, la quale è associabile formalmente al vero e proprio processo di maturazione. Quest'ultima ha inizio per le varietà a bacca rossa con la cosiddetta *veraison* una parola francese utilizzata per indicare il viraggio di colore assunto dagli acini, quando essi entrano in questa fase di sviluppo. In generale, durante questa seconda fase viene quindi ripresa la crescita degli acini e, come nello stadio precedente, vi è anche qui una marcata rimodulazione della composizione interna dei soluti: dal momento della *veraison* alla raccolta, si assiste ad un raddoppio delle dimensioni e i principali prodotti assimilati nella prima fase di crescita (acido malico, tannini e composti aromatici) vengono significativamente ridotti e sostituiti con altri soluti, tra i quali sono presenti zuccheri, specialmente fruttosio e glucosio, ma anche altri soluti importanti per l'impiego finale degli acini, quali gli antociani.

1.3. Fattori che influenzano il processo di maturazione

Si assiste, quindi, ad un complesso processo di accrescimento e sviluppo che si è visto essere controllato non solo da numerosi fattori endogeni, ma anche da molteplici fattori ambientali, tra cui spicca l'incidenza della radiazione solare, la temperatura, la disponibilità di nutrienti inorganici e acqua ((Jackson, 2014);(Kuhn et al., 2014)). I primi importanti studi si sono concentrati principalmente sul controllo del processo da parte del complesso sistema ormonale degli apparati vegetali, tra cui sono emerse importanti evidenze legate al ruolo dell'etilene, dell'acido abscissico e dei brassinosteroidi ((Conde et al., 2007);(Fortes et al., 2015)). In aggiunta, l'intero processo di sviluppo e maturazione si è visto essere fortemente influenzato dai principali parametri ambientali, tra cui ad esempio l'esposizione alla radiazione solare, che si è vista essere alla base della regolazione della biosintesi di flavonoidi e di antocianine ((Jackson, 2014);(Kuhn et al., 2014)). Importante risulta, poi, la temperatura sia per quanto riguarda l'inizio del processo di sviluppo, sia per quanto riguarda la qualità del prodotto finale (Kuhn et al., 2014). Come già detto, anche la disponibilità di nutrienti inorganici e acqua risulta un parametro importante nella regolazione del processo. Quello che è emerso è che, a seconda della fase di sviluppo, una carenza o un incremento della disponibilità di uno dei due fattori riesce a caratterizzare il processo verso un determinato andamento: ad esempio, si è evidenziato che una moderata carenza d'acqua nel momento successivo alla *veraison* è associabile ad una maggiore qualità del prodotto finale, riuscendo ad incrementare la quantità di antocianine presenti e limitando l'accrescimento del frutto, ma allo stesso tempo, però, il tutto andrebbe anche ad incrementare la produzione di zuccheri e stilbenoidi (Jackson, 2014). Per quanto riguarda, invece, la disponibilità di nutrienti, è emerso che una limitata disponibilità di azoto e fosforo nel terreno portano, in generale, ad un incremento sostanziale in antocianine contenute negli acini, mentre alti livelli di potassio riescono ad incrementare il pH della composizione interna degli acini e limitare la colorazione finale del vino (Jackson, 2014). Il processo è, quindi, profondamente influenzato dalle condizioni ambientali a cui le piante sono esposte e, in questo modo, ciò porta a conferire al prodotto finale particolari qualità, che sono, dunque, associabili alle specifiche condizioni di crescita, permettendo, così, di ottenere prodotti diversi dalla coltivazione della medesima pianta in territori differenti ((Dai et al., 2011);(Keller, 2010)). Non a caso in viticoltura viene spesso utilizzato il termine *terroir* proprio per indicare questa combinazione tra i vari fattori naturali come il clima, l'altitudine, l'esposizione al sole, le caratteristiche del terreno, che insieme alle tecniche di coltivazione e produzione riescono ad influenzare la composizione finale degli acini e, di conseguenza, anche la qualità del vino ottenuto (White et al., 2009). La vite è per

questo considerata una delle specie coltivate più sensibili alle condizioni ambientali a cui è esposta (Hannah et al., 2013), riuscendo a generare da un singolo genotipo, caratterizzato da una marcata plasticità, molteplici fenotipi quando questo risultata essere sottoposto a differenti stimoli ambientali ((Bradshaw, 1965); (Sultan, 2000)). Se da un punto di vista vinicolo questo può essere considerato un sostanziale svantaggio che rende incerto il raccolto annuale (Clingeffer, 2010), dall'altro lato offre la possibilità di ricavare diversi tipi di prodotti finali a partire dalla stessa varietà, associando a questo un importante ruolo all'adattamento fisiologico della pianta ((Dai et al., 2011); (Shaw et al., 2014)). Negli anni, quindi, si è capito che tutto ciò che viene ritenuto tipico di un vino non è di per sé legato esclusivamente alla tipologia di cultivar impiegata e alle tecniche di coltivazione messe in atto, ma risulta anche un'espressione strettamente correlata alla combinazione di vari fattori racchiusi proprio nel termine *terroir* (Van Leeuwen et al., 2004).

1.4. Cambiamenti climatici e loro implicazioni

Comprendere le implicazioni legate all'adattamento della pianta ai differenti ambienti di crescita risulta dunque essenziale per capire al meglio l'intero processo di sviluppo e maturazione dei frutti. In uno scenario in cui i cambiamenti climatici risultano essere sempre più visibili, tale concetto risulta utile quindi per trovare delle soluzioni efficaci. Gli effetti ad essi associati sono ormai da alcuni anni già tangibili: il 2019 è stato, a livello globale, il secondo anno più caldo dal 1880, portando ad avere un incremento della temperatura generale di +1,1 °C rispetto all'era preindustriale. Nello specifico, in Italia nel 2019, la temperatura è aumentata di circa 2 °C, ovvero il doppio rispetto all'aumento globale registrato e in futuro, secondo molti studi, essa potrebbe ulteriormente aumentare di altri 2 °C, questa volta in soli quarant'anni, a causa di una marcata accelerazione del *Global Warming* già in atto (Izzo, 2020). Infatti, tali previsioni si basano sul presupposto che vi sarà un marcato aumento della concentrazione di CO₂ atmosferica, che si prevede raggiungerà le 600 ppm entro la fine del 21° secolo (IPCC, 2007). Le ripercussioni sono e saranno generalizzate, ma quello che si prevede è che, più che in altri settori, quello dell'agricoltura risulterà maggiormente colpito, soprattutto nei casi in cui le specie coltivate risultino fortemente sensibili alle condizioni ambientali presenti. Questo si riscontra specialmente nelle medie e alte latitudini, in cui la vegetazione e le coltivazioni risultano caratterizzate da un periodo di dormienza invernale e da un periodo di crescita durante le stagioni più calde. Ciò conferisce al fattore temperatura una forte influenza nell'andamento delle varie fasi fenologiche delle specie vegetali. Le aspettative relative all'andamento delle fasi fenologiche nella vite prevedono il manifestarsi di stagioni di crescita

sempre più brevi, associate ad un inizio anticipato, e di una durata più corta delle varie fasi di sviluppo e di maturazione dei frutti, con problematiche associate alla qualità e alla quantità del prodotto finale ottenibile portando ingenti e frequenti perdite economiche. Nello specifico per quanto riguarda la pianta di vite, si assiste ad una durata della fioritura inferiore al previsto e successivamente ad una vendemmia anticipata anche di due o tre settimane, ottenendo grappoli che non giungono alla corretta maturazione fisiologica, tecnologica e fenolica. In aggiunta, emerge anche il fatto che l'impatto del cambiamento climatico non sarà generale, ma varierà a seconda della regione specifica e del suo microclima associato (Alikadic et al., 2019). Quindi, come detto precedentemente, la variazione del ciclo fenologico delle piante, specialmente per quelle maggiormente sensibili all'ambiente di crescita, porterà non solo ad una modificazione nella capacità di produrre costantemente frutti, ma, nella maggior parte dei casi, causerà anche una progressiva perdita di qualità di quest'ultimi (Fraga et al., 2013). Questo accade specialmente nella pianta di vite, dove, a livello molecolare, si è visto che l'esposizione alle alte temperature previste porterà ad avere una sempre più marcata inibizione nella formazione degli antociani. Altra conseguenza sarà una maggiore volatilizzazione dei composti aromatici, che, specialmente nelle varietà a bacca rossa, risultano alla base della qualità del prodotto finale. Inoltre, modificando temporalmente i vari stadi fenologici, quello che emerge prepotentemente è che le condizioni a cui avvenivano precedentemente i processi verranno progressivamente stravolte, promuovendo un differente andamento degli eventi biochimici e molecolari, solitamente caratterizzanti un determinato *stage* (Keller, 2010). Un altro aspetto rilevante legato alle future previsioni include che, oltre all'aumento generale delle temperature e alla conseguente diminuzione delle precipitazioni, vi sarà una marcata variazione a livello della distribuzione mondiale del mercato agricolo, provocando evidenti ripercussioni specialmente in quelle regioni che basano la propria economia sul comparto agricolo. Infatti, in relazione alla viticoltura, si immagina che un gran numero di regioni notoriamente centrali nella produzione di vino perderanno, a lungo andare, la loro notorietà rispetto ad altre regioni, che al momento non risultano tradizionalmente adatte alla viticoltura. A tal proposito, importanti aziende hanno già iniziato a muoversi in questa direzione, cercando nuove zone di produzione, che, però, rispetto ai tentativi precedenti, non sono posizionate nelle regioni limitrofe a quelle già coltivate e vitate. Un esempio è, infatti, rappresentato dalle importanti cantine dello Champagne, che hanno ampliato l'area dedicata alla coltivazione di *Pinot Nero*, *Pinot Meunier* e *Chardonnay* fino al Sud dell'Inghilterra, con l'obiettivo di ritrovare il clima caratteristico del Nord della Francia degli anni '70 (Izzo, 2020). Le previsioni future suggeriscono che il Sud dell'Inghilterra

avrà presto il clima della Francia settentrionale, e sarà favorevole, quindi, ad un eventuale produzione vitivinicola (Izzo, 2020). Un'altra conseguenza non trascurabile è poi legata alle progressive carenze idriche che si presenteranno in molteplici zone del pianeta, limitando così la disponibilità di territori fertili in agricoltura. Per quanto riguarda la vite, nel passato, l'irrigazione delle piante era solitamente non necessaria, ma già al giorno d'oggi risulta in moltissimi casi prevista ed essenziale, sinonimo concreto, dunque, dei cambiamenti climatici presenti. Tuttavia, però, tale intervento non risulta sempre sostenibile, soprattutto perché, in molte zone dove sarebbe necessario, l'acqua non è in realtà disponibile. In molti casi, quindi, l'irrigazione non dovrebbe e non può essere considerata la prima opzione per risolvere l'aumento diffuso del deficit idrico a cui le piante di vite, storicamente resistenti alla siccità, sono e saranno sottoposte. Per far fronte a tali problematiche, la ricerca ha estrapolato alcune possibili soluzioni: tra esse spicca la possibilità di andare a mitigare l'effetto delle future carenze idriche, impiegando nuovi portainnesti che, grazie alle loro caratteristiche, riuscirebbero ad ottimizzare l'uso complessivo dell'acqua a disposizione della pianta. Da alcuni studi, emerge, infatti, che tali "portainnesti M", grazie ad un utilizzo biochimico efficiente dell'acqua, porterebbero ad avere un risparmio generale del 25-30% rispetto ai portainnesti tradizionali, generando, a parità di condizioni ambientali e di produzione, un marcato impatto in termini economici e di sostenibilità (Izzo, 2020). In relazione a quanto detto, chiunque dovrà lavorare nel comparto agroalimentare in futuro sarà soggetto a nuove e importanti sfide, che non saranno, però, semplicemente legate alla protezione dai danni da surriscaldamento o alla promozione di un ritardo voluto nella maturazione, ma anche all'affrontare i conseguenti cambiamenti della fertilità dei suoli e dei cicli alterati di alcuni patogeni (Poni, 2011). Dati questi imminenti cambiamenti, è dunque necessario implementare le conoscenze dei vari processi in atto e, soprattutto, provare a ipotizzare tutti i possibili scenari futuri, dai più drastici ai più miti, servendosi dei molteplici mezzi e delle conoscenze ora a nostra disposizione. All'interno di tale contesto, un ruolo di primo piano è svolto proprio dalle biotecnologie, che, in collaborazione con gli enti di produzione, potrebbero prevenire e limitare i possibili effetti derivanti dai vari cambiamenti climatici in atto. L'obiettivo è, dunque, implementare le conoscenze non solo a livello delle tecnologie agricole, ma anche a livello molecolare, cercando di selezionare tutte quelle varietà più affini a sopportare le future avversità e soprattutto per provare a intervenire specificatamente sulle cultivar comunemente impiegate, attraverso innovative tecniche molecolari. Comprendere come avviene il processo di sviluppo dei frutti a livello molecolare è, quindi, alla base dei prossimi

interventi dell'uomo nei processi agricoli, dove ormai le alternative tra i vari sistemi di coltivazione hanno raggiunto una saturazione o risultano quasi inefficaci.

1.5. Aspetti molecolari del processo di maturazione

Come descritto precedentemente, una delle possibili soluzioni in risposta ai previsti cambiamenti del clima, può arrivare dall'interpretazione a livello molecolare dei principali processi di sviluppo e maturazione. In relazione alla vite, vista anche la sua notevole importanza nell'economia di molti paesi, numerosi sono stati gli studi che si sono interessati a questa tematica, soprattutto in seguito al recente sequenziamento dell'intero genoma di vite (Jaillon et al., 2007). Uno degli studi principali, ha permesso di generare un atlante completo dell'espressione genica globale nella vite relativamente alle molteplici fasi di sviluppo dei diversi organi e tessuti, incluso il frutto (Fasoli et al., 2012). Questa analisi è stata effettuata su 54 diversi campioni di *Vitis vinifera* cv Corvina che rappresentano organi e tessuti verdi e maturi in diversi stadi di sviluppo utilizzando un microarray completo del genoma della vite. Questa ricerca ha rivelato una chiara distinzione tra i trascrittomi del campione verde/vegetativo e legnoso/maturo, suggerendo un cambiamento fondamentale nell'espressione genica globale quando la pianta passa dal programma di sviluppo immaturo a quello maturo. Tali risultati indicano l'esistenza di specifici geni regolatori. L'identificazione dei geni chiave coinvolti nella riprogrammazione profonda del trascrittoma che si verifica nella vite è stata effettuata utilizzando un'analisi del gene network (Palumbo et al., 2014). Utilizzando i geni espressi in modo differenziale tra organi legnosi/maturi e organi vegetativi/verdi, è stata generata una rete di co-espressione. Sono state analizzate le proprietà topologiche specifiche della rete di co-espressione e un sottoinsieme di 113 geni è stato classificato come geni *switch*. Questi geni *switch* (interruttori) dell'atlante globale dell'espressione genica si esprimono ad un livello basso nei tessuti vegetativi/verdi ma a livelli significativamente più alti negli organi maturi/legnosi, suggerendo che partecipano alla regolazione della transizione dallo sviluppo immaturo a quello maturo. Tra queste, le categorie funzionali sovra-rappresentate sono il metabolismo secondario, il processo metabolico dei carboidrati e l'attività dei fattori di trascrizione. Per quanto riguarda i fattori di trascrizione, sono stati identificati due LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN, due NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEINS e molte ZINC FINGER.

Successivamente, per validare maggiormente le informazioni riguardanti il processo di sviluppo del frutto, è stato condotto un altro importante studio, il quale ha focalizzato la propria analisi su 10

varietà differenti, 5 a bacca rossa e 5 a bacca bianca (Massonnet et al., 2017). Tali campioni sono stati analizzati nei differenti stati di sviluppo e, in questo caso, l'espressione genica è stata analizzata utilizzando un approccio basato su RNA-seq. Nello specifico, sono stati individuati 1.824 geni con espressione differenziale significativa, di cui 1.464 down-regolati e 360 up-regolati dopo l'invasatura nelle bacche bianche, confermando che il passaggio alla fase di maturazione comporta principalmente la soppressione dell'espressione genica con solo alcuni geni che vengono attivati ((Massonnet et al., 2017);(Palumbo et al., 2014)). I risultati hanno quindi permesso di identificare specifici geni *switch*: 190 per le varietà a bacca rossa e 212 per quelle a bacca bianca. Inoltre, il confronto dei geni *switch* nelle varietà bianche e rosse ha evidenziato la condivisione di 131 geni *switch* tra tutte le varietà considerate, inclusi 19 geni che codificano per fattori di trascrizione di diverse famiglie (fig.2), i quali possono rappresentare i principali regolatori della transizione evolutiva dalla fase erbacea alla fase di maturazione (Massonnet et al., 2017).

Figura 2: Geni codificanti fattori di trascrizione identificati come geni *switch* (Massonnet et al., 2017). Da sinistra a destra sono menzionati il codice del gene presente in banca dati, la famiglia dei fattori di trascrizione d' appartenenza e la sigla.

<i>GENE_ID</i>	<i>GENE_description</i>	<i>GENE_Name</i>
VIT_17s000g00430	basic helix-loop-helix (bHLH) family	bHLH075
VIT_15s004g00150	DOF affecting germination 1	DAG1
VIT_06s004g07790	Lateral organ boundaries domain 15	
VIT_03s0091g00670	Lateral organ boundaries protein 38	
VIT_13s0158g00100	putative MADS-box Agamous-like 15a	VvAGL15a
VIT_07s0031g01930	myb TK11 (TSL-KINASE INTERACTING PROTEIN 1)	
VIT_02s0033g00380	R2R3MYB transcription factor	VvMybA2 (C-term)
VIT_02s0033g00390	R2R3MYB transcription factor	VvMybA2
VIT_02s0033g00450	R2R3MYB transcription factor	VvMybA3
VIT_14s0108g01070	NAC domain-containing protein	VvNAC11
VIT_02s0012g01040	NAC domain-containing protein	VvNAC13
VIT_19s0027g00230	NAC domain-containing protein	VvNAC33
VIT_08s0007g07670	NAC domain-containing protein	VvNAC60
VIT_07s0005g01710	WRKY Transcription Factor	VvWRKY19
VIT_05s0020g04730	Zinc finger (C3HC4-type ring finger)	
VIT_08s0040g01950	Zinc finger (C3HC4-type ring finger)	
VIT_18s0001g01060	Zinc finger (C3HC4-type ring finger)	
VIT_03s0091g00260	Zinc finger protein 4	

Tale denominazione deriva dal fatto che la loro espressione specifica è relativamente bassa durante le fasi vegetative e immature, per poi incrementare notevolmente in seguito al passaggio verso gli

stadi riguardanti la maturazione, suggerendone il loro coinvolgimento nella transizione tra questi stadi. Tra questi sono emersi importanti geni a livello del metabolismo dei carboidrati e della parete vegetale e di quello secondario, oltre a numerosi fattori di trascrizione. Tra quest'ultimi, sono stati identificati: 1 *MADS-box*, 3 *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN*, 4 *NAC domain-containing proteins*, 3 geni *MYBA*, 3 geni *WRKY*, 3 geni *bHLH* ed infine molte *ZINC FINGER proteins* (Massonnet et al., 2017). La costante presenza dei fattori di trascrizione all'interno di questi cluster potrebbe indicare l'esistenza di specifiche gerarchie nelle regolazioni trascrizionali, che controllerebbero i vari processi di sviluppo e maturazione dei frutti. Al fine, poi, di incrementare ulteriormente le conoscenze molecolari e meglio interpretare i complessi meccanismi di regolazione della maturazione del frutto, un ulteriore studio ha analizzato i profili trascrittomici della bacca d'uva a diversi stadi di sviluppo di due differenti cultivar, utilizzando di nuovo un approccio di RNA-seq (Fasoli et al., 2018).

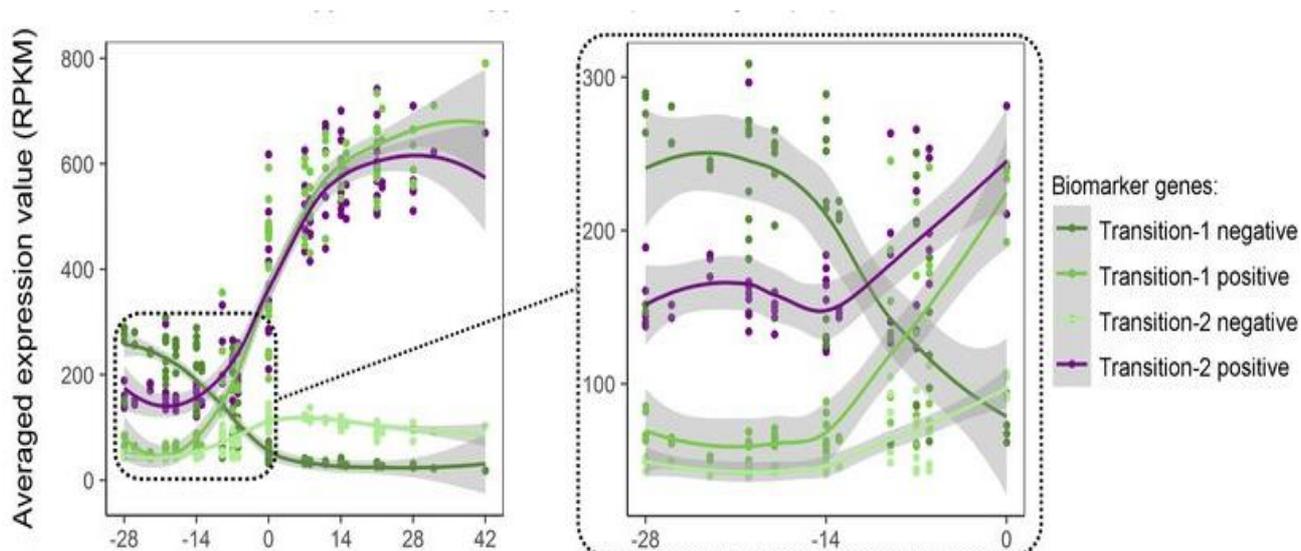


Figura 3: Transizioni molecolari evidenziate durante l'intero processo di sviluppo (immagine di sinistra) e specificatamente durante la fase precedente la veraison (immagine a destra) (Fasoli et al., 2018). Si nota la presenza di due coppie di transizioni: una positiva ed una negativa. Si può apprezzare come l'espressione di alcuni geni sia già elevata 14 giorni pre-invaiaitura per poi calare successivamente (transizione negativa). Altri geni invece mostrano un valore d'espressione più basso 14 giorni pre-invaiaitura che però aumenta con il progredire della maturazione (transizione positiva). In verde scuro è definita la transizione 1 negativa, in verde la transizione 1 positiva, in verde chiaro la transizione 2 negativa ed in viola la transizione 2 positiva.

In generale è emerso che, durante il progressivo sviluppo del frutto, i trascritti analizzati si distinguono in 4 differenti classi: geni che si esprimono prima della *veraison* (Classe 1), geni che si esprimono durante la *veraison*/prima metà della fase di maturazione (classe 2 e classe 3) ed infine geni che si esprimono nelle fasi finali della maturazione (classe 4). Si è visto, infatti, che l'espressione

relativa ai geni appartenenti al primo gruppo, decresce rapidamente con il procedere del processo di sviluppo, mentre i geni appartenenti al gruppo 2 e 3 mostrano in generale un picco corrispondente alla fase della *veraison*, per poi diminuire gradualmente nella seconda parte del processo. I geni appartenenti alla quarta classe, infine, mostrano un incremento nella loro espressione che caratterizza le ultime fasi di maturazione del frutto. In aggiunta, il meccanismo alla base della transizione tra la fase di latenza e la successiva fase di maturazione, è stato ulteriormente analizzato, focalizzando le analisi sul trascrittoma relativo alla fase della *veraison* (*pre-veraison*, *veraison*, *post-veraison*). I risultati hanno evidenziato come tale fase potrebbe essere caratterizzata da due transizioni molecolari *back-to-back*, le quali iniziano in generale 14 giorni prima della *veraison*, come si nota dalla figura 3. Ogni transizione contiene marcatori molecolari positivi e negativi; i marcatori negativi della transizione 1 hanno mostrato un livello di espressione molto basso mentre i marcatori negativi della transizione 2 hanno mostrato un andamento più complesso con un piccolo aumento iniziale dell'espressione fino all'invasatura seguito da un leggerissimo calo successivo. In effetti, i marcatori positivi delle transizioni 1 e 2 hanno mostrato un'espressione simile verso l'alto, ma differivano durante la fase di pre-invasatura. I marcatori positivi della transizione 1 sono attivi a livelli di espressione molto bassi, ma sono stati caratterizzati da una forte induzione 14 giorni prima dell'invasatura e il loro valore medio di espressione è raddoppiato in meno di 1 settimana. Al contrario, i marcatori positivi della transizione 2 sono attivi con un livello di espressione più elevato, ma la loro sovra-regolazione 14 giorni prima dell'invasatura avviene a un ritmo più lento rispetto ai marcatori positivi della transizione 1. Tali risultati potrebbero quindi indicare che il primo cluster di geni sia in grado di attivare il secondo cluster, riuscendo così in successione a regolare l'intero andamento del processo di maturazione. Inoltre, come detto anche inizialmente per i *geni switch*, la maggior parte dei regolatori positivi di entrambe le transizioni appartiene a specifiche categorie funzionali, quali la risposta al sistema ormonale, il metabolismo legato ai componenti di parete, il metabolismo secondario e l'attività di fattori di trascrizione, una delle categorie più rappresentate. I risultati permettono quindi di associare a quest'ultima categoria una forte influenza nella regolazione della transizione da fase immatura a quella matura, evidenziando il loro importante ruolo nella maturazione sia nelle uve a bacca rossa che nelle uve a bacca bianca e promuovendo l'importanza di una maggiore caratterizzazione per via della loro evidente centralità.

Inoltre, con l'obiettivo di andare a valutare la plasticità fenotipica della vite in relazione all'ambiente di crescita, un ulteriore studio è stato intrapreso confrontando per due annate successive, i

trascrittomi degli acini derivanti da due diverse varietà coltivate in tre ambienti di crescita differenti (Dal Santo et al., 2018). Le varietà in questione erano Cabernet Sauvignon e Sangiovese, coltivate rispettivamente in tre ambienti diversi quali Bolgheri, Montalcino e Riccione. L'analisi si è quindi svolta impiegando specifici microarray rappresentativi dell'intero genoma di vite: i risultati sono stati successivamente elaborati mediante un complesso metodo statistico in grado di *clusterizzare* tutti quei geni che mostravano un'espressione influenzata in egual modo dall'andamento delle fasi fenologiche della pianta, dai differenti ambienti di crescita, dalle differenti annate o risultavano tipici per ognuna delle due cultivar. Grazie a questo lavoro, si è ora in grado di analizzare l'influenza relativa di ognuno di questi quattro parametri sopracitati sull'espressione di ogni gene della vite durante il processo di sviluppo del frutto. Dai risultati emerge una differenza nella plasticità trascrittomica tra i due genotipi in risposta all'ambiente. Le interazioni GxE (genoma per ambiente) sono diventate predominanti durante la maturazione dei frutti, in particolare negli acini di Sangiovese. Le caratteristiche delle bacche di Cabernet Sauvignon erano meno dipendenti dalle condizioni di crescita e, di conseguenza, il trascrittoma rimaneva più stabile nelle annate e nei luoghi, suggerendo che la plasticità limitata potrebbe sostenere il successo di questa cultivar in molte parti diverse del mondo. I portinnesti possono avere un impatto significativo sull'interazione tra pianta e ambiente, tuttavia si è osservata una maggiore stabilità del trascrittoma nel Cabernet Sauvignon in luoghi diversi rispetto al Sangiovese. In conclusione, in primo luogo, la plasticità trascrittomica degli acini che rappresentano diverse località e annate è sostenuta da un'ampia riprogrammazione trascrizionale. In secondo luogo, la diversità all'interno della cultivar può modulare l'espressione genica in risposta a stimoli ambientali. In terzo luogo, la posizione del vigneto ha un impatto minore sull'entità dell'interazione GxE (genoma per ambiente) negli acini, ma gioca un ruolo importante nel determinare le prestazioni di ciascun genotipo migliorando tratti qualitativi come l'accumulo di metaboliti secondari legati all'aroma e al colore del vino. Tutto questo ha quindi permesso, anche a livello molecolare, di approfondire il concetto utilizzato in viticoltura di *Terroir*, mostrando come vi siano all'interno del genoma di vite una moltitudine di geni la cui espressione risulta essere fortemente legata ai parametri ambientali e territoriali, provocando, in questo modo, una forte variabilità fenotipica legata alle interazioni con l'ambiente esterno.

1.6. Master regulators

Ponendo l'attenzione sui geni *switch*, precedentemente citati, all'interno di questi troviamo alcune famiglie di fattori di trascrizione, le quali risultano essere di fondamentale importanza durante le fasi pre e post invaiatura e le transizioni metaboliche ad essa associate. Tra queste troviamo i geni *WRKY*, *bHLH*, *NAC* e *AGL*.

1.6.1. bHLH

La famiglia dei fattori di trascrizione *bHLH* è una delle più importanti nelle piante e svolge un ruolo vitale in complessi processi fisiologici (Murre et al., 1989). Il dominio *bHLH* comprende circa 60 aminoacidi. La prima parte comprende principalmente 13-17 aminoacidi, i residui N-terminali basici. Il secondo componente, il dominio HLH, è composto principalmente da una regione elica-ansa-elica di circa 40 aminoacidi idrofobici chiamata C-terminale, che consente alle proteine *bHLH* di formare dimeri omologhi o isomerici (Atchley et al., 1999). In base alle caratteristiche di legame al DNA e di sviluppo delle proteine *bHLH*, queste possono essere divise in sei gruppi: A, B, C, D, E e F (Ledent & Vervoort, 2001); ci sono differenze specifiche nelle sequenze dei domini centrali nei diversi gruppi ((Dang et al., 1992); (Phillips, 1994); (Crozatier et al., 1996); (Crews, 1998); (Fisher & Caudy, 1998);(Ledent & Vervoort, 2001); (Dang et al., 2011); (Hardin, 2004)).

(Honkanen et al., 2018) hanno scoperto che il fattore di trascrizione *bHLH* codificato dal gene simile a RSL1 è necessario per regolare le cellule radicali; è conservato in tutte le piante terrestri, il che indica che il meccanismo potrebbe essere antico e provenire da un antenato comune. (Pires & Dolan, 2010a) hanno scoperto che la maggior parte dei sottogruppi *bHLH* nelle angiosperme (come *Arabidopsis* e riso) esistono anche nelle popolazioni di differenziazione precoce delle piante terrestri; pertanto, la diversità si è mantenuta a lungo e questi geni hanno subito un lungo processo evolutivo. (Pires & Dolan, 2010b) hanno studiato inoltre l'intero genoma di alcune piante e alghe terrestri. Hanno scoperto che la diversità delle proteine *bHLH* si è stabilita nelle prime piante terrestri 440 milioni di anni fa ed è altamente conservata. Queste caratteristiche possono aumentare l'adattabilità ambientale e supportare i cambiamenti morfologici nelle piante.

(Wang et al., 2018) hanno osservato che otto geni *bHLH* di *Setaria italica* modificavano significativamente i livelli di espressione in condizioni di stress da siccità. Gli elementi di risposta alla siccità sono stati trovati anche nell'analisi degli elementi ad azione cis di questi geni. (Li et al., 2020) hanno scoperto che *CsbHLH041*, un gene del fattore di trascrizione *bHLH* nel *Cucumis sativus*, è un

importante regolatore della tolleranza al sale e all'ABA (acido abscissico). (Jiang et al., 2009) hanno anche indagato ed appurato che il fattore di trascrizione *AtbHLH92* nell'*Arabidopsis thaliana* svolge un ruolo regolatore vitale nella tolleranza al sale e allo stress osmotico. Anche *AtbHLH112*, un altro membro della famiglia dei geni, è importante nella regolazione della resistenza delle piante alla siccità (Li et al., 2021). (Zhao et al., 2020) hanno mostrato che *MdbHLH130* è un importante regolatore dello stress idrico e (Geng & Liu, 2018) hanno scoperto che *CsbHLH18* svolge un ruolo significativo nella regolazione dello stress da freddo. Allo stato attuale, la ricerca sul fattore di trascrizione *bHLH* ha rivelato un ruolo regolatorio cruciale in risposta a vari stress abiotici (siccità, freddo, sale, ecc.). Secondo (Zhai et al., 2016), il livello di espressione di *TabHLH39* in *Triticum aestivum* è cambiato significativamente nelle radici, negli steli e nelle foglie allo stadio di piantina, nonché in condizioni di stress abiotico (siccità, sale e freddo). Ciò indica che i fattori di trascrizione *bHLH* svolgono un ruolo importante nella resistenza allo stress abiotico e nella crescita delle piante ((Duek & Fankhauser, 2005); (Feller et al., 2011)). Secondo (Wang et al., 2021), la sovra-espressione di *BvbHLH93* nelle barbabietole da zucchero può aumentare la produzione di enzimi antiossidanti e ridurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno, migliorando significativamente la tolleranza al sale. *AtNHX1* e *AtNHX6* regolano la tolleranza al sale nell'*Arabidopsis*, mentre *AtMYC2* e *AtbHLH122* regolano l'espressione di *AtNHX1* e *AtNHX6* sotto la guida di ABA ((Luo et al., 2009); (Krishnamurthy et al., 2019)). *MfbHLH38* del *Myrothamnus flabellifolia* è stato trasdotto in *Arabidopsis*, migliorando la tolleranza alla siccità e al sale (Qiu et al., 2020). I fattori di trascrizione *bHLH* regolano anche direttamente o indirettamente la tolleranza al sale e alla siccità nel riso ((Li et al., 2010); (Ikeda et al., 2013);(Liu et al., 2022)). *PalbHLH1* e *PalMYB90* sono ad alta espressione nel pioppo, potenziando così l'attività degli enzimi antiossidanti, rilasciando H₂O₂ e migliorando la sua resistenza alla *Botrytis cinerea*. Anche i fattori di trascrizione *bHLH* svolgono un ruolo essenziale nella sintesi della biomassa; *MrbHLH1* è un gene sinergico indispensabile che regola la sintesi degli antociani *MrMYB1*. I due geni possono formare il complesso *MrMYB1-MrbHLH1* per regolare la sintesi degli antociani (Liu et al., 2013). *DhbHLH1* e *DhMYB2* interagiscono per regolare la produzione di antociani nei petali ibridi di *Dendrobium*, e sia *DhMYB2* che *DhbHLH1* possono anche indurre i petali bianchi a produrre antociani. I fattori di trascrizione *bHLH* regolano anche la sintesi della lignina e hanno un ruolo nella trasduzione del segnale ormonale, coinvolgendo ABA (Li et al., 2017), acido jasmonico, brassinosteroidi, acido salicilico ed etilene ((Pires & Dolan, 2010a); (Feller et al., 2011); (Dang et al., 2011)).

1.6.2. WRKY

Le proteine *WRKY* rappresentano un'importante classe di regolatori trascrizionali nelle piante superiori; la maggior parte dei membri di questa famiglia multigenica sono coinvolti nella risposta agli stress biotici e sono componenti centrali di molti aspetti del sistema immunitario innato delle piante. Tuttavia, i geni *WRKY* svolgono un ruolo specifico nella tolleranza delle piante a una varietà di stress abiotici, tra cui elevata salinità, calore, stress osmotico, elevati livelli di CO₂, elevate concentrazioni di ozono, freddo o siccità e hanno ruoli aggiuntivi in altri importanti processi vegetali, tra cui dormienza dei semi, germinazione, sviluppo delle piante e senescenza fogliare (Wang et al., 2014). Inoltre, i fattori di trascrizione *WRKY* regolano la biosintesi dei metaboliti secondari, inclusi molti fenilpropanoidi, alcaloidi e terpeni (Schluttenhofer & Yuan, 2015). Il nome di questa famiglia di fattori di trascrizione deriva dalla caratteristica più importante di queste proteine, il dominio *WRKY*, una regione di 60 aminoacidi altamente conservata tra i membri della famiglia e coinvolta nel legame del DNA; il dominio *WRKY* è definito dalla sequenza amminoacidica conservata WRKYGQK alla sua estremità N-terminale adiacente ad una *zinc-finger* al C-terminale (Eulgem et al., 2000). I geni *WRKY* sono stati ulteriormente classificati in tre gruppi principali in base al numero di domini *WRKY* presenti. I membri del gruppo I sono caratterizzati da due domini *WRKY* contenenti una *zinc-finger* C₂H₂. I geni *WRKY* del gruppo II contengono un solo dominio *WRKY*, caratterizzato da una *zinc-finger* C₂H₂. Il gruppo III è costituito da un piccolo numero di geni caratterizzati da un singolo dominio *WRKY* con una *zinc-finger* C₂H_C. Nella vite (*Vitis Vinifera* L.), sono stati identificati 59 geni a lunghezza intera che codificano per le presunte proteine *WRKY* (Wang et al., 2014). Alcuni dei fattori di trascrizione *WRKY* della vite sono stati caratterizzati: *VviWRKY26* è coinvolto nella regolazione dell'acidificazione vacuolare e nei meccanismi di accumulo di flavonoidi durante lo sviluppo dell'acino (Amato et al., 2016), *VviWRKY1* aumenta la resistenza della vite contro la peronospora regolando la segnalazione dell'acido jasmonico (Marchive et al., 2013), *VviWRKY33* è coinvolto nella regolazione della difesa della vite contro *Plasmopara viticola* (Merz et al., 2015) mentre molti altri *WRKY* della vite (*VviWRKY03*, *VviWRKY24*, *VviWRKY43* e *VviWRKY53*) hanno un ruolo nella regolazione della via biosintetica degli stilbene (Vannozzi et al., 2018). Questi risultati sono incoraggianti per procedere con la caratterizzazione funzionale di un altro gene *WRKY*, *VviWRKY19*, che è costitutivamente espresso durante la maturazione degli acini d'uva ma il cui ruolo preciso rimane sconosciuto.

1.6.3. NAC

L'acronimo *NAC* deriva da tre proteine primarie caratterizzate da il cosiddetto dominio *NAC* della petunia *NAM* (*no apical meristem*), *Arabidopsis ATAF* (*Arabidopsis transcription activator factor*) e *CUC* (*cuo-shaped cotyledon*) ((Aida et al., 1997);(Souer et al., 1996)). Grazie alla disponibilità di database del genoma vegetale e delle sequenze EST, un numero sempre crescente di presunti geni *NAC* è stato identificato in varie specie vegetali, come ad esempio 117 nell'*Arabidopsis*, 151 nel riso (Nuruzzaman et al., 2010), 152 nella soia (Le et al., 2011), 180 nella mela (Su et al., 2013), 167 nella banana (Cenci et al., 2014), 104 nel pomodoro (Su et al., 2013), 74 nell'uva (Wang et al., 2013).

Gli ampi studi su piante modello, tra cui *Arabidopsis* e riso, hanno rivelato la presenza di un N-terminale altamente conservato contenente il dominio *NAC* che è lungo circa 150-160 aminoacidi e può essere suddiviso in cinque sottodomini (A-E;(Ooka et al., 2003)). Questo dominio *NAC* è associato al legame del DNA, alla localizzazione nucleare e alla formazione di omodimeri o eterodimeri con altre proteine *NAC* (Olsen et al., 2005). Al contrario, il C-terminale altamente divergente, che può presentare un dominio transmembrana, ha una presunta funzione di regolazione trascrizionale positiva o negativa e, talvolta, potrebbe avere attività di legame proteico (Puranik et al., 2011).

I fattori di trascrizione *NAC* subiscono un'intensa regolazione post-trascrizionale che include la scissione dei geni mediata da microRNA; un tipico esempio potrebbe essere miRNA164 che mostra la sua affinità per i geni *NAC* associati allo sviluppo e regolati dallo stress meccanico ((Khraiwesh et al., 2012);(Mallory et al., 2004)). I *NAC* sono anche caratterizzati da una complessa regolazione post-traduzionale che coinvolge ubiquitinazione, dimerizzazione, fosforilazione o proteolisi ((Nakashima et al., 2012); (Puranik et al., 2012)). Questo meccanismo di regolazione potrebbe aiutare le proteine contenenti il dominio *NAC* svolgendo vari ruoli in più processi dell'impianto. Molti di loro sono stati identificati come coinvolti nelle risposte abiotiche e biotiche delle piante ((Mao et al., 2012); (Nakashima et al., 2012); (Christianson et al., 2010);(Olsen et al., 2005); (Tran et al., 2004)). In *Arabidopsis*, *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072* sono stati indotti dalla siccità e dalla salinità e coinvolti nella regolazione delle risposte di difesa segnalate dall'acido abscissico e dall'acido jasmonico; la loro sovrapproduzione ha anche ridotto la resistenza alla *Botrytis cinerea* ((Jensen et al., 2010);(Bu et al., 2008);(Fujita et al., 2004)). Inoltre, l'omologo *ATAF1* e *HvNAC6* nell'orzo hanno un ruolo diretto nella regolazione della difesa basale (Jensen et al., 2007) e *StNAC* nella patata è stato coinvolto nella resistenza contro *Phytophthora infestans* (Collinge & Boller, 2001). Prove crescenti indicano ruoli per le proteine *NAC* nei processi di sviluppo e nelle reti di regolazione trascrizionale.

Ad esempio, *CUC2* è implicato nello sviluppo del meristema apicale del germoglio (Nikovics et al., 2006), *AtNAC2* nello sviluppo della radice laterale (He et al., 2005) e *ANAC036* nella divisione cellulare (Kato et al., 2010). Alcuni altri *NAC* prendono parte allo sviluppo dello xilema (Endo et al., 2015), allo sviluppo dell'embrione (Duval et al., 2002), alla regolazione della biosintesi delle pareti cellulari secondarie ((Mitsuda et al., 2005); (Zhong et al., 2006)) e morte cellulare (Niu et al., 2014). Inoltre, un gran numero di questi fattori di trascrizione è associato a processi di senescenza; ad esempio, è stato recentemente scoperto che l'*ANAC046* è un regolatore positivo della degradazione della clorofilla e della abscissione fogliare in *Arabidopsis* (Oda-Yamamizo et al., 2016). Infine, vale la pena sottolineare che nel pomodoro, che è servito come modello primario per lo sviluppo e la maturazione dei frutti carnosì, i membri della famiglia *NAC* sono stati caratterizzati come coinvolti nella morfogenesi del fiore (*NAM2*; (Hendelman et al., 2013)) o come regolatori della maturazione del frutto, come *NOR* (Giovannoni, 2004) e *NAC4* (Zhu et al., 2014) . Inoltre, *ANAC019* e *ANAC078* in *Arabidopsis* e *BL* in pesca regolano la biosintesi degli antociani (Zhou et al., 2015). Nonostante il ruolo cruciale svolto dalla famiglia *NAC* nelle piante, saranno necessarie molte ricerche per caratterizzare ciascun gene *NAC*. Come accennato in precedenza, 74 membri dei geni *NAC* sono stati identificati da un'analisi completa di questa famiglia di geni nella vite (Wang et al., 2013), ma la funzione biologica specifica di ciascuno di essi rimane sconosciuta.

1.6.4. MADS box

VviAGL15a è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione *MADS-box*. Il termine gene *MADS-box* è stato coniato dopo che quattro "membri fondatori della famiglia" sono stati caratterizzati: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1 (MCM1)* da *S. Cerevisiae*, *AGAMOUS (AG)* da *Arabidopsis thaliana*, *DEFICIENS (DEF)* da *Antirrhinum majus* e *SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)* da *Homo sapiens* (Gramzow & Theissen, 2010). Questi fattori di trascrizione sono definiti dalla presenza di un dominio conservato, il *MADS box*, nella regione N-terminale che è coinvolto nel legame del DNA e nella dimerizzazione con altre proteine *MADS box*; sono coinvolti nel controllo dello sviluppo e nella trasduzione del segnale negli eucarioti. Nelle piante, sono associati a numerosi processi di sviluppo, in particolare quelli legati allo sviluppo riproduttivo: induzione della fioritura, specificazione dell'infiorescenza e dei meristemi dei fiori, definizione dell'identità degli organi dei fiori, nonché regolazione dello sviluppo di frutti, semi ed embrioni (Grimplet et al., 2016). La famiglia dei geni *MADS-box* può essere divisa in due gruppi principali, denominate tipo I e tipo II, entrambe presenti nelle piante, negli animali e nei funghi (De Bodt et al., 2003). I geni del gruppo di tipo II includono

geni simili a *MEF2* di animali e lieviti e geni di tipo MIKC presenti solo nelle piante. Per quanto riguarda i geni di tipo *MIKC* hanno ricevuto questo nome perché, oltre al dominio *MADS* (M), contengono tre domini conservati aggiuntivi, il dominio Interveniente (I) debolmente conservato, il dominio simile alla cheratina (K) conservato e il dominio C altamente variabile-dominio terminale (C). Il dominio I è responsabile della specificità nella formazione di dimeri che legano il DNA, il dominio K media la dimerizzazione e il dominio C funziona nell'attivazione trascrizionale e nella formazione di complessi proteici di ordine superiore. I geni di tipo MIKC sono stati ulteriormente divisi in due sottogruppi, *MIKCC* e *MIKC** in base alla divergenza nei domini I e K (Diaz-Riquelme et al., 2009). I geni *MADS box* di tipo *MIKCC* sono il gruppo meglio caratterizzato di geni *MADS box*; inizialmente vengono identificati come geni dell'identità degli organi floreali, ma sono ulteriormente coinvolti in funzioni essenziali e diverse legate alla crescita e allo sviluppo delle piante. Nella vite (*Vitis Vinifera* L.), è stata descritta la famiglia dei fattori di trascrizione *MADS-box* e sono stati identificati 90 geni *MADS-box* (Grimplet et al., 2016); 42 di questi sono geni *MIKCC* –tipo II distribuiti in 13 sottofamiglie; *VviAGL15a* è il gene *MIKCC* di tipo II della sottofamiglia di *VviAGL15*. L'analisi del suo profilo di espressione ((Grimplet et al., 2016);(Diaz-Riquelme et al., 2009)) conferma che è espresso preferenzialmente in fiori e frutti mentre la sua espressione il livello negli organi e nei tessuti vegetativi è estremamente basso. Non ci sono informazioni sul suo ruolo specifico nella vite, ma studi precedenti su *Arabidopsis thaliana* hanno dimostrato che il suo omologo, *AtAGL15*, è coinvolto nella repressione della transizione fiorale (Adamczyk et al., 2007).

1.6.5. Analisi del profilo d'espressione per i geni d'interesse

In tale elaborato sono stati presi in considerazione ed analizzati i seguenti fattori di trascrizione: *VvibHLH075*, *VviWRKY19*, *VviNAC60*, *VviNAC33*, *VviAGL15a* ed *VviSGR1*.

I grafici sottostanti mostrano il profilo di espressione dei geni sopra citati nel periodo che va da un mese prima dell'invasatura fino a due mesi post invasatura (Fasoli et al., 2012).

Sull'asse delle ascisse, si trova il tempo rappresentato in giorni pre e post invasatura (DFV) mentre sull'asse delle ordinate è rappresentato il livello di espressione genica misurato in FPKMs (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads).

Figura 4: Espressione genica dei fattori di trascrizione presi in esame in Cabernet Sauvignon (Fasoli et al., 2012).

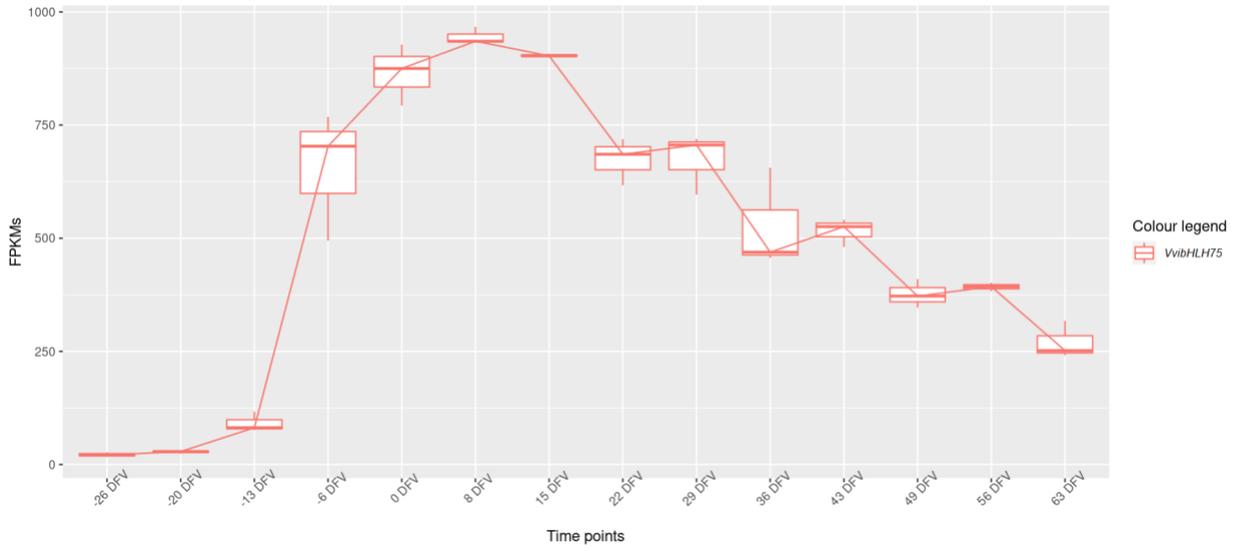


Figura 4a

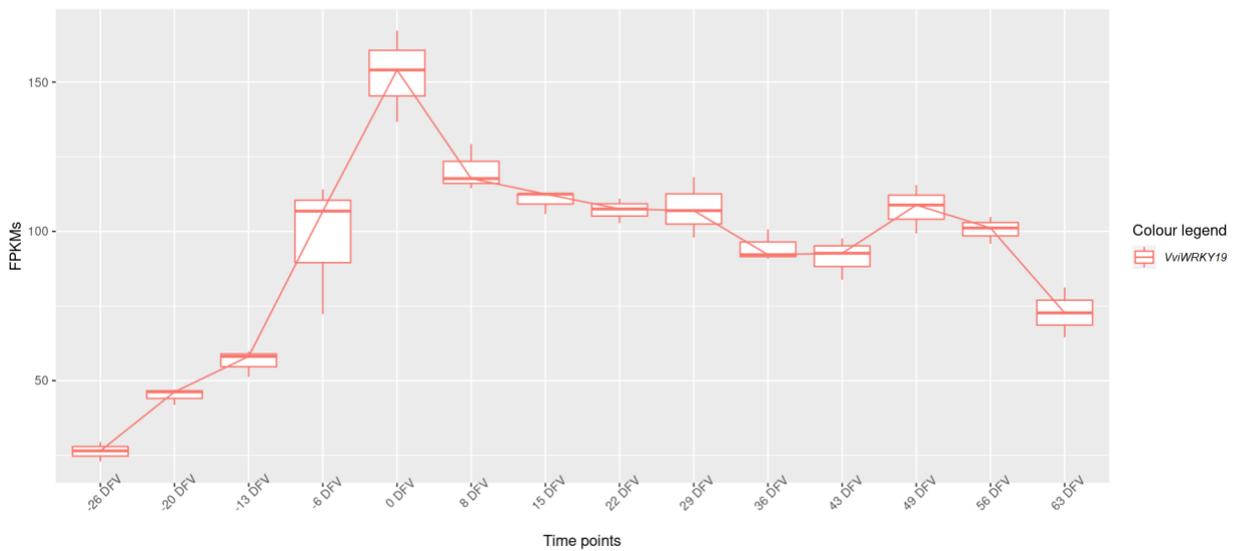


Figura 4b

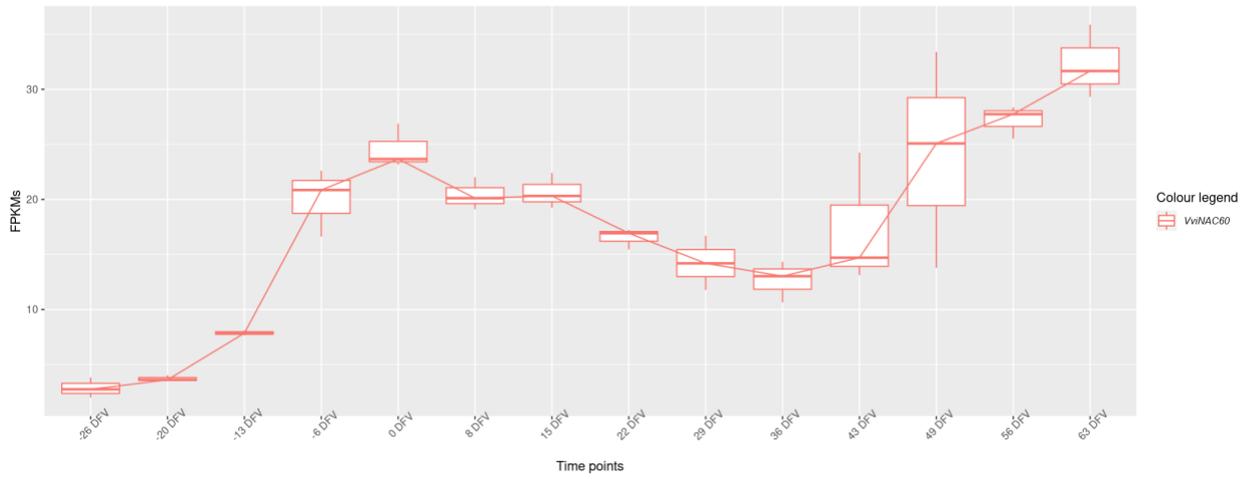


Figura 4c

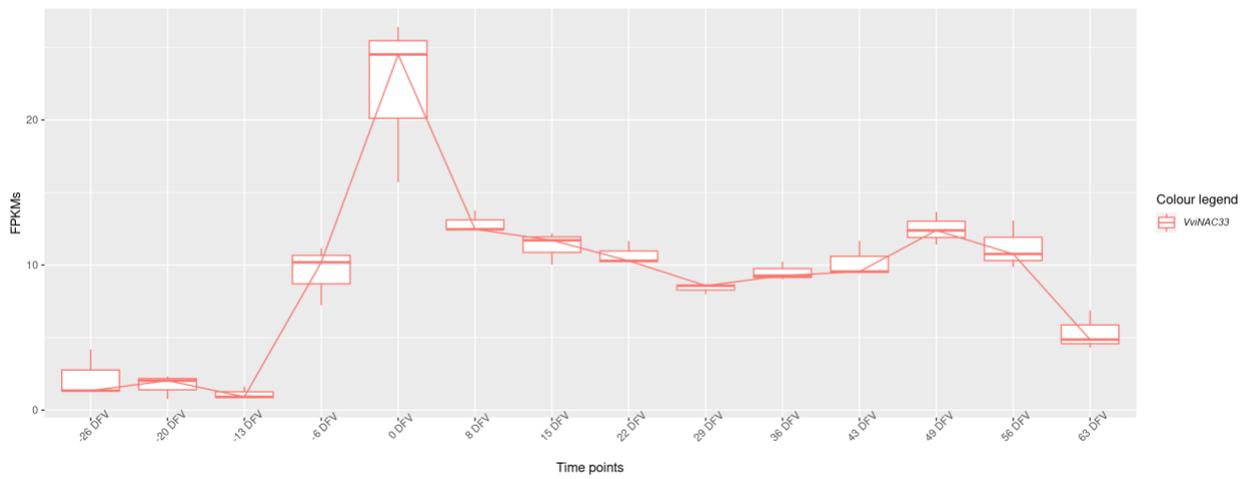


Figura 4d

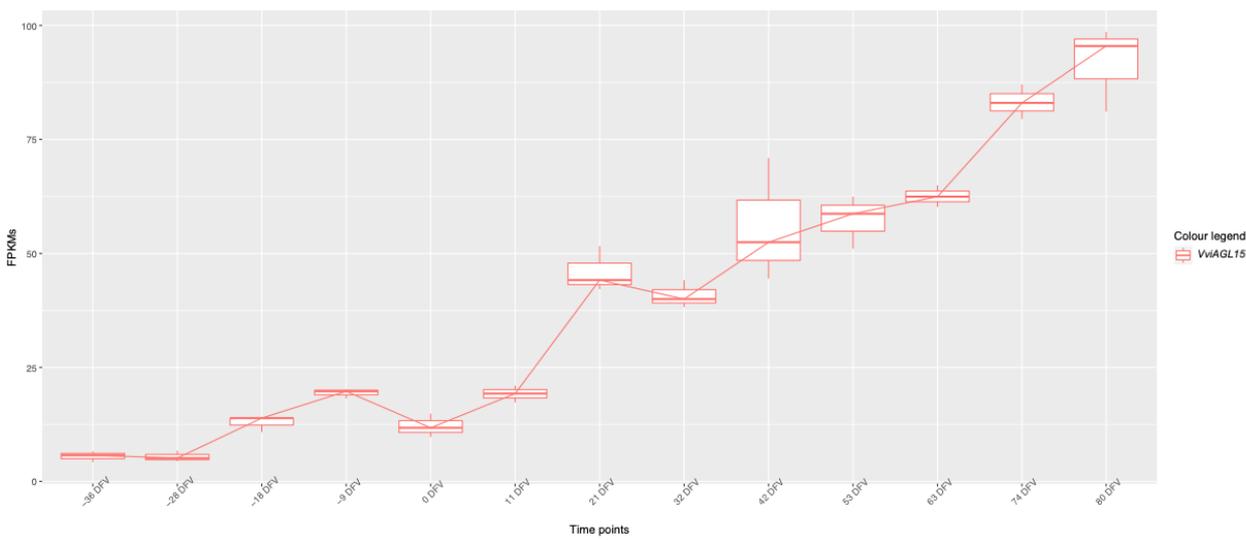


Figura 4e

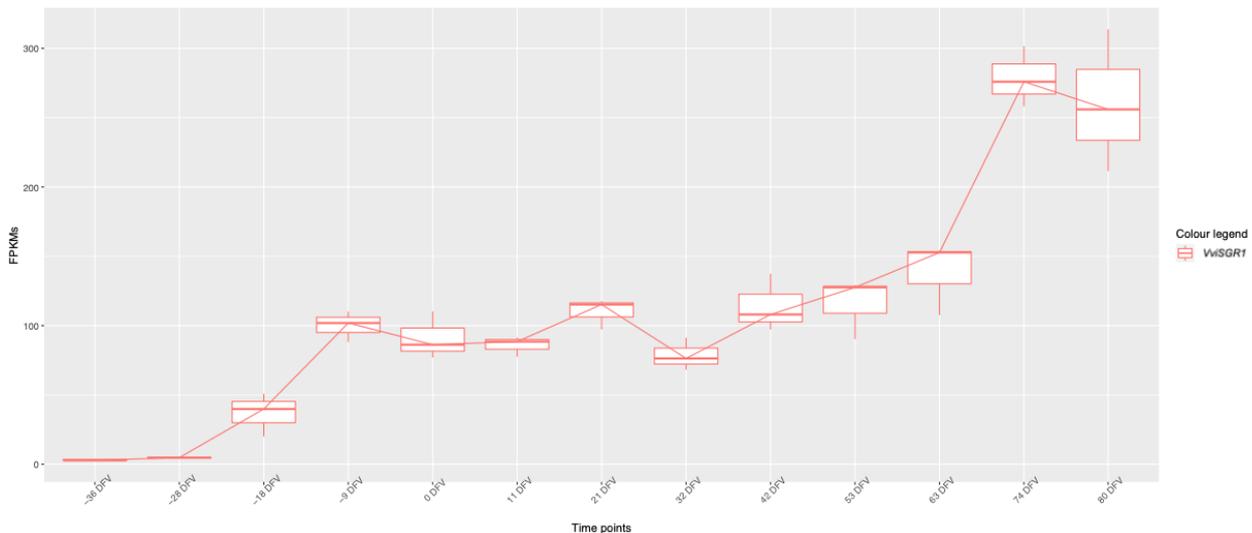


Figura 4f

Per quanto riguarda i geni *VvibHLH075* e *VviWRKY19* (Fig. 4a, 4b), essi mostrano un profilo di espressione simile nel corso del tempo, con una fase esponenziale che inizia due settimane prima dell'invasatura, raggiunge un picco di espressione all'invasatura per poi calare gradualmente. Parliamo dunque di due geni marcatori della prima transizione dell'invasatura sia nelle uve a bacca rossa sia in quelle a bacca bianca; *VviWRKY19* è un gene marcatore anche per la seconda transizione. È importante notare che il gene *VvibHLH075* mostra un'espressione significativamente maggiore rispetto al gene *VviWRKY19*; ciò indica che il *VvibHLH075* potrebbe essere più attivo o svolgere un ruolo più predominante rispetto al *VviWRKY19* durante il processo di invasatura (Fasoli et al., 2018). Il gene *VviWRKY19* è stato identificato come uno dei geni bersaglio di *VvibHLH075* (Fasoli et al., 2018). Questo suggerisce che i due fattori di trascrizione possano agire in collaborazione per innescare gli eventi molecolari legati all'inizio della maturazione, e che *VvibHLH075* potrebbe funzionare come un fattore di regolazione a monte rispetto a *VviWRKY19* (Fasoli et al., 2018). La gerarchia dell'attivazione trascrizionale (Fig. 5) coinvolge inizialmente *VvibHLH075*, che induce l'espressione di geni correlati all'ammorbidimento delle bacche, seguito da *VviWRKY19* che amplifica il segnale di attivazione verso altri regolatori trascrizionali (Fasoli et al., 2018). Questo indica che i marcatori positivi per la prima transizione rappresentino i fattori scatenanti dell'inizio della maturazione, che agiscono attraverso una cascata gerarchica di attivazione genica (Fig. 5) (Fasoli et al., 2018). I grafici (Fig. 4c, 4d) evidenziano un profilo di espressione simile tra i geni *VviNAC60* e *VviNAC33* durante il periodo considerato, con una fase esponenziale che inizia da due settimane prima dell'invasatura e un picco di concentrazione all'invasatura stessa. Tuttavia, il picco

d'espressione del gene *VviNAC60* è più pronunciato rispetto al gene *VviNAC33*. Dopo il picco di concentrazione all'invasatura, sia il gene *VviNAC60* che il gene *VviNAC33* mostrano un calo graduale nell'espressione genica nel corso del tempo.

VviNAC60 è stato precedentemente identificato come uno dei geni *switch*, presunti regolatori principali della transizione dalla fase vegetativa a quella matura negli organi della vite (Palumbo et al., 2014). Questo gene mostra un aumento dell'espressione durante il passaggio dalla fase vegetativa/crescita alla fase di senescenza/maturazione in tutti gli organi.

L'analisi dell'espressione di *VviNAC60* durante lo sviluppo delle bacche ha rivelato che la sua induzione avviene prima dell'espressione di diversi geni noti associati alla maturazione.

Il profilo di espressione di *VviNAC60* mostra che questo gene è espresso preferenzialmente negli acini durante la fase post-raccolta ma in alcune varietà mostra un'elevata espressione durante le fasi di fine invasatura e raccolta, suggerendo un ruolo specifico durante l'intero processo di maturazione delle bacche; tuttavia, *VviNAC60* è un marcatore della prima transizione: la sua espressione inizia prima dell'invasatura, suggerendo un ruolo specifico anche durante questa fase.

Attraverso l'uso di approcci sperimentali e computazionali, è stato dimostrato che *VviNAC60* viene anche indotto durante la maturazione dei frutti e regola l'espressione di geni correlati alla maturazione (D'Inca et al., 2021). Inoltre, è co-espresso con geni marcatori della maturazione, inclusi geni correlati all'ABA, un fattore scatenante della maturazione delle bacche (Pilati et al., 2017). La sovra-espressione stabile di *VviNAC60* nella vite ha portato a un significativo accumulo di antociani nelle foglie giovani mediante l'attivazione dell'espressione di *VviMYBA1*, un regolatore positivo della sintesi degli antociani che agisce all'inizio della maturazione delle bacche (Walker et al., 2007).

VviNAC33 viene attivato durante la transizione dalla fase vegetativa alla fase matura in diversi organi ed è fortemente espresso nelle foglie che subiscono la senescenza.

Dai database trascrittomici precedentemente pubblicati (Fasoli et al., 2012), è emerso che l'espressione di *VviNAC33* avviene prima e durante l'invasatura della bacca. È stato dimostrato che *VviNAC33* induce la de-eziolazione delle foglie, inibisce la crescita degli organi vegetativi ed è coinvolto nella degradazione della clorofilla, caratteristiche che rispecchiano la sua evidente importanza nel passaggio da fase fotosintetica a quella di ripening. Per quanto riguarda *VviNAC33*, la sua espressione limitata agli organi e ai tessuti maturi, compresi gli acini in maturazione, è coerente con il ruolo di principale regolatore della transizione da vegetativo a maturo in diversi organi della vite. Inoltre, considerando che nelle bacche è espresso preferenzialmente nelle fasi

post-raccolta e raccolta, sembra indicare che potrebbe svolgere un ruolo predominante nella fase finale della maturazione delle bacche. Tuttavia, la sua forte induzione prima dell'invasatura indica che è un indicatore della prima transizione svolgendo un ruolo specifico anche all'inizio della maturazione delle bacche. Inoltre, i risultati indicano che *VviNAC33* è controllato sia da *VvibHLH075* che da *VviWRKY19* (figura 5), anch'essi identificati in precedenza come potenziali regolatori della transizione di fase delle bacche ((Fasoli et al., 2012);(D'Inca et al., 2021)).

All'inizio, 30 giorni prima dell'invasatura, l'espressione genica del gene *VviAGL15a* (Fig. 4e) è a un livello basale, tuttavia, a circa una settimana prima dell'invasatura, si osserva un primo aumento dell'espressione genica. Dopo questa fase iniziale di attivazione, l'espressione aumenta in modo esponenziale fino a raggiungere un picco massimo ad un mese dopo l'invasatura.

Da questo punto in poi, l'espressione genica del gene *VviAGL15a* inizia a diminuire gradualmente per poi riavere una risalita.

Per quanto riguarda *VviAGL15a*, tra i cinque geni selezionati, è l'unico gene caratterizzato dall'assenza di una rapida induzione prima dell'invasatura: la sua elevata espressione nell'acino maturo soprattutto durante le fasi post-raccolta e raccolta indica che potrebbe svolgere un ruolo di regolatore principale della fase finale della maturazione delle bacche.

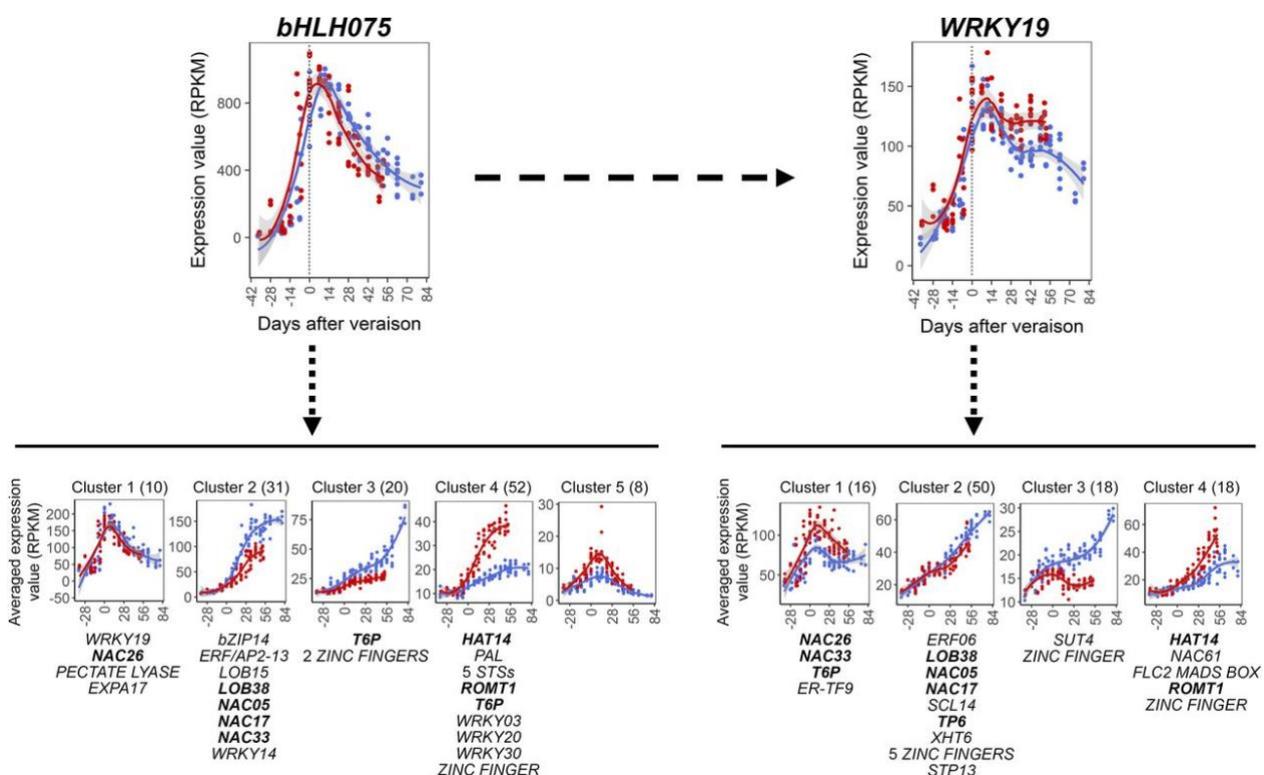


Figura 5: Network d'attivazione trascrizionale per i geni *bHLH075* and *WRKY19* (Fasoli et al., 2018).

L'analisi dell'espressione di *VvibHLH75*, *VviWRKY19*, *VviNAC60*, *VviNAC33*, *VviAGL15a*, utilizzando i dati trascrittomici relativi al processo di maturazione delle bacche di Cabernet Sauvignon e Pinot Nero (Fasoli et al., 2018) mostra che ciascun fattore di trascrizione, escluso *VviAGL15a*, è caratterizzato da un improvviso aumento di espressione appena prima dell'invasatura. Questi dati sono coerenti con la loro classificazione come marcatori positivi della prima transizione dell'invasatura e suggeriscono che agiscano come regolatori principali durante l'inizio della maturazione. Dopo l'invasatura, l'espressione di *VvibHLH75*, *VviWRKY19*, *VviNAC60*, *VviNAC33* può aumentare o diminuire ulteriormente, ma il loro livello di espressione rimane superiore rispetto agli stadi pre-invasatura, indicando che possano avere un ruolo durante l'intero processo di maturazione. La forte diminuzione dell'espressione di *VvibHLH75*, suggerisce che svolge un ruolo importante durante le fasi iniziali della maturazione. Infine, per quanto riguarda *VviAGL15a*, è l'unico fattore di trascrizione caratterizzato dall'assenza di un'espressione improvvisa prima dell'invasatura, ma la sua espressione aumenta durante il processo di maturazione, suggerendo il suo coinvolgimento nella regolazione di processi specifici associati alle fasi di maturazione tardiva.

L'analisi finale di co-espressione utilizzando l'atlante di espressione genica globale (Fasoli et al., 2012), il set di dati trascrittomici più completo sullo sviluppo delle piante e delle bacche della vite, ha dimostrato che i fattori di trascrizione selezionati sono co-espressi con altri fattori di trascrizione o con geni coinvolti in processi e metabolici specifici legati alla maturazione. Questo risultato rappresenta una prima indicazione dei processi/metabolismi controllati da ciascun candidato, possibilmente in cooperazione con altri fattori di trascrizione. Nel dettaglio, *VviNAC33* è co-espresso con due proteine *SENESCENCE-INDUCIBLE CHLOROPLAST STAY-GREEN PROTEIN 1* e *SENESCENCE-RELATED GENE 1*, coinvolte nel processo di senescenza, un evento chiave spesso associato alla maturazione degli organi della vite; inoltre, l'elevata espressione di *VviNAC33* nella foglia senescente è coerente con i risultati che mostrano la co-espressione con le due proteine legate alla senescenza, indicando un ruolo di *VviNAC33* nella regolazione di questo processo. In figura 4g è possibile notare il profilo d'espressione del gene *SGR1* in Cabernet Sauvignon. Il risultato è in linea con quanto detto in precedenza. Tra -14 e -7 giorni all'invasatura si assiste ad un primo aumento di espressione del gene, che poi rimane stabile per poi mostrare il picco d'espressione a circa tre settimane dall'invasatura. Per quanto riguarda *VviNAC60*, tra i geni altamente co-espressi ci sono *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 15*, un gene *switch* ottenuto dall'atlante di espressione e

da set di dati trascrittomici specifici della bacca, e un marcatore della prima transizione, suggerendo una presunta cooperazione tra i diversi geni *switch* durante la transizione da vegetativo a maturo e *VviNAC61*, confermando la considerazione precedentemente descritta per *VviNAC33* (Bertini, 2019). *VviAGL15a* è co-espresso con geni coinvolti principalmente nei processi metabolici della parete cellulare e dei carboidrati, due eventi tipici associati alla maturazione. Inoltre, la co-espressione con un *INTERACTOR MADS box* e *VviNAC18* suggerisce una cooperazione o una relazione trascrizionale gerarchica con altri fattori di trascrizione, comprese le proteine *MADS-box*, per regolare processi specifici. Per quanto riguarda *VviWRKY19*, i geni altamente co-espressi sono rappresentati da molti geni coinvolti nel metabolismo della parete cellulare, indicando una regolazione diretta di questo processo da parte di *VviWRKY19*, e da alcuni fattori di trascrizione, tra cui i fattori di trascrizione *NAC* e *WRKY*, suggerendo le stesse considerazioni descritte per gli altri tre geni (Bertini, 2019). Inoltre, *VvibHLH75* è co-espresso con due geni *ERF/AP2* e un *SAUR*, suggerendo un coinvolgimento di questo gene nella segnalazione di etilene e auxina, con altri due geni *BASIC HELIX-LOOP-HELIX*, indicando un'attività di cooperazione tra geni della stessa famiglia di fattori di trascrizione. Infine, tale gene è co-espresso con molti altri coinvolti nel metabolismo della parete cellulare, suggerendo un ruolo anche in questo processo. Due geni coinvolti nel metabolismo della parete cellulare (un *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 32* e un *CELLULOSE SYNTHASE CSLG2*) e *VviWRKY14* sono co-espressi sia con *VviWRKY19* che con *VvibHLH75*, suggerendo che la regolazione di molti geni può essere eseguita da più di uno dei candidati selezionati (Bertini, 2019).

I risultati dell'analisi di co-espressione (Bertini, 2019) hanno mostrato che i fattori di trascrizione selezionati sembrano essere principalmente coinvolti nella regolazione del processo di sviluppo, del metabolismo della parete cellulare, del processo metabolico dei carboidrati e della risposta allo stimolo ormonale; inoltre, la co-espressione di molti altri fattori di trascrizione potrebbe indicare una specifica cooperazione o una relazione gerarchica nella regolazione di specifici processi. Nel complesso, questi risultati supportano un ruolo dei fattori di trascrizione selezionati come regolatori principali della maturazione degli acini d'uva e confermano che rappresentano candidati interessanti per la caratterizzazione funzionale e, più in generale, per una migliore comprensione del meccanismo molecolare che controlla il processo di maturazione degli acini.

2. Scopo della tesi

Negli ultimi anni, stanno aumentando gli studi a sostegno dell'ipotesi secondo cui il nostro pianeta sia entrato, in seguito alla prima rivoluzione industriale, in una nuova era geologica, caratterizzata dall'essere segnata dagli effetti degli interventi dell'uomo sull'ormai fragile ecosistema. Definita Antropocene, quest'ultima ha portato con sé evidenti mutamenti climatici, riscontrabili già negli ultimi anni in molte regioni del pianeta. Non a caso, eventi estremi come inondazioni e siccità stanno aumentando di frequenza, così come incendi, cicloni e ondate di calore, risultando nell'insieme sempre più in grado di influire sui sistemi naturali e produttivi. Tra le possibili conseguenze, si ipotizza che avverrà un contraccolpo economico importante sul comparto agroalimentare dei paesi più colpiti. L'Italia, è uno dei suddetti paesi che potrebbe trovarsi in tale situazione. Inoltre, vi saranno degli stravolgimenti per quanto riguarda le colture in grado di essere coltivate nei nostri areali, che dovranno quindi cambiare aspetto ed adattarsi alle nuove condizioni. A tal proposito, vista l'importanza economica e culturale della vite nel mondo e più specificatamente nel nostro paese, lo scopo principale di questo lavoro di tesi è quello di incrementare le conoscenze molecolari e fisiologiche alla base del processo di maturazione del frutto di vite in relazione a differenti stimoli ambientali. Infatti, tale specie è risultata essere tra quelle maggiormente caratterizzate da una marcata plasticità fenotipica, riscontrabile principalmente nel frutto, a seconda delle differenti condizioni di crescita a cui viene esposta. Nello specifico, si è andati a studiare ed interpretare il processo di maturazione in due diversi ambienti al fine proprio di accentuare tale aspetto relativo alla risposta in termini di adattamento delle piante. Lo studio è stato quindi, predisposto servendosi di piante coltivate all'interno di una camera di crescita controllata a partire da talee fruttificanti, il cui processo di sviluppo del frutto è stato adeguatamente confrontato con quello verificatosi in piante cresciute in pieno campo. Nel complesso, il processo di maturazione è stato studiato sia dal punto di vista fisiologico, monitorando i principali parametri relativi alla maturazione, sia dal punto di vista molecolare, analizzando l'andamento dell'espressione di specifici geni. La maggior parte di questi, si sono rilevati essere *switch genes*, ovvero *master regulators*, i quali sono alla base della transizione verde-matura del frutto, nota come invaiatura. L'obiettivo è stato quello di ottenere un modello che permettesse di studiare in dettaglio la pianta di vite e la maturazione dei grappoli, in un ambiente controllato come la camera di crescita, in cui parametri come temperatura, umidità e luce possono essere modificati singolarmente lasciando gli altri fattori costanti. In pieno campo non sarebbe possibile adottare una tale strategia per via delle variabili biotiche ed abiotiche in continua

variazione ed interazione. Tale modello rappresenta quindi una soluzione utile al fine di valutare la pianta di vite in condizioni sfavorevoli, analizzandole singolarmente in un primo momento e successivamente nel loro complesso. In camera di crescita, è quindi possibile creare una simulazione delle condizioni climatiche esterne in mutamento, analizzare il comportamento e la risposta della pianta, e trovare quindi delle soluzioni efficaci dal punto di vista molecolare, come può essere il *genome editing*. Con tale tecnica si potrebbe modulare la regolazione dell'espressione di geni, come i fattori di trascrizione, in modo da rendere la pianta maggiormente reattiva nei confronti degli stimoli esterni.

3. Materiali e metodi

3.1. *Fruiting cuttings*

Il metodo delle talee fruttificanti (*fruiting cuttings*) è un sistema che permette di ottenere un grappolo d'uva a partire da talee legnose. Esso si basa sulla separazione temporale e spaziale dei processi di radicazione e germogliamento, seguiti poi dallo sviluppo dell'infiorescenza e del frutto. Le talee fruttificanti utilizzate in questa tesi sono state sviluppate seguendo le metodiche descritte da (Mullins & Rajasekaran, 1981) e (Baby et al., 2014). I frutti ottenuti con questo metodo sono stati poi utilizzati sia per analizzare il profilo d'espressione genica sia i parametri di maturazione. Tralci di circa 100 cm di lunghezza sono stati raccolti durante la potatura della stagione precedente e conservati al buio a 4°C per almeno 4 settimane. Successivamente, sono stati tagliati fino ad ottenere talee di una lunghezza compresa tra i 40 e i 50 cm, mantenendo integro solo il nodo apicale. La regione basale delle talee è stata poi immersa in una soluzione composta da acido indol-3-butirrico (IBA) ad una concentrazione di 3000 ppm. Successivamente sono state trasferite in un substrato costituito da sabbia di fiume e poste all'interno di una camera fredda alla temperatura di 4 °C, mantenendo la regione basale alla temperatura costante di 26 °C mediante l'utilizzo di uno specifico recipiente termoregolato, mentre la regione apicale delle talee è stata coperta con un telo per evitare la ricezione dello stimolo luminoso della camera. Queste condizioni sono state promosse per almeno cinque settimane, umidificando il terreno con acqua in giorni alterni. Trascorso questo periodo di incubazione, le talee radicate sono state espiantate in un nuovo terreno contenente perlite, vermiculite e torba in rapporto 6:3:1, per poi essere trasferite nell'apposita camera di crescita. All'interno della camera sono state mantenute le seguenti condizioni (Tab. 1):

Tabella 1: Condizioni ambientali riscontrabili all'interno della camera di crescita

Parametro	Condizione
Temperatura	27 °C (Giorno) – 22 °C (Notte)
Fotoperiodo	16 ore
Umidità	40 %
Intensità luminosa	350 µE

Durante le prime fasi del germogliamento, le foglie basali e l'apice principale dell'unica gemma mantenuta sulle talee sono state opportunamente rimosse, garantendo quindi la presenza di una singola infiorescenza sul germoglio defoliato. Successivamente, lo sviluppo di un germoglio laterale

garantirà il supporto necessario per il corretto sviluppo e mantenimento dell'infiorescenza, fino alla formazione e successiva maturazione del frutto. Dopo il trasferimento nella camera di crescita le talee sono state irrigate a giorni alterni con una soluzione nutritiva a media forza. Essa è costituita a sua volta da 4 diverse soluzioni:

- Soluzione di Hoagland di macro-elementi quali: nitrato di ammonio, nitrato di potassio, dicloruro di calcio, cloruro di potassio e dinitrato di calcio.
- Soluzione di Hoagland di microelementi quali: nitrato ferrico, acido borico, solfato di zinco, solfato di rame e molibdato di sodio.
- Soluzione di solfato di magnesio 0,4 M
- Soluzione di diidrogeno fosfato di potassio 0,1 M.

La radicazione prima del germogliamento, la irrigazione con una soluzione nutritiva e lo sviluppo del germoglio laterale sono di fondamentale importanza per un'adeguata formazione e maturazione del grappolo d'uva. Successivamente le piante sono state monitorate, mantenendo fino all'allegagione cinque foglie sul germoglio; da tale momento fino alla completa maturazione del grappolo sono state garantite dieci-dodici foglie su ciascuna pianta. Le piante sono state seguite nella loro crescita vegetativa, e successivamente nella maturazione del grappolo, annotando il giorno di allegagione e di invaiatura, per poter eseguire al meglio temporalmente i campionamenti degli acini.

3.2. Campionamento degli acini in ambiente controllato e in pieno campo per le analisi molecolari

Il campionamento degli acini della varietà oggetto di questo studio è stato effettuato sia utilizzando talee fruttificanti collocate all'interno di una camera di crescita a condizioni controllate, situata presso il dipartimento di biotecnologie dell'università di Verona, sia utilizzando piante cresciute presso un vigneto situato nel comune di Buttapietra, in provincia di Verona. Per garantire un adeguato confronto tra le due condizioni di crescita sono stati monitorati, i principali parametri ambientali che hanno caratterizzato il processo di sviluppo e maturazione dei frutti in pieno campo. A tal proposito, i dati sono stati raccolti da una centralina ARPAV dislocata all'interno del comune di Buttapietra. Alla base dell'analisi qui riportata, vi è stato un accurato campionamento degli acini in

esame, al fine di garantire un confronto il più rappresentativo possibile tra le due condizioni di crescita. Per quanto riguarda lo studio del processo a livello molecolare, per entrambe le condizioni, sono stati selezionati dieci grappoli differenti da altrettante piante, per seguire in modo accurato l'andamento di sviluppo del frutto. Il campionamento degli acini è stato svolto settimanalmente (tabella 2), a partire da circa 10 giorni post-antesi fino al raggiungimento della completa maturazione. All'interno del singolo campionamento dai rispettivi grappoli, è stato importante differenziare la tipologia e la posizione degli acini raccolti, in modo tale da avere il più possibile un dato rappresentativo della situazione reale esaminata. Le bacche sono state poi congelate in azoto liquido e stoccate a -80 °C fino a successivo utilizzo. Per quanto riguarda le talee in camera di crescita sono stati prelevati 20 acini per ogni campionamento su un totale di dieci piante, quindi nel complesso 2 acini per pianta. Per il pieno campo sono stati prelevati invece 50 acini per ogni campionamento sempre su un totale di dieci piante, quindi 5 acini per pianta. Nella tabella 2 vengono mostrati i vari campionamenti con le relative date.

Tabella 2: A sinistra si trovano i dati relativi alla camera di crescita mentre a destra si trovano quelli relativi al pieno campo.

Campionamento	Data	Campionamento	Data
Primo	11/05/23	Primo	7/06/23
Secondo	18/05/23	Secondo	14/06/23
Terzo	25/05/23	Terzo	21/06/23
Quarto	1/06/23	Quarto	28/06/23
Quinto	8/06/23	Quinto	5/07/23
Sesto	15/06/23	Sesto	12/07/23
Settimo	22/06/23	Settimo	19/07/23
Ottavo	29/06/23	Ottavo	26/07/23
Nono	6/07/23	Nono	3/08/23
\	\	Decimo	10/08/23
\	\	Undicesimo	17/08/23
\	\	Dodicesimo	24/08/23

3.3. Campionamento degli acini in ambiente controllato e in pieno campo per le analisi dei parametri di maturazione

Per quanto riguarda le talee fruttificanti sono stati selezionati sette grappoli, mentre per le piante cresciute in vigneto, data la maggior disponibilità di grappoli, ne sono stati impiegati circa una decina. Per entrambe le condizioni di crescita, il campionamento ha avuto inizio nel momento in cui più del 50% degli acini presenti nei grappoli selezionati mostravano un evidente ammorbidimento dei tessuti delle bacche ed una variazione della colorazione. La raccolta è stata poi svolta settimanalmente fino al raggiungimento della completa maturazione. Il campionamento dalle talee fruttificanti è stato condotto selezionando gli acini da ogni grappolo sulla base di un'analisi visiva del loro livello di maturazione, mentre dalle piante cresciute in vigneto è stato effettuato prelevando racimoli da ogni grappolo scelto e solo successivamente gli acini sono stati selezionati sulla base della loro maturazione, per poi essere suddivisi in un numero definito su cui poter svolgere le successive analisi. I parametri di maturazione analizzati sono stati: massa, pH, grado zuccherino ed acidità. Ognuno di questi parametri è stato analizzato utilizzando tre repliche biologiche contenenti 16 acini ciascuna per le talee fruttificanti e quattro repliche contenenti 20 acini ciascuna per le piante in pieno campo. Le analisi sono state condotte seguendo le fasi di seguito elencate:

- Rimozione del pedicello dagli acini e loro suddivisione in numero specifico nelle repliche biologiche;
- Pesatura degli acini di ogni replica;
- Spremitura manuale degli acini di ogni replica fino ad ottenimento del mosto.
- Misura del pH del mosto mediante il pH-metro Basic 20+ (Crison) a disposizione nel laboratorio.
- Determinazione del grado zuccherino di ogni mosto mediante utilizzo del rifrattometro digitale "DBR35/45/SALT".
- Determinazione dell'acidità mediante, titolazione acido-base su 7,5 mL di mosto. Impiegando blu di bromotimolo come indicatore del viraggio e una soluzione di NaOH 0,1M come agente titolante.

Successivamente sono stati ottenuti i grafici relativi agli andamenti dei quattro parametri analizzati. Sulle ascisse si trovano il numero di campionamenti mentre sulle ordinate rispettivamente ottenuti per ogni parametro. Le barre presenti indicano la deviazione standard per ogni campionamento.

3.4. Estrazione dell'RNA da bacca

Si è proceduto con la macinazione in azoto liquido degli acini raccolti, servendosi di un mortaio e un pestello adeguatamente sterilizzati a 180 C° in stufa. In questa fase, tramite ricerca visiva ed avvalendosi di una pinzetta sono stati rimossi i vinaccioli, naturalmente presenti all'interno della bacca, in modo tale da escluderli dalle analisi successive così da non avere agenti interferenti. L'estrazione si è poi svolta seguendo un protocollo modificato (Fasoli et al., 2012) basato sull'impiego del kit commerciale "Spectrum™ Plant Total RNA Kit" (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). Per ogni campione, sono state eseguite tre estrazioni, in cui ognuna è stata articolata a partire da due specifiche pesate di 200 mg di polvere ottenuta mediante la macinazione degli acini. L'estrazione, come da protocollo, si è articolata in cinque differenti fasi successive, iniziando dalla lisi del tessuto e successiva filtrazione del lisato ottenuto, seguite poi dal legame specifico dell'RNA ad una specifica resina, ovvero un polimero costituito di silice, da dei lavaggi per eliminare eventuali impurità e infine da un'eluizione dell'RNA specificatamente trattenuto. L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata con il kit commerciale "Spectrum™ PlantTotal RNA Kit".

Di seguito il protocollo utilizzato:

1. Raccogliere il tessuto vegetale e immergerlo rapidamente nell'azoto liquido per prevenire la degradazione dell'RNA.
2. Macinare il tessuto vegetale fino ad ottenere una polvere fine in azoto liquido, usando mortaio e pestello.
3. Pesare rapidamente circa 200 mg di polvere di tessuto in una provetta da 2 ml precedentemente raffreddata in azoto liquido.
4. Aggiungere 900 µl di soluzione di lisi, precedentemente addizionata con β - mercaptoetanolo, (10 µl β - mercaptoetanolo per ogni ml di soluzione di lisi) alla polvere e agitare con l'utilizzo del vortex per circa 40 secondi.
5. Incubare il campione a 56° per 5 minuti in agitazione e successivamente centrifugare per 5 minuti a massima velocità (14.000 rpm).
6. Sotto cappa, prelevare 700 µl di surnatante, evitando di toccare il pellet, e trasferirlo

nella colonnina di filtrazione (anello di ritenzione blu) assemblata in una provetta da 2 ml fornita dal kit.

7. Centrifugare per 1 minuto a massima velocità, conservare il lisato ed eliminare la colonnina.

Attacco dell'RNA alla colonna

8. Aggiungere al lisato 750 µl di soluzione di binding e miscelare immediatamente con l'utilizzo del vortex.
9. Prelevare 700 µl di surnatante e trasferirli nella colonnina di *binding* (anello di ritenzione rosso) assemblata all'interno di una nuova provetta da 2 ml.
10. Centrifugare per 1 minuto a massima velocità affinché l'RNA si leghi alla resina; eliminare l'eluato ed asciugare la provetta con un pezzo di carta assorbente. Riposizionare la colonnina di *binding* nella provetta e trasferirvi il rimanente eluato, ripetendo il passaggio di centrifugazione ed eliminazione del liquido che ha attraversato la colonnina.

Lavaggio dell'RNA legato alla colonna

11. Traferire la colonnina di *binding* in una nuova provetta e aggiungere 500 µl di soluzione di lavaggio 1.
12. Centrifugare per 1 minuto a massima velocità ed eliminare l'eluato che ha attraversato la colonna, asciugando rapidamente la provetta con un pezzo di carta assorbente.
13. Riposizionare la colonnina all'interno della provetta e aggiungere 500 µl di soluzione di lavaggio 2 (contenente etanolo) nella colonnina di *binding* riassembleata all'interno della provetta.
14. Centrifugare per 30 secondi a massima velocità, eliminare il liquido che ha attraversato la colonna e ripetere il passaggio di lavaggio.
15. Centrifugare per 2 minuti a massima velocità senza aggiungere alcuna soluzione, per far asciugare la resina della colonnina a cui è legato l'RNA.

Eluizione dell'RNA

16. Traferire la colonnina di *binding* in una nuova provetta da 1,5 ml e aggiungere 25µl di soluzione di eluizione direttamente al centro della resina, facendo però attenzione a non toccarla con il puntale, e attendere 1 minuto.
17. Centrifugare per 1 minuto a massima velocità (con il tappo della provetta aperto).

18. Nell'eluato è ora contenuto l'RNA totale purificato; mantenere la provetta con l'RNA in ghiaccio.

A questa fase, segue la necessaria quantificazione e la valutazione della qualità dell'RNA estratto.

3.5. Quantificazione ed analisi della qualità dell'RNA estratto

La quantificazione e la valutazione di possibili contaminazioni verificatesi durante l'estrazione sono state esaminate tramite lo strumento NanoDrop (NanoDrop Thermo Scientific Technologies, Fig. 6).



Figura 6: Thermo Scientific™ NanoDrop™ One.

Tale dispositivo, mediante una specifica analisi spettrofotometrica, permette di valutare, oltre alla concentrazione dell'RNA estratto, anche la presenza di eventuali sostanze interferenti come proteine o altri composti contaminanti come metaboliti secondari o polisaccaridi. Lo strumento sfrutta la proprietà che l'RNA (ma in generale il materiale genetico) assorbe la radiazione luminosa avente una lunghezza d'onda di 260 nm. È quindi noto che il valore di assorbanza pari a 1 rilevato a 260 nm corrisponda, per l'RNA, ad una concentrazione pari a 40 ng/μL: in questo modo, è possibile stimare le concentrazioni incognite conoscendo l'assorbanza misurata. Come detto precedentemente, oltre alla quantificazione, è possibile valutare la presenza di altri eventuali contaminanti, sfruttando sempre lo stesso concetto di assorbanza basato sul fatto che i contaminanti proteici, grazie ai residui aromatici, assorbono la radiazione a 280 nm, mentre altri contaminanti come metaboliti secondari o polisaccaridi assorbono la radiazione a 230 nm. Per

valutare, dunque, la qualità dell'RNA totale estratto si valutano i rapporti di assorbanza emersi a 260/280 e 260/230. In generale, si considerano estrazioni accettabili quelle che forniscono valori per A260/A280 pari o superiori a 1,8 e valori per A260/A230 compresi tra 1,8 e 2. Servendosi quindi del NanoDrop, è stata valutata la qualità dell'RNA per ognuna delle tre repliche biologiche di ogni campionamento per entrambe le condizioni di crescita. Lo strumento è stato ogni volta tarato con 1,5 µl di soluzione di eluizione utilizzata in precedenza per l'estrazione. Successivamente sono stati caricati nell'apparecchio 1,5 µl di RNA per ogni campione e si sono ottenuti quindi i valori di concentrazione e i due rapporti di assorbanza.

3.6. Analisi dell'integrità

Al fine di validare la completa riuscita delle precedenti estrazioni, si è verificata l'integrità dell'RNA totale ottenuto tramite corsa elettroforetica: estrarre ed impiegare RNA il più possibile integro è alla base delle successive tecniche impiegate per andare a confrontare in modo significativo l'espressione genica tra i due sistemi di crescita. La corsa elettroforetica si è svolta in gel di agarosio all'1% per circa 40 minuti, con una differenza di potenziale impiegata di 120 V. I vari campioni sono stati, quindi, caricati in un volume variabile, in relazione alle concentrazioni registrate al NanoDrop, raggiungendo per ciascun campione una quantità pari a 500 ng di RNA caricato. A seconda del volume caricato, è stata addizionata acqua fino al raggiungimento di un volume totale di 10 µL per ogni campione. Infine, in ogni campione, sono stati addizionati 2 µL di Loading Dye 6X, un reagente che permette di seguire visivamente la corsa del materiale genetico lungo il gel. L'integrità è stata valutata in base alla presenza delle due specifiche bande di riferimento del RNA ribosomiale 28S e 18S che, per via delle loro dimensioni, risultano visibili tramite tale analisi.

3.7. Retro-trascrizione

3.7.1. Trattamento con DNasi

Una volta valutata la qualità dell'estrazione, si procede con il necessario trattamento con DNasi: questo passaggio è fondamentale se si vuole andare a studiare l'espressione genica complessiva, poichè assicura l'assenza di eventuali componenti di DNA all'interno dei campioni. Per via della loro funzionalità, è essenziale che le DNasi impiegate vengano adeguatamente inattivate prima di procedere con le successive analisi, dal momento che andrebbero ad agire anche a livello dell'eventuale cDNA sintetizzato. Per questo motivo, al termine del trattamento, viene aggiunto uno

specifico buffer di inattivazione. In alcune di queste fasi vengono impiegati enzimi e per questo esse dovranno essere svolte facendo attenzione alle temperature necessarie a prevenire l'inadeguata degradazione di quest'ultimi. In questi casi le provette contenenti gli enzimi vengono refrigerate mediante l'utilizzo di un contenitore con all'interno del ghiaccio. Si procede, dunque, svolgendo il trattamento su 2000 ng di RNA per campione, aggiungendo acqua fino a raggiungere un volume finale di 17,5 μ L. Contemporaneamente, viene anche allestita una mastermix comune formata per ogni campione da 2 μ L di buffer, essenziale per lo svolgimento dell'attività delle DNAasi e 0,5 μ L di *TURBO DNasi*. Questa è stata poi miscelata e addizionata ad ogni campione da trattare in un volume pari a 2.5 μ L. Per favorire lo svolgimento dell'attività delle DNasi, i campioni sono stati incubati a 37 °C per circa 30 minuti mediante un termociclatore. Terminato questo passaggio, come detto anche precedentemente, segue la disattivazione dell'enzima attraverso l'aggiunta ad ogni campione di 2 μ L di *DNase Inactivation Reagent*, ponendo poi il tutto in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente. La fase successiva comprende la rimozione delle DNasi impiegate attraverso centrifugazione a 10000 g per 1,50 minuti, dove il surnatante generato viene poi utilizzato per le successive fasi di analisi.

3.7.2. Sintesi cDNA

Al fine di sintetizzare il cDNA a partire dall'mRNA presente nell'RNA totale estratto, i campioni trattati con le DNasi vengono addizionati di un oligo dT: è un oligonucleotide costituito esclusivamente da desossitimidine e rappresenta lo starter del processo di retro-trascrizione, ovvero un primer specifico in grado di appaiarsi alla coda di poliA presente esclusivamente a livello dell'mRNA. A tal proposito, viene allestita una mix che, per ogni campione trattato, sarà formata da 1 μ L di oligo dT in concentrazione 50 μ M, 1 μ L di dNTPs mix contenente i vari nucleotidi necessari al processo e 2 μ L di acqua sterile. I 4 μ L provenienti dalla mix sono stati poi addizionati ai vari campioni prescelti per la retro-trascrizione, che erano caratterizzati da un volume iniziale di 10 μ L. Questi poi sono stati adeguatamente incubati a 65 C° per 5 minuti nel termociclatore. La fase successiva comprende un passaggio in ghiaccio per circa 5 minuti, al fine di garantire lo shock termico necessario alla completa associazione delle regioni complementari. La procedura per la retro-trascrizione procede con l'allestimento di un ulteriore mix formata, per ogni campione, da 4 μ L di *Buffer 5X First Strand*, 1 μ L di DTT 0,1 M e 1 μ L di retro-trascrittasi *SuperScript III*. Questi 6 μ L vengono poi addizionati ad ogni campione e prontamente incubati a 50 C° per 60 minuti, in modo

tale che il processo di retro-trascrizione avvenga nelle migliori condizioni possibili. Trascorso il tempo necessario, la temperatura viene incrementata a 70 °C per 15 minuti, per inattivare completamente il processo. A questo punto, il risultato ottenuto è il rispettivo cDNA per la parte di campioni trattati, il quale, se adeguatamente sintetizzato, può essere impiegato per le successive fasi di studio.

3.7.3. Controllo dell'avvenuta retrotrascrizione

Prima di procedere con le analisi successive, al fine di valutare l'effettiva riuscita della retrotrascrizione, è stata svolta una PCR di controllo per uno specifico gene (VIT_16s0098g01190) codificante per un'ubiquitina, una proteina costitutivamente espressa in tutte le fasi di sviluppo del frutto. Il gene UBI codifica per una piccola proteina regolatoria ubiquitaria presente in tutti gli eucarioti. Essendo un gene costitutivamente espresso in tutte le cellule, indipendentemente dal tessuto e dallo stadio di sviluppo, la sua amplificazione fornisce un controllo affidabile per verificare la sintesi corretta del cDNA. Di seguito sono elencati i componenti della MIX (Tab. 3):

Tabella 3: Elenco dei componenti impiegati nelle loro concentrazioni iniziali e finali con associato il volume impiegato su 25 µL totali.

	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per reazione
Buffer 5X	5X	1X	5 mL
dNTPs mix	10 mM	0 mM	0,5 mL
Primer UBI FOR	20 mM	0,2 mM	0,5 mL
Primer UBI REV	20 mM	0,2 mM	0,5 mL
GoTaq polimerasi	5 U/mL	0,025 U/mL	0,13 mL
H2O	/	/	17,37 mL
Campione	/	/	1 mL
Totale			25 mL

I primers utilizzati nella MIX sono stati i seguenti:

1. **UBI For:** 5'- ATCCCAGTTGCTGACAATAC-3'
2. **UBI Rev:** 5'-GGCCCGCCATACTGGTGTGAT-3'

Per preparare la MIX, le quantità riportate sono state moltiplicate per il numero di campioni da analizzare in aggiunta di un campione di controllo, il quale è stato addizionato di 1µl di H₂O anziché

cDNA. Dalla mix ottenuta sono stati prelevati 24 mL di soluzione ai cui è stato aggiunto 1 mL di cDNA per ogni campione. La PCR si è poi svolta seguendo le seguenti indicazioni (Tab. 4):

Tabella 4: Ciclo di PCR attuato.

Passo	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Denaturazione iniziale	94 C°	5 minuti	1
Denaturazione	94 C°	30 secondi	25
Annealing	55 C°	30 secondi	
Estensione	72 C°	20 secondi	
Estensione finale	72 C°	5 minuti	1

Dopo aver completato la reazione di amplificazione del gene Ubiquitina, si procede all'analisi dei risultati mediante elettroforesi su gel. L'elettroforesi è un metodo di separazione degli acidi nucleici che sfrutta le cariche negative presenti nelle molecole di DNA e RNA per farle migrare attraverso un gel di agarosio in un campo elettrico verso l'elettrodo positivo. In questo caso, viene utilizzato un gel di agarosio all'2% in solvente TAE (Tris/HCl-acido borico-EDTA) 1X. Per rendere visibili i frammenti di DNA, viene aggiunto 6 µl/100 ml di SYBR Safe Stain™, un colorante che emette fluorescenza quando eccitato dai raggi UV.

3.8. Real Time PCR (qPCR)

La valutazione dell'espressione genica si è svolta impiegando la tecnica Real Time PCR (qPCR) "Real time Quantitative Reverse Transcript PCR". Tale analisi permette, infatti, di valutare la presenza di un determinato trascritto, in seguito a retrotrascrizione, in base al numero di cicli di PCR necessari a raggiungere una determinata fluorescenza, derivata dall'utilizzo del SYBR-GREEN, un intercalante genomico aspecifico, che assorbe ad una lunghezza d'onda di 488 nm ed emette ad una lunghezza d'onda di 522 nm. La qPCR in tempo reale combina la tecnica di PCR con la rilevazione in tempo reale dell'amplificazione. Durante l'esperimento, il campione di acido nucleico viene sottoposto a cicli di riscaldamento e raffreddamento ripetuti in presenza di una miscela reattiva contenente una DNA polimerasi, primer specifici per il bersaglio e una sonda fluorescente. La sonda fluorescente è progettata per ibridarsi in modo specifico alla sequenza bersaglio durante l'amplificazione. Durante i cicli di amplificazione, la DNA polimerasi sintetizza nuovi filamenti di DNA a partire dai primer, generando così copie multiple del bersaglio di interesse. Nel frattempo, la sonda fluorescente si

lega al bersaglio amplificato e rilascia un segnale fluorescente proporzionale alla quantità di DNA sintetizzato. Questo segnale fluorescente viene rilevato e misurato in tempo reale da un'apposita macchina denominata termociclatore o cycler. Per lo studio in esame si imposta e si registra il seguente programma di reazione (Fig.7):



Figura 7: Temperatura e cicli della q-PCR, ottenuti tramite l'utilizzo dello strumento Applied biosystem qPCR della marca Thermo Fisher.

Per la quantificazione della sequenza bersaglio nel campione, vengono utilizzati standard di calibrazione conosciuti, che consentono di costruire una curva di calibrazione. Questa curva correla il segnale fluorescente con la quantità iniziale di bersaglio presente nel campione. Utilizzando questa curva, è possibile determinare la quantità di acido nucleico bersaglio presente nel campione sconosciuto. Al fine di poter confrontare i vari campioni, il medesimo concetto è applicato a livello di un'ubiquitina costitutivamente espressa nella vite, che è stata considerata come gene di riferimento. L'analisi si è svolta secondo il protocollo descritto da (Zenoni et al., 2011) impiegando PCR Master Mix SYBR GREEN (Applied Biosystems) e QuantStudio. Le curve relative ad eventuali prodotti aspecifici generati durante l'amplificazione sono state identificate mediante il metodo delle curve di dissociazione. Dai dati ricavati, l'efficienza di amplificazione è stata calcolata mediante LingRegPCR software (Ramakers et al., 2003). Da protocollo, la normalizzazione dei valori di espressione emersi è stata calcolata, per ogni campione, impiegando come riferimento il relativo valore di espressione riconducibile all'ubiquitina costitutivamente espressa in vite, in accordo con l'equazione di Simon (Simon, 2003). Le sequenze dei primer impiegati in questa analisi sono riportate nella seguente tabella 5.

Tabella 5: Elenco dei geni selezionati in questo lavoro di tesi e dei rispettivi primer impiegati.

Gene	Nome dei primer	Sequenza (5'-3')
<i>VviNAC33</i>	Real Time NAC33 FOR Real Time NAC33 REV	TGCCCTGCTTCTCCGATATG CTGGCATTCTCCAAATATGG
<i>VviSGR1</i>	Real Time SGR1 FOR Real Time SGR1 REV	CCTGACCAGATGATCTTTACT CAGTAGCAATGCAAGTGCTTG
<i>VviBHLH75</i>	Real Time BHLH75 FOR Real Time BHLH75 REV	GGGCAGCAAAATCAATGGAGG TGCATGAGACTTTGGGAGTCA
<i>VviNAC60</i>	Real Time NAC60 FOR Real Time NAC60 REV	CTCCACACTCGGTCATCTC GGATGTCGTTGGATTGGCTG
<i>VviWRKY19</i>	Real Time WRKY19 FOR Real Time WRKY19 REV	CGGTGTAGACGGAAAAACCC TCTGTGTACAAAGGTGGAGGC
<i>VviAGL15</i>	Real Time AGL15 FOR Real Time AGL15 REV	TGCTCCTTTCATGGTTTCTACT AGATCAGACACTTGTGGGTGA
<i>VviUBI</i>	Real Time UBI FOR Real Time UBI REV	ATCCAGTTGCTGACAATAC GGCCCGCCATACTGGTGTGAT

Per effettuare la Real time è stato usato il kit commerciale GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) ed è stato seguito il seguente protocollo:

- Preparare 2 MIX comprendenti GoTaq Mix e H₂O (una per il gene d'interesse e l'altra per l'ubiquitina).
- Preparare delle eppendorf sterili da 1,5 ml.
- Diluire ogni campione di cDNA 1:10 per ottenere un volume finale di 16 µl (quindi 1,6 µl di cDNA e 14,4 µl di H₂O).
- Diluire i primers forward e reverse 1:10 (concentrazione finale 20 µM) in 10 µl: 1 µl di ogni primer in 9 µl di H₂O sterile.
- Aliquotare nelle eppendorf 19,5 µl di MIX (12,5 µl di GoTaq Mix + 7 µl di H₂O).
- Aggiungere 0,25 µl di UBI For + 0,25 µl di UBI Rev nella eppendorf relativa alla mix per l'ubiquitina
- Aggiungere 0,25 µl di primer forward per il *gene di interesse* + 0,25 µl di primer reverse per il *gene di interesse* nella eppendorf relativa alla mix per il gene d'interesse.
- Caricare la piastra per la Real time con 20 µl della mix per il gene d'interesse e della mix per l'ubiquitina.
- Aggiungere ad ogni pozzetto della piastra 5 µl di cDNA precedentemente diluito, per il bianco aggiungere 5 µl di H₂O.
- Caricare la piastra per la Real time.

Considerando che sono stati analizzati sei geni, ogni piastra con 96 pozzetti risultava essere occupata nella sua totalità. Trenta pozzetti per i campioni provenienti dalla camera di crescita e da pieno campo per il primo gene, trenta per il secondo gene e trenta per il gene codificante l'ubiquitina. Gli ultimi sei pozzetti risultavano essere occupati da due bianchi per ciascun gene d'interesse. Il bianco era costituito dalla stessa soluzione di partenza, ma invece di aggiungere il campione di cDNA, è stata aggiunta acqua sterile.

Successivamente i dati ottenuti tramite q-PCR sono stati elaborati, al fine di ottenere un andamento di espressione per ognuno dei sei geni analizzati. Sull'asse delle ascisse, si trova il tempo rappresentato in Giorni dall'invasatura mentre sull'asse delle ordinate è rappresentato il livello di espressione genica misurato in MNE (Maximum Normalized Expression). Infine, ogni istogramma presenta una barra verticale che indica la media della deviazione standard, ottenuta per ciascuna replica.

4. Risultati e discussione

4.1. Monitoraggio ambientale delle condizioni riscontrate in pieno campo

A tal proposito, i dati sono stati raccolti da una centralina ARPAV dislocata all'interno del comune di Buttapietra. I parametri analizzati riguardano principalmente l'andamento della temperatura media giornaliera, l'umidità giornaliera riscontrata e i livelli di precipitazione nell'arco temporale di sviluppo. Le temperature minime e le temperature massime di aprile sono state in media inferiori alla norma e sono risultate tra le più basse dal 1994, con uno scarto medio di $-1,3^{\circ}\text{C}$ per le minime e di $-1,0^{\circ}\text{C}$ circa per le massime. Anche gli apporti di precipitazione sono stati inferiori alla norma, in media del -18% circa (Agrometeo mese aprile 2023). Com'è avvenuto nel mese di aprile del 2021 e del 2022, anche l'aprile 2023 è stato caratterizzato da temperature in media inferiori alla norma, soprattutto nella prima decade durante la quale si sono misurate le temperature più basse del mese sia per le minime che per le massime con le differenze più importanti dalla norma rispetto alle altre due decadi. Nel mese di maggio le temperature minime hanno superato la norma di $+1,0^{\circ}\text{C}$ mentre, al contrario, le temperature massime sono state in media inferiori alle medie stagionali di $-0,8^{\circ}\text{C}$; i quantitativi di precipitazione sono stati superiori alle medie del periodo, in media poco più del 50% circa della norma (Agrometeo mese maggio 2023). Analizzando i dati di temperatura e di precipitazione del mese di giugno emerge che in questo mese le minime e le massime sono state più alte della norma, le minime di $+0,9^{\circ}\text{C}$ circa, quelle massime di quasi $+0,5^{\circ}\text{C}$; mentre per le precipitazioni è stato in media nella norma, contrariamente ai mesi di giugno degli anni 2021 e 2022, che sono stati piuttosto siccitosi (Agrometeo mese giugno 2023). Le temperature di luglio sono state in media superiori alla norma, le minime di $+1,0^{\circ}\text{C}$ e di circa $+0,5^{\circ}\text{C}$ le massime. Anche le precipitazioni sono state superiori alle medie del periodo, si può ritenere che abbia piovuto in media il 60% circa in più della norma (Agrometeo mese luglio 2023). Rispetto alla norma, agosto 2023 è stato più caldo: per le temperature minime in media di circa $+1,5^{\circ}\text{C}$, per le massime di $+0,3^{\circ}\text{C}$; le precipitazioni sono state in media leggermente superiori alle medie stagionali (Agrometeo mese luglio 2023).

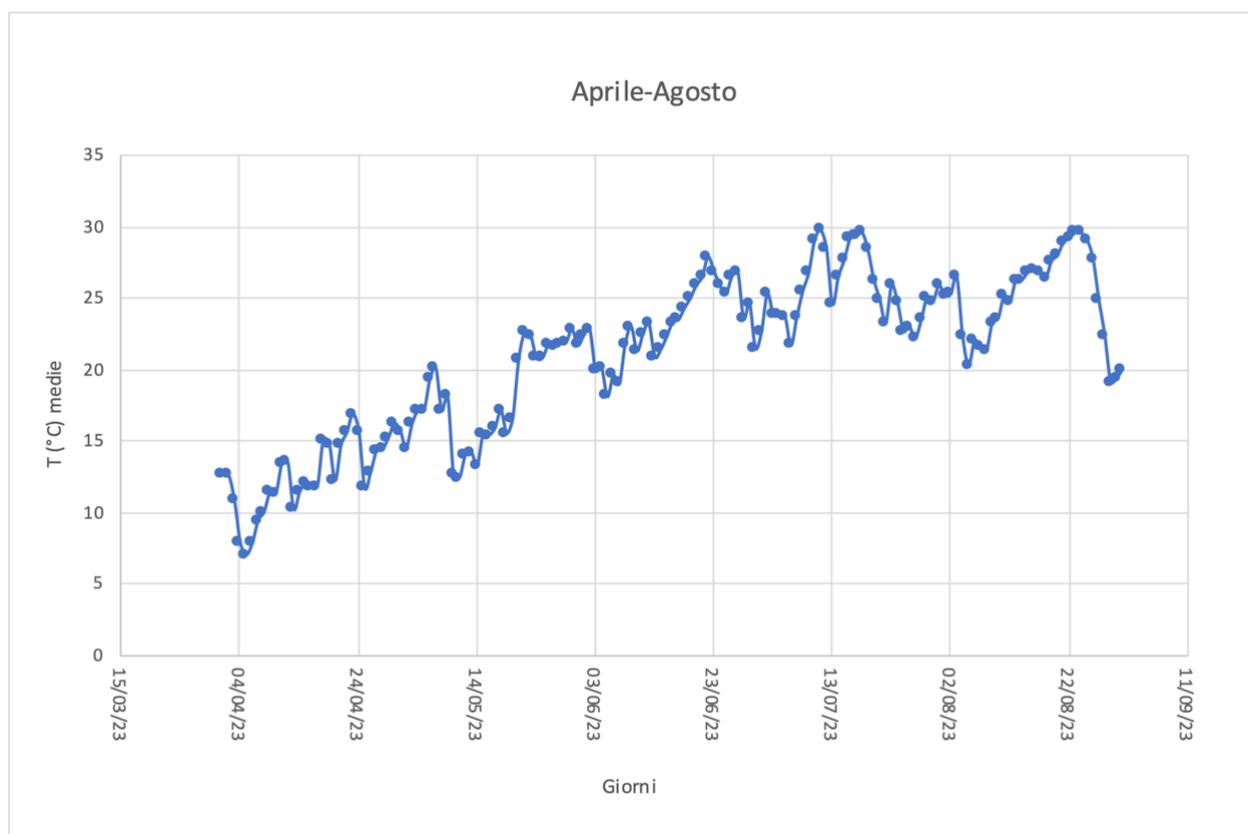


Figura 8: Andamento delle temperature medie nel periodo aprile-agosto 2023 rilevate dalla centralina ARPA della regione Veneto (VR).

Analizzando in particolare l'andamento delle temperature medie nel periodo aprile-agosto (Fig. 8) si può notare come nel primo mese non ci siano state escursioni termiche notevoli, infatti la temperatura media non ha subito grosse oscillazioni. Nel mese di maggio si è assistito nella prima settimana ad un aumento della temperatura media (di circa 3-4 °C), per poi subire un netto calo riportandosi su valori simili al mese precedente, per poi aumentare negli ultimi dieci giorni. Nel mese di giugno i valori di temperatura media sono rimasti costanti ed in linea con i giorni precedenti, fino a circa la metà del mese, quando poi si è osservato un innalzamento che ha attestato valori di 25-26 °C. A luglio la media è continuata a salire con picchi di 28-29 °C per poi calare nell'ultima settimana di 4-5 °C. La prima settimana di agosto ha mostrato un'ulteriore diminuzione, le successive due invece hanno evidenziato un nuovo aumento con picchi di 28-29 °C. Negli ultimi giorni si è assistito ad un calo della temperatura media con valori di 19-20 °C.

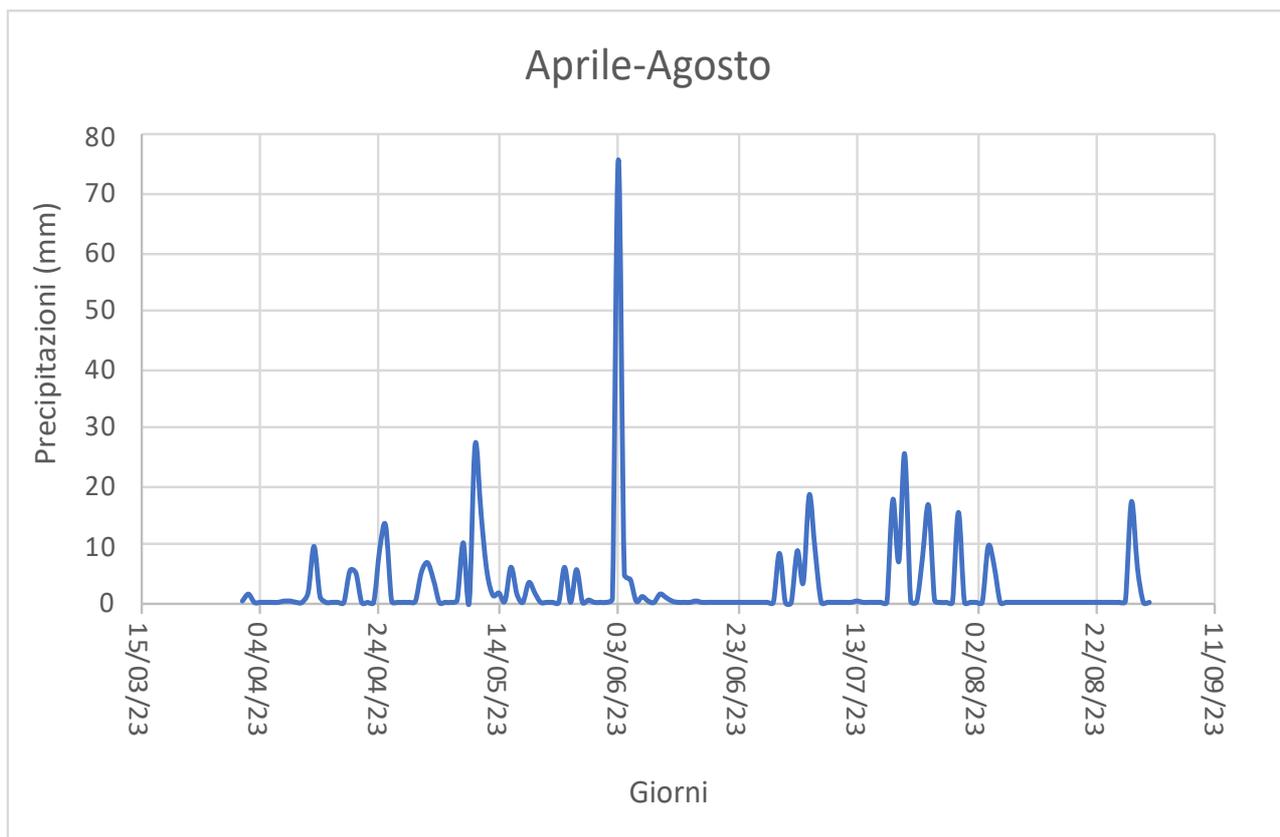


Figura 9: Andamento delle precipitazioni nel periodo aprile-agosto rilevate dalla centralina ARPA di Buttapietra (VR).

Analizzando in particolare l'andamento delle precipitazioni nel periodo aprile-agosto (Fig. 9) si nota come non ci siano stati eventi di grande portata se non si considera il picco avvenuto all'inizio di giugno.

Ad aprile le precipitazioni più importanti si sono registrate rispettivamente a metà e alla fine del mese, per un totale di 8 giorni piovosi, con 47 mm caduti (si considera giorno piovoso quando la precipitazione giornaliera è ≥ 1 mm). Nei restanti giorni non vi sono state piogge. Per quanto riguarda il mese di maggio si è assistito alla precipitazione più importante il giorno 10, per poi avere altri eventi minori successivamente. Nel complesso si sono verificati 15 giorni piovosi con un totale di 101 mm precipitati. All'inizio di giugno si è avuto il giorno con il picco di precipitazioni con 76 mm caduti, mentre gli ultimi dieci giorni hanno mostrato assenza di eventi. In totale ci sono stati 6 giorni piovosi con 98 mm di acqua caduti. Luglio ha concentrato gli eventi piovosi all'inizio e alla fine del mese. Si sono verificati 10 giorni piovosi con un totale di 130 mm di pioggia caduti. Agosto è stato il mese più siccitoso con 26 giorni di completa assenza di precipitazioni con i pochi eventi all'inizio e alla fine del mese. Si sono registrati 4 giorni piovosi con 39 mm caduti.

4.2. Analisi fenotipica e determinazione dei parametri di maturazione del frutto nelle due condizioni di crescita

Al fine di valutare il differente impatto del fattore ambientale sul processo di sviluppo e maturazione del frutto, l'andamento della crescita degli acini è stato monitorato settimanalmente attraverso una dettagliata analisi fenotipica. Questa analisi visiva è stata poi accompagnata da un ulteriore monitoraggio dei principali parametri caratterizzanti l'andamento del processo di maturazione degli acini.

4.3. Analisi fenotipica

Il processo di sviluppo e maturazione del frutto analizzato nella camera di crescita (Fig. 10) segue, sulla base di analisi visive, un andamento del tutto analogo a quello riscontrato in pieno campo (Fig. 11) ed entrambi sembrano rispecchiare la curva sigmoideale di crescita descritta nella figura 2 di questo lavoro di tesi. Tra i due ambienti di crescita, si sono riscontrate alcune differenze. Per quanto riguarda la fase di allegagione, in camera di crescita è avvenuta più rapidamente rispetto al pieno campo. L'intervallo di tempo tra l'antesi e la *veraison* (indicato come tempo 0 nelle Figure 10 e 11) nella camera di crescita è stato di 50 giorni, mentre l'intervallo di tempo tra i medesimi stadi fenologici in pieno campo è risultato essere di 80 giorni. La spiegazione di tale anticipo del processo emerso nella crescita in ambiente controllato può essere dunque legata alle specifiche e stringenti condizioni a cui le piante sono sottoposte, le quali potrebbero essere spinte ad incrementare la velocità dell'intero processo di maturazione. Un'altra differenza importante viene osservata nelle fasi finali del processo di maturazione. Infatti, in camera di crescita, ogni pianta ha sviluppato un singolo grappolo con dimensioni e numero di acini inferiori rispetto al campo. Inoltre, dopo l'invasatura procedendo con la maturazione, negli ultimi campionamenti è stata notata un parziale avvizzimento degli acini ed una colorazione più scura di quest'ultimi. Tali osservazioni potrebbero essere dovute alla ridotta disponibilità di nutrienti nell'ambiente, la quale potrebbe limitare la completa maturazione del frutto. Bisogna aggiungere che le migliori condizioni nutritive e di crescita a cui sono sottoposte le piante in pieno campo rispetto alla camera di crescita, garantendo la possibilità di generare acini con un adeguato livello di maturazione.

Anche se il processo risulta essere più ostico in camera di crescita, lo studio all'interno di ambienti controllati risulta essere utile poiché permette di incrementare le conoscenze relative alle risposte che la pianta attua in condizioni limitanti e difficili, potendo ricreare lo scenario climatico a cui le piante sono sottoposte in pieno campo e valutando le conseguenze ad esse associate.

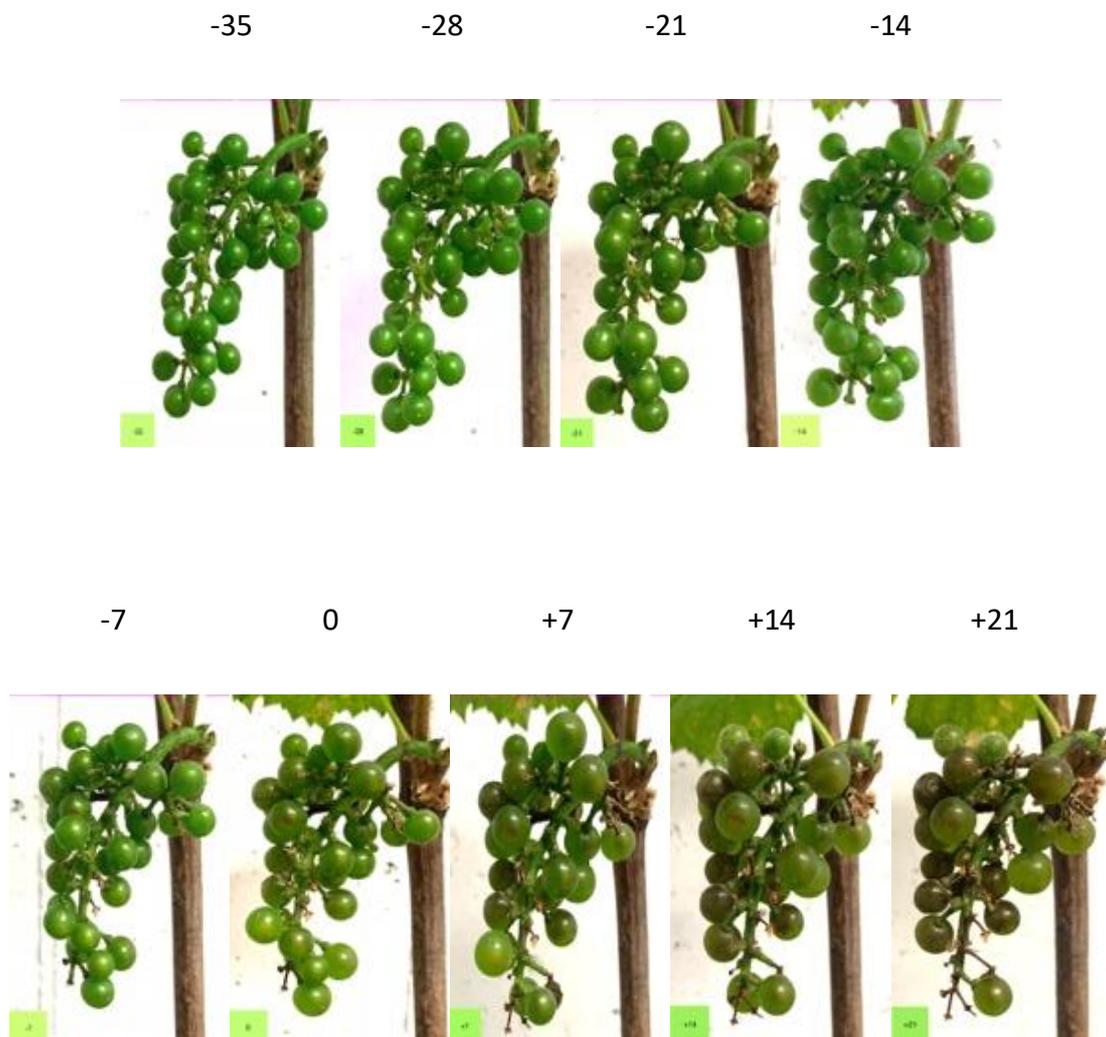


Figura 10: Sviluppo dei grappoli all'interno della camera di crescita. Partendo dall'immagine in alto a sinistra, si possono osservare i campionamenti effettuati identificati con i giorni pre e post in viaiatura, indicata come tempo 0.

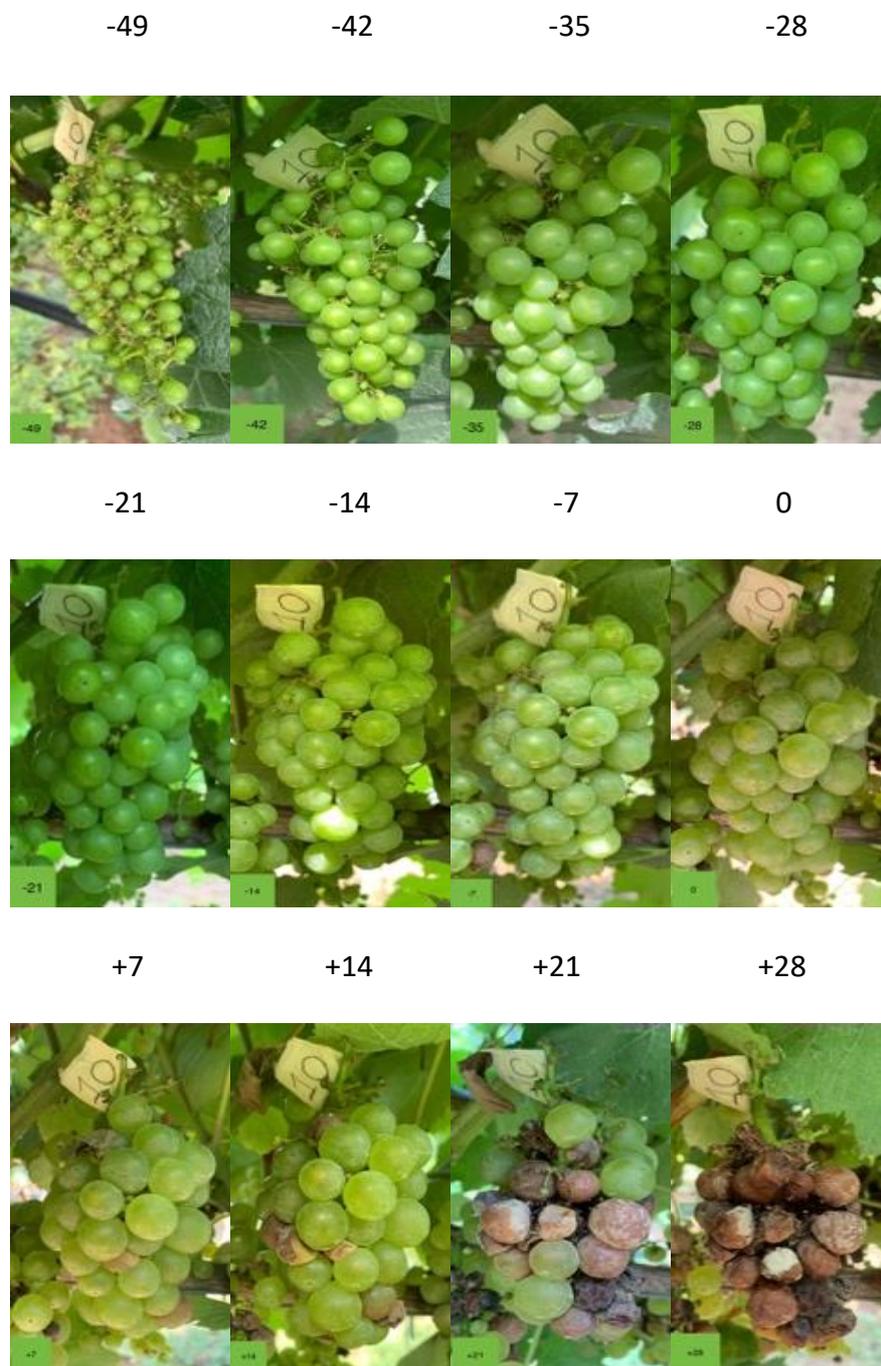


Figura 11: Sviluppo dei grappoli riscontrato in pieno campo. Sopra ogni grappolo è presente un numero che indica i giorni antecedenti e successivi rispetto all'invasiatura definita come tempo 0.

4.4. Determinazione dei parametri di maturazione

La maturazione in entrambe le condizioni è stata analizzata anche dal punto di vista fisiologico, monitorando l'andamento dei principali parametri ad essa associata. Nello specifico è stato monitorato: il peso medio degli acini, il grado zuccherino, il pH ed infine l'acidità. Nei grafici successivi si possono osservare le deviazioni standard ottenute, indicate con una barra verticale. Per avere un'analisi statistica più accurata bisognerà attendere i prossimi approfondimenti di tale studio. Le analisi del processo di maturazione si sono svolte nel momento successivo alla *veraison*, quando almeno il 50% degli acini del grappolo mostrava una marcata variazione nella colorazione e nella consistenza, sono state condotte per cinque campionamenti, uno a settimana, sia per quanto riguarda la camera di crescita e sia per quanto riguarda il pieno campo. Bisogna sottolineare che per via della scarsa disponibilità di acini nelle piante sviluppatasi in fitotrone, tale analisi è stata svolta su un numero differente di acini (80 per ogni campionamento per quanto riguarda il pieno campo e 64 per la camera di crescita). L'andamento della maturazione degli acini d'uva è caratterizzato principalmente da un aumento del peso, del grado zuccherino e del pH e da una moderata riduzione dell'acidità. Come si può vedere dalle Figure 12,13,14 e 15 questo andamento è risultato corretto per il pieno campo, mentre si sono riscontrate alcune leggere anomalie per gli acini maturati nella camera di crescita.

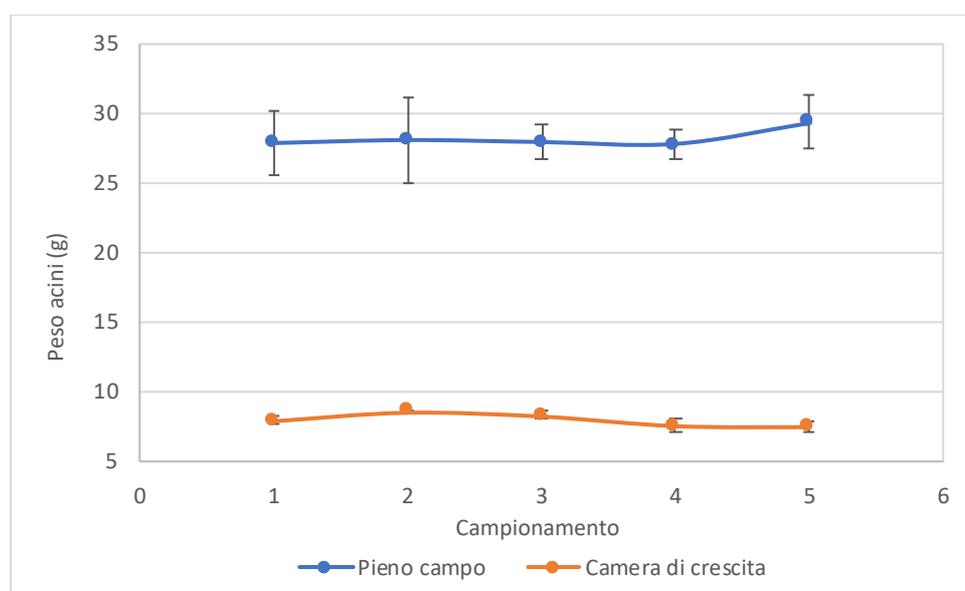


Figura 12: Andamento del peso degli acini riscontrato rispettivamente in pieno campo ed in camera di crescita. Le barre verticali indicano le deviazioni standard.

In relazione al peso degli acini (Fig. 12), esso è aumentato in entrambi gli ambienti, mostrando però differenze nelle fasi del processo. Infatti, si può notare come all'interno della camera di crescita tale sviluppo sia risultato in parte limitato, specialmente se si confrontano le fasi finali del processo di maturazione. Nel quarto e nel quinto campionamento si è riscontrato un decremento del peso degli acini. La spiegazione potrebbe derivare dal fatto che le condizioni stringenti riscontrabili all'interno di un ambiente controllato, rispetto al pieno campo, potrebbero andare ad influenzare il completo sviluppo *in primis* della pianta e, di conseguenza, anche del frutto, ottenendo acini più piccoli e con peso minore. In pieno campo, invece, la crescita è risultata omogenea lungo le varie fasi del processo e il peso è risultato non solo mantenuto, ma anche in continuo aumento, specialmente nelle ultime fasi della maturazione. Tale andamento potrebbe essere quindi dovuto proprio alla maggiore disponibilità di nutrienti riscontrabile in pieno campo rispetto alla camera di crescita.

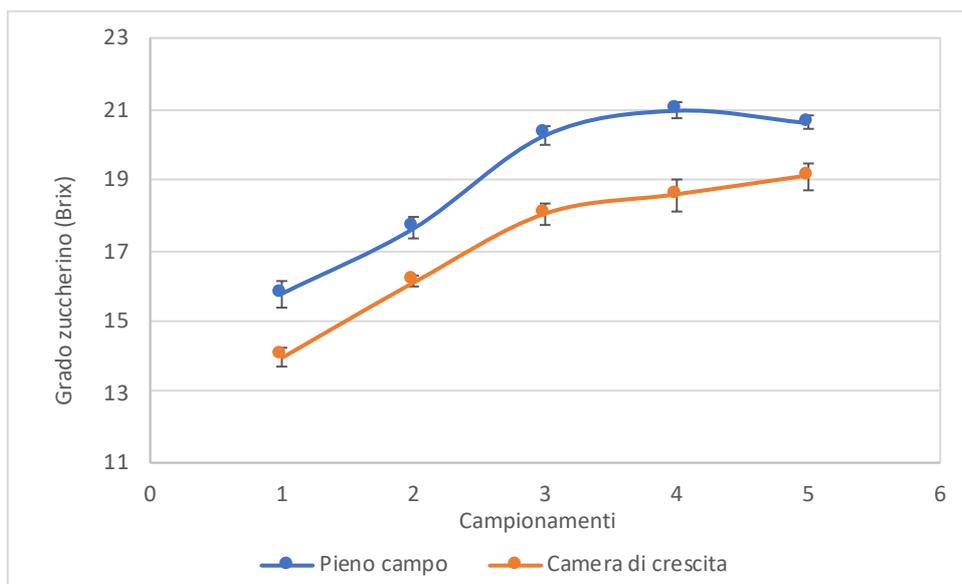


Figura 13: Andamento del grado zuccherino durante il processo di maturazione nelle due condizioni di crescita. Le barre verticali indicano le deviazioni standard.

L'andamento del grado zuccherino riscontrato rispecchia in parte le differenti condizioni di crescita a cui le piante sono sottoposte (Fig. 13). Le due curve mostrano un andamento simile. I grappoli in pieno campo, nelle ultime settimane di maturazione, accumulano gli zuccheri più velocemente rispetto ai grappoli, sviluppatisi in camera di crescita. Al termine dei campionamenti si evince una differenza di due gradi Brix tra le due situazioni con un valore di 21 per il pieno campo e di 19 per la

camera di crescita. La motivazione può risiedere nel fatto che in camera di crescita, nei giorni seguenti al campionamento degli acini dai grappoli, si notava un certo stress con parziali annerimenti di alcuni acini ed un disseccamento anche del raspo. Quindi si potrebbe assumere che le piante in tale ambiente limitante siano portate ad accumulare meno zucchero. Si evince quindi come in camera di crescita si ottengano grappoli più piccoli, con meno peso e meno contenuto zuccherino. La spiegazione di tale fenomeno risiede nel rallentamento delle ultime fasi di maturazione, che avviene in ambiente controllato.

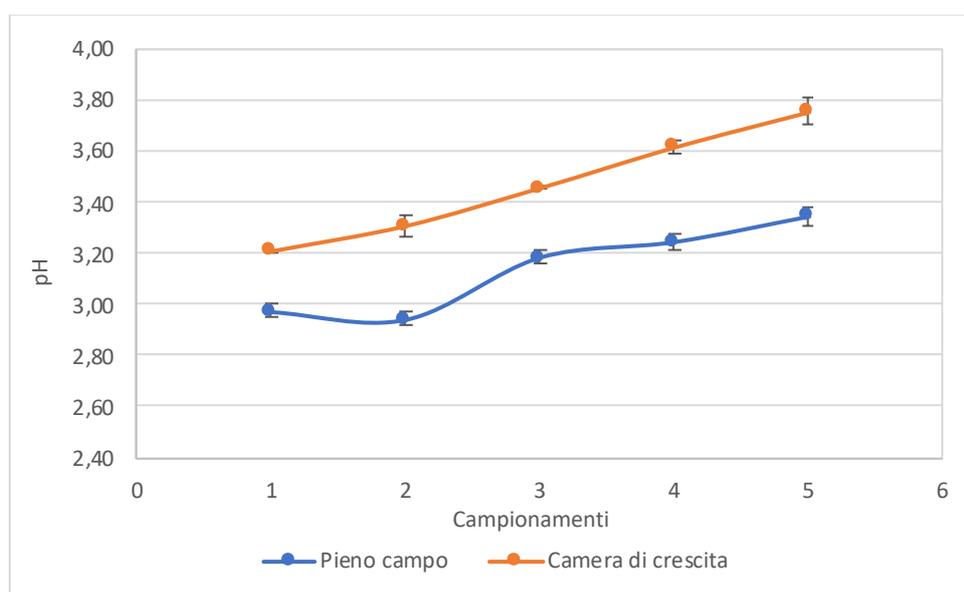


Figura 14: Andamento del pH durante il processo di maturazione nelle due condizioni di crescita. Le barre verticali indicano le deviazioni standard

In relazione al pH (Fig. 14), l'andamento è risultato essere leggermente differente tra le due condizioni di crescita. In pieno campo si può notare un aumento progressivo del pH, il quale rispecchia un normale progredire del processo di maturazione. In ambiente controllato l'andamento del pH è stato il medesimo, pur partendo e raggiungendo valori più alti. In questo caso si potrebbe affermare che la maturazione nella camera di crescita è risultata leggermente anticipata rispetto al pieno campo, motivando così un valore maggiore di pH (3.80) in confronto alla situazione di campo (pH=3.40).

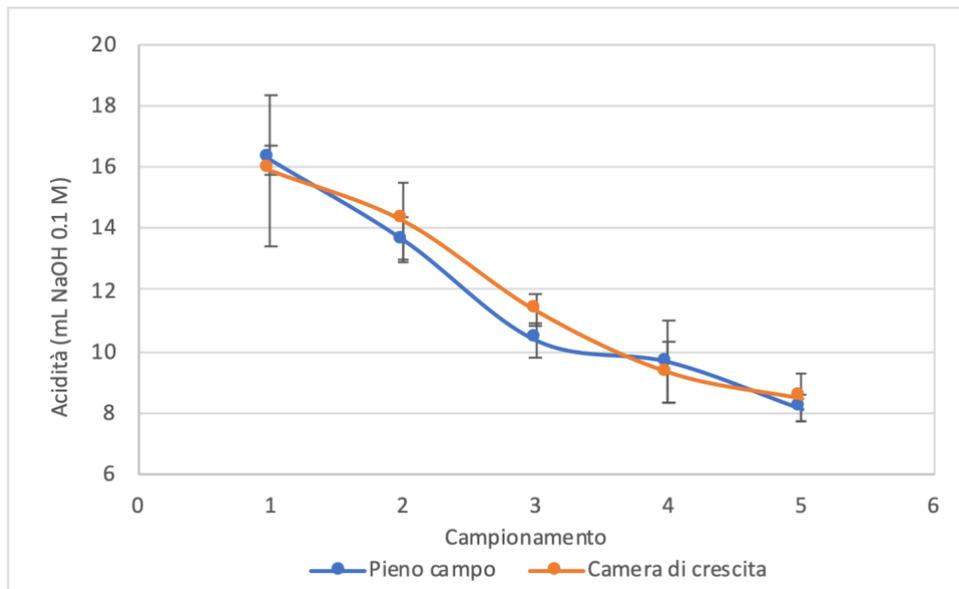


Figura 15: Andamento dell'acidità durante il processo di maturazione nelle due condizioni di crescita. Le barre verticali indicano le deviazioni standard.

Per l'acidità, si può osservare come, in pieno campo (Fig. 15), il decremento risulti molto graduale e nella norma del processo. In relazione all'andamento riscontrato nella camera di crescita, questo risulta in continua diminuzione, in modo minore rispetto a quanto riportato nella condizione di pieno campo. Anche in questo caso, quindi, tale andamento riscontrabile all'interno della camera di crescita potrebbe presupporre una modificazione del normale processo di maturazione, portando così ad una meno marcata diminuzione dell'acidità, raggiungendo un valore pressoché costante nel finale. In definitiva, da quanto emerge dai grafici sopra riportati, durante il processo di maturazione l'acidità è risultata essere in calo secondo le aspettative previste in entrambe le condizioni. In conclusione, il pieno campo garantisce parametri migliori per quanto riguarda il grado di maturazione del grappolo rispetto alla camera di crescita.

4.5. Valutazione del profilo di espressione dei geni selezionati nelle due condizioni di crescita

Il processo di maturazione del frutto tra le due diverse condizioni di crescita è stato infine analizzato anche da un punto di vista molecolare, monitorando l'espressione di specifici geni, alcuni dei quali sono stati identificati come putativi *master regulators* del processo di sviluppo e maturazione del frutto. Nello specifico, si è deciso di analizzare, tramite Real-time Reverse Transcription (RT)-PCR, il profilo d'espressione di 6 geni catalogati come *switch genes* (*VviNAC33*, *VviNAC60*, *VviBHLH75*, *VviSGR1*, *VviWRKY19* e *VviAGL15*) ((Palumbo et al., 2014); (Massonnet et al., 2017). Nel dettaglio, *VviNAC33*, *VviNAC60* e *VviBHLH75* risultano essere *markers* legati alla prima transizione,

riconducibile a 14 giorni prima dell'invasatura del frutto (Fasoli et al., 2018; D'Inca et al. 2021; D'Inca et al., 2023). *VviSGR1* è coinvolto nella degradazione della clorofilla e la sua espressione sembra essere attivata a monte proprio di *VviNAC33*. *VviWRKY19* amplifica il segnale di attivazione verso altri regolatori trascrizionali (Fasoli et al., 2018) dopo la sua attivazione da parte di *VviBHLH075*, che induce l'espressione di geni correlati all'ammorbidimento delle bacche. Inoltre, *VviWRKY19* risulta essere un marcatore della prima e della seconda transizione (Fasoli et al., 2018). Infine, *VviAGL15* risulta essere coinvolto nei processi metabolici dei carboidrati, nella modificazione della struttura della parete cellulare, eventi legati alla seconda fase della maturazione del frutto.

In seguito, il profilo d'espressione ottenuto per ogni gene selezionato è stato confrontato con quello emerso in un lavoro precedente (Fasoli et al., 2018), che ha analizzato l'espressione genica globale del frutto a diversi stadi di sviluppo su due diverse cultivar cresciute in pieno campo. Tale confronto viene principalmente impiegato per valutare se gli andamenti ricavati in questo lavoro di tesi sono in linea con quelli identificati in precedenza. Lo studio dell'espressione dei geni soprariportati è stato condotto soffermandosi principalmente a livello della transizione tra la fase verde del frutto e la fase matura (Fig. 16). Nello specifico, per entrambe le condizioni di crescita, le uve sono state campionate nei tempi riportati in Figura 10 e 11.

Successivamente è stata svolta l'estrazione dell'RNA totale dai campioni selezionati per poi effettuare, in seguito ad un trattamento specifico con DNasi, una retrotrascrizione dell'mRNA. Il cDNA così sintetizzato, è stato poi sottoposto ad analisi molecolare mediante Real Time PCR (qPCR) in modo tale da analizzare nel tempo l'espressione dei geni selezionati.

4.6. Quantificazione e valutazione della qualità dell'RNA estratto

Per ogni campione le bacche di Chardonnay sono state macinate in azoto liquido con l'ausilio di un mortaio e un pestello, avendo cura di separare i vinaccioli, ottenendo così una polvere finissima di pericarpo (intera bacca senza semi). L'RNA totale è stato estratto da circa 400 mg di pericarpo e quantificato tramite lo strumento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Nelle tabelle 6 e 7 sono riportati i valori ottenuti dalla quantificazione comprendenti la concentrazione e grado di purezza dell'RNA. I valori ottenuti indicano che i campioni sono puri. Sia dal punto di vista della concentrazione, sia dal punto di vista della qualità del materiale estratto, si può apprezzare come vi sia una netta differenza tra i campioni provenienti dalle due condizioni di crescita. Per quanto

riguarda i campioni provenienti dalla camera di crescita, nella maggior parte dei casi, l'estrazione si è rilevata efficiente sotto tutti i punti di vista. Per quanto riguarda, invece, i campioni da campo, l'estrazione è risultata in alcuni casi insoddisfacente, sia per la minore concentrazione del materiale estratto, sia per la presenza di contaminati, che hanno causato la diminuzione dei valori dei rapporti di assorbanza (A260/A230). Nel complesso, tale discrepanza può essere associabile alla differente composizione dei campioni derivanti dai due diversi ambienti di crescita. Infatti, per via dei molteplici fattori ambientali a cui la pianta di vite è esposta quando questa è coltivata in pieno campo, si pensa che l'acino prodotto sia molto più vigoroso rispetto agli acini prodotti da una pianta sviluppatasi all'interno di un ambiente controllato, che al contrario, per sua natura, risulta privo di stimoli ambientali evidenti. Un'altra spiegazione può essere basata sul fatto che in pieno campo la pianta ha a disposizione più fonti nutritive e idriche rispetto alle piante in fitotrone, e che queste portino a produrre acini maggiormente vigorosi e meno inclini all'estrazione del materiale genetico. Altri motivi possono essere inoltre legati alla possibile presenza di eventuali contaminanti chimici sulla superficie degli acini da campo, i quali andrebbero a limitare l'efficienza del protocollo impiegato. Bisogna inoltre sottolineare che la stagione 2023 in pieno campo, ha presentato diverse avversità per quanto riguarda la qualità e la sanità delle uve, poiché si sono susseguiti eventi quali attacchi di oidio, grandinate, marciume acido e attacchi di tignoletta. Tali fattori potrebbero aver influito negativamente quindi anche sull'estrazione dell'RNA per via della presenza di proteine o altro materiale genico in grado di comportarsi da interferente.

Tabella 6: Risultati qualitativi e quantitativi relativi all'estrazione dell'RNA dei campioni ottenuti in camera di crescita.

Condizione	Stage	Replica	Concentrazione ng/ μ L	A260/A280	A260/230
Camera di crescita	-28	1	343	2,16	2,29
		2	280	2,14	2,21
		3	377,3	2,14	2,13
	-21	1	292,4	2,14	2,25
		2	297,7	2,14	2,20
		3	351,7	2,14	2,15
	-14	1	262	2,13	2,05
		2	341	2,15	2,24
		3	281	2,13	2,13
	-7	1	200,4	2,14	2,26
		2	186	2,14	2,28
		3	372,4	2,14	2,21
	0	1	350,9	2,12	2,10
		2	314,1	2,13	2,11
		3	343,6	2,16	2,29
	7	1	242,6	2,14	2,22
		2	175,5	2,07	1,96
		3	205,9	2,07	1,92
	14	1	337	2,15	2,30
		2	277,1	2,13	2,20
		3	326,7	2,14	2,26
	21	1	342,8	2,15	2,29
		2	287,2	2,13	2,22
		3	320	2,14	2,27
28	1	382,2	2,15	2,25	
	2	262,6	2,11	2,09	
	3	359,5	2,14	2,17	

Tabella 7: Risultati qualitativi e quantitativi relativi all'estrazione dell'RNA dei campioni ottenuti in pieno campo.

Condizione	Stage	Replica	Concentrazione ng/ μ L	A260/A280	A260/230
Pieno campo	-49	1	612,0	2,14	2,26
		2	771,6	2,14	2,24
		3	401,4	2,01	1,55
	-42	1	455,8	2,13	2,13
		2	208,4	2,10	2,04
		3	363,9	2,11	2,07
	-35	1	267,7	2,10	1,99
		2	313,1	2,12	2,16
		3	296,7	2,11	2,10
	-28	1	202,8	2,09	1,92
		2	176,4	2,06	1,76
		3	194,4	2,08	1,86
	-21	1	163,9	2,09	2,05
		2	176,3	2,08	2,05
		3	132,0	2,06	1,94
	-14	1	196,1	2,08	1,90
		2	188,6	2,09	1,94
		3	165,0	2,07	1,80
	-7	1	264,3	2,12	2,18
		2	204,0	2,12	2,18
		3	244,6	2,10	2,04
	0	1	179,6	2,08	2,01
		2	212,4	2,11	2,00
		3	172,5	2,08	1,83
7	1	168,3	2,12	2,03	
	2	181,9	2,06	1,65	
	3	156,8	2,07	1,85	
14	1	461,8	2,11	1,88	
	2	417,9	2,12	2,10	
	3	409,0	2,11	1,87	
21	1	156,8	2,10	1,95	
	2	192,8	2,10	2,04	
	3	139,7	2,12	2,05	
28	1	167,9	2,09	1,99	
	2	148,8	2,08	1,93	
	3	149,2	2,10	2,06	

Per le successive analisi, sono stati considerati 5 tempistiche: il tempo 0, corrispondente alla fase della *veraison*, 21 e 7 giorni prima della *veraison* e 7 e 21 giorni dopo la *veraison* (Fig. 16). L'estrazione di RNA è stata svolta quasi immediatamente dopo ogni campionamento. Successivamente si è deciso di non analizzare tutti i campioni ma di concentrarsi solamente su questi cinque punti poiché sono proprio tali tempistiche che permettono di apprezzare chiaramente i cambiamenti di espressione nei geni che regolano le transizioni da frutto verde alla fase matura.

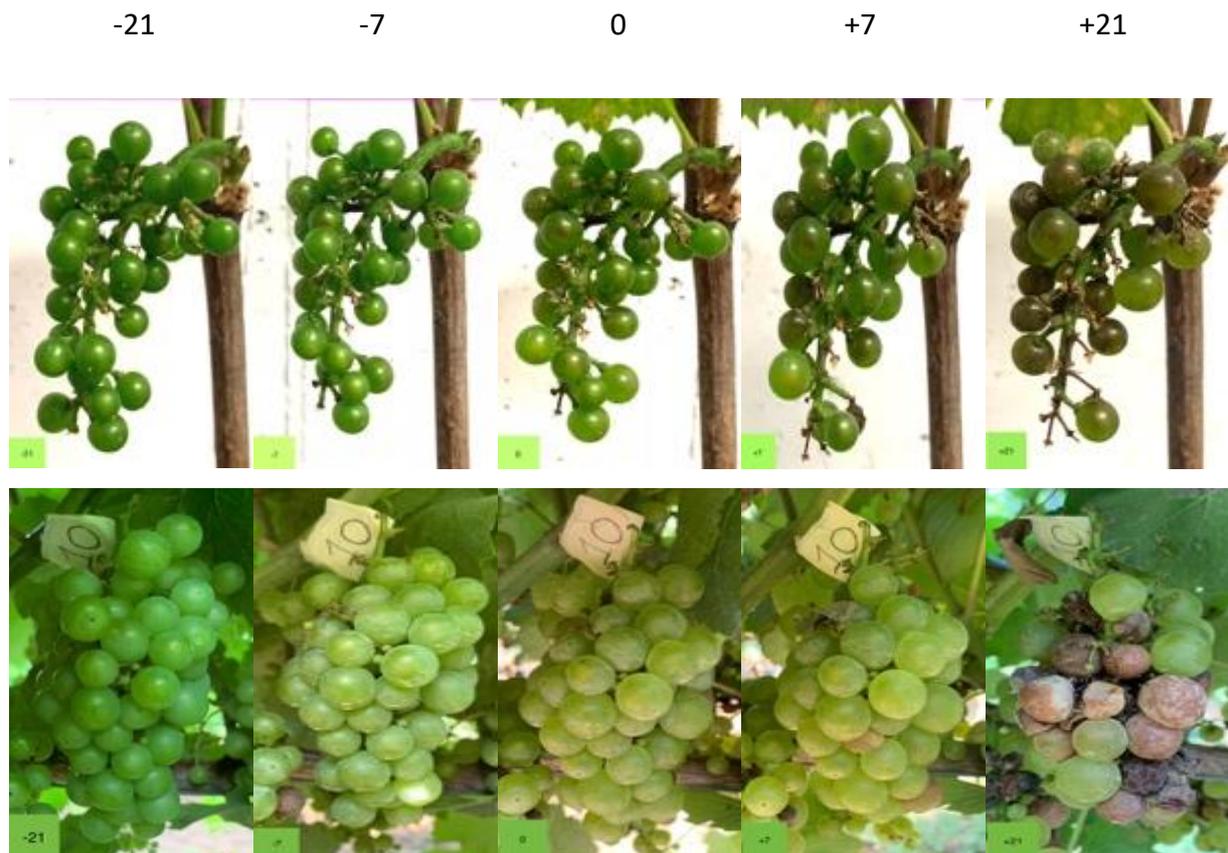


Figura 16: Fasi di sviluppo selezionate per l'analisi molecolare. In alto sono riportati i numeri che corrispondono ai giorni pre e post *veraison*, la quale viene indicata come tempo 0. Le prime cinque foto si riferiscono alla camera di crescita mentre le successive si riferiscono al pieno campo.

In aggiunta, è stata valutata l'integrità dell'RNA estratto mediante un'opportuna corsa elettroforetica su gel di agarosio, permettendo così di osservare eventuali ed indesiderate degradazioni del materiale estratto (Fig. 17).

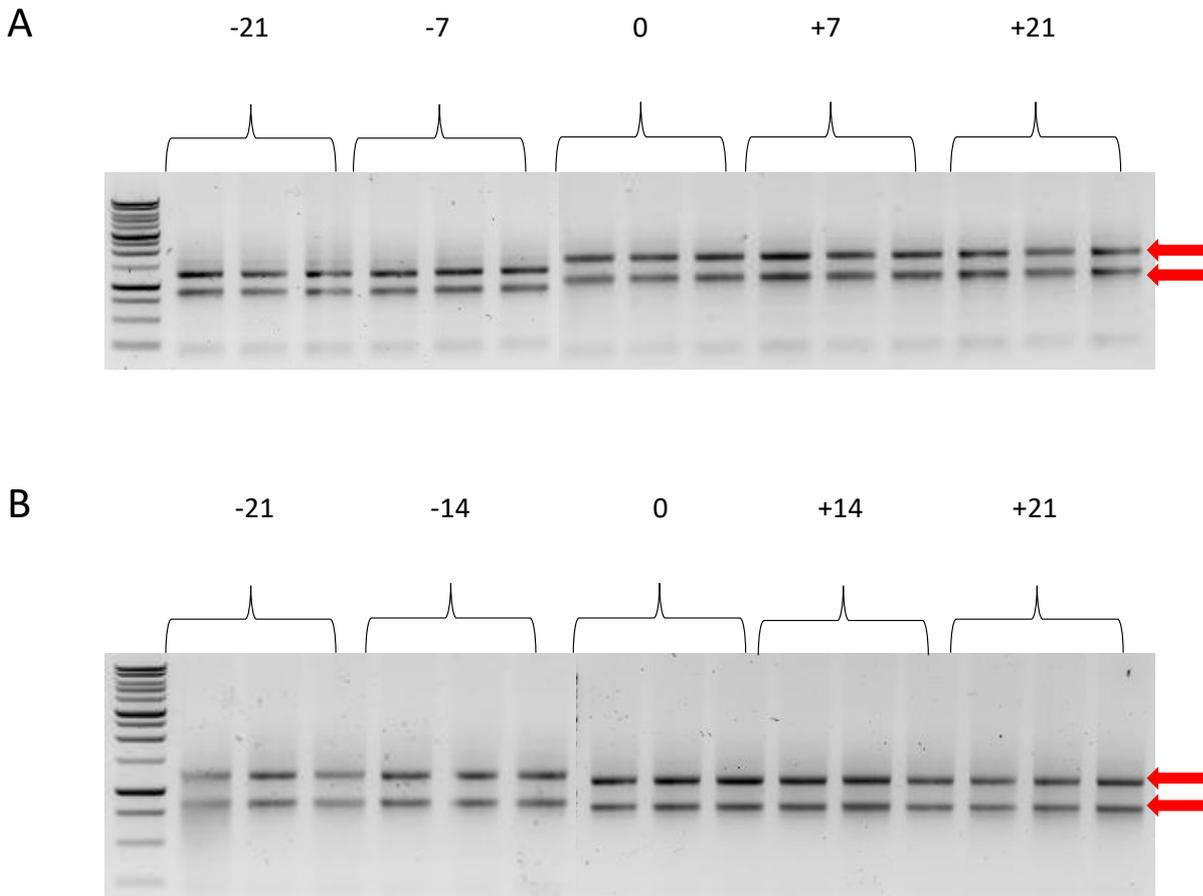


Figura 17: In alto (A) è riportata l'integrità dell'RNA dei campioni della camera di crescita mentre in basso (B) è riportata l'integrità dei campioni riconducibili al pieno campo. Con la lettera M si identifica il marker (1 Kb), mentre i numeri si riferiscono ai giorni rispetto all'invasiatura dei vari campionamenti.

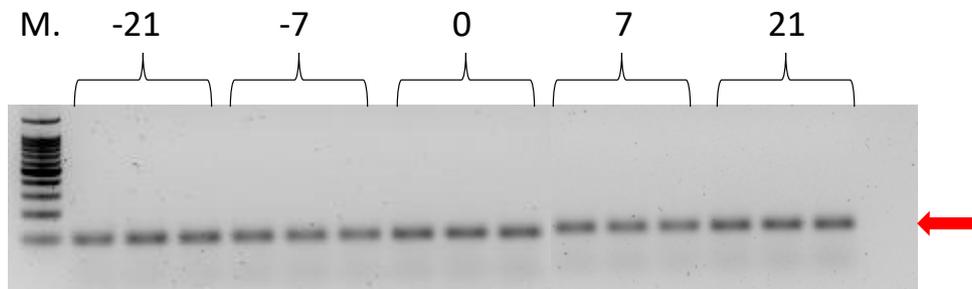
In tutti i campioni si notano due bande, corrispondenti alle subunità 18s e 28s dell'RNA ribosomiale. Gli RNA sono quindi integri e utilizzabili per retrotrascrizione. Tra i campioni relativi al pieno campo, nella prima e nella terza replica a -21 giorni dall'invasiatura si può notare una leggera degradazione, ma poiché le bande riconducibili all'RNA ribosomiale 28S e 18S sono visibilmente riconoscibili il materiale è stato considerato utilizzabile per le successive analisi. Per quanto riguarda i campioni

provenienti dalla camera di crescita, soltanto in un campione, quello a -21 giorni dall'invasatura, le due bande risultano essere meno visibili, probabilmente a causa di una ridotta concentrazione, ma ad ogni modo ben definite. Nel complesso, tutti gli RNA sono utilizzabili per retrotrascrizione.

4.7. Sintesi del cDNA e conferma dell'avvenuta retrotrascrizione

Per avere la certezza di sottoporre al processo di retrotrascrizione esclusivamente la componente in riferimento all'RNA, è stato svolto un preventivo trattamento basato sull'impiego di DNasi, ovvero una classe di enzimi in grado di degradare esclusivamente la possibile porzione di DNA presente all'interno dei campioni. In seguito a tale trattamento, un'aliquota è stata sottoposta a retrotrascrizione specifica. Impiegando oligo dT si è quindi voluto retrotrascrivere esclusivamente la porzione di mRNA presente all'interno dei campioni, sfruttando il fatto che solo tale componente presenta all'estremità 3' del filamento, una coda formata da una successione di adenine. La corretta sintesi del cDNA è stata poi valutata mediante PCR sul gene codificante un'ubiquitina costitutivamente espressa nella vite (VIT_16s0098g01190). Il gene è stato utilizzato come controllo. Questo perché, dopo tale trattamento, solo in presenza del cDNA correttamente sintetizzato è stato possibile generare l'amplificato specifico. A tal proposito, per validare l'efficacia del trattamento basato sull'utilizzo di DNasi si è deciso di svolgere il medesimo controllo anche su un'aliquota trattata, ma non sottoposta poi a retrotrascrizione. In questo modo, in caso di riuscita del trattamento, tali campioni non dovrebbero presentare amplificati a causa della completa rimozione della porzione riconducibile al DNA.

A



B

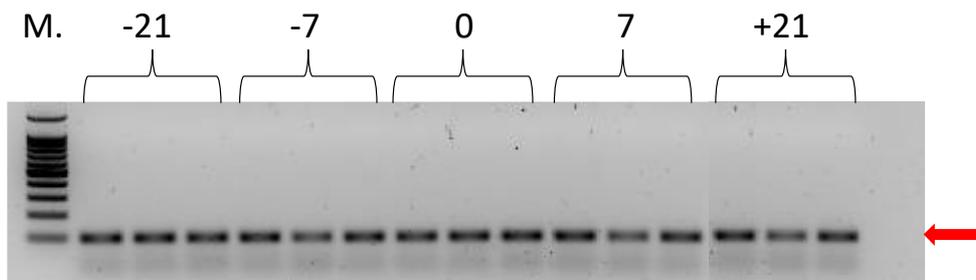


Figura 18: Corsa elettroforetica del prodotto di reazione di PCR sui campioni provenienti dalla camera di crescita (A) e sui campioni provenienti dal pieno campo (B). La freccia indica 100 bp. M = marcatore 100 bp; -21,-7, 0, 21, 7: giorni dalla veraion; C.N.= controllo negativo (è stata utilizzata acqua sterile al posto del templat).

L'ampiezza dei frammenti amplificati dai primers utilizzati è pari a 100bp. Dalla fig. 18, si può apprezzare come in entrambe le condizioni, i campioni siano stati sottoposti correttamente a retrotrascrizione, mostrando tutti una banda corrispondente alle 100 bp, riconducibile all'amplificato derivante dal gene relativo all'ubiquitina. Gli amplificati derivanti dai campioni sottoposti a retrotrascrizione sono stati riportati in figura nella riga a fianco della banda identificata con la lettera M. In entrambi i casi, i campioni di controllo negativi hanno dato l'assenza di una banda specifica, validando, così, i risultati ottenuti. Sia quelli provenienti dalla camera di crescita (Fig. 18A) che quelli dal pieno campo (Fig. 18B), sono stati correttamente retrotrascritti.

4.8. Analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR (qPCR)

4.8.1. *VviNAC33*

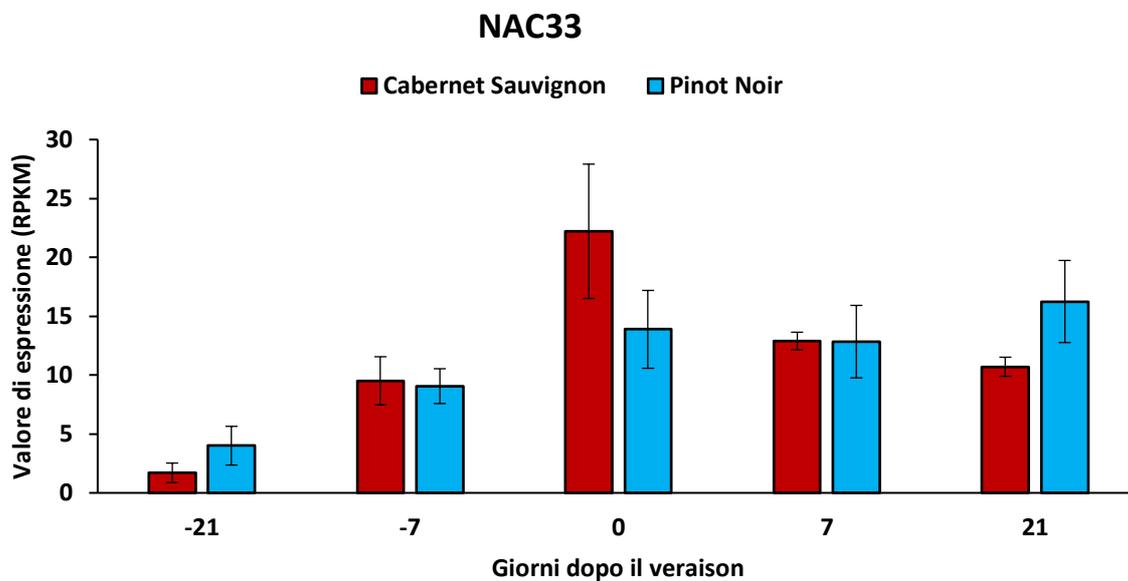


Figura 19: Profilo di espressione del gene *VviNAC33* in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir (Fasoli et al., 2018).

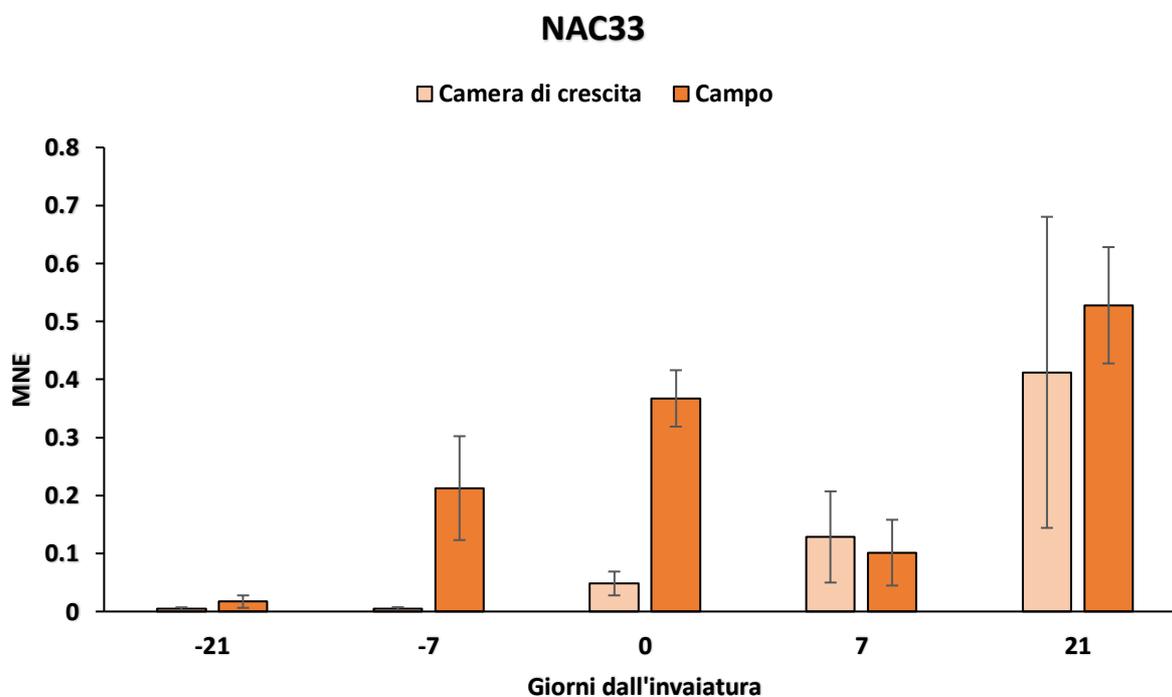


Figura 20: Profilo di espressione del gene *VviNAC33* nelle due condizioni di crescita analizzate in Chardonnay. MNE = Mean normalized expression.

È stata condotta un'analisi semi-quantitativa Real-time RT-PCR sui cDNA ottenuti precedentemente per determinare i profili di espressione dei geni presi in esame in questo lavoro di tesi al fine di confrontarli con quelli emersi in (Fasoli et al., 2018). Per ciascun gene sono stati usati primers specifici, validati da PCR. L'espressione di ciascun gene è stata misurata come livello di espressione relativa MNE (*mean normalized expression*) rispetto all'Ubiquitina. Nei grafici ottenuti è presente la deviazione standard, indicata con una barra verticale. Sarà possibile avvalersi di un'analisi statistica più approfondita negli ulteriori studi che verranno condotti su tali risultati ottenuti.

Per ognuno dei 6 geni selezionati vengono dunque riportati due grafici, uno relativo al profilo di espressione in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir ottenuti nel precedente lavoro ed uno relativo al profilo d'espressione in Chardonnay nelle due condizioni di crescita analizzate in questo lavoro.

Per quanto riguarda VviNAC33 (Fig. 19), sia in Cabernet che in Pinot si nota un aumento nell'espressione del gene nelle fasi antecedenti la *veraison*, con un marcato picco di espressione all'invasatura in Cabernet Sauvignon. Dopo l'invasatura, in Cabernet vi è una diminuzione dell'espressione mentre in Pinot un leggero aumento.

Confrontando tali dati con quelli emersi in questo lavoro di tesi (Fig. 20) si può constatare come i profili si discostino nei due esperimenti su Chardonnay. Infatti, il profilo d'espressione registrato in pieno campo risulta essere in crescita fino all'invasatura, segue un calo d'espressione a 7 giorni dall'invasatura per poi raggiungere il picco a 21 giorni dall'invasatura. Per quanto riguarda, invece, l'andamento riscontrato all'interno della camera di crescita, il profilo d'espressione del gene aumenta con il progredire della maturazione raggiungendo il picco 21 giorni dopo l'invasatura.

Si può quindi affermare che Chardonnay abbia un profilo d'espressione nettamente differente rispetto alle altre due varietà a bacca nera considerate nel lavoro di (Fasoli et al., 2018). Un'ipotesi per spiegare tale comportamento può derivare dal fatto che VviNAC33 appartiene alla famiglia genica NAC, la quale riveste un ruolo fondamentale nella risposta della pianta agli stress abiotici; per tale motivo potrebbe risultare maggiormente espressa quando la pianta risulta esposta a particolari condizioni limitanti, come ad esempio quelle riscontrate all'interno di una camera di crescita. Essendo, poi, tale gene un'importante fattore di trascrizione, vengono in attivati in successione, diversi target molecolari. Un esempio è legato proprio all'andamento riscontrato nel gene VviSGR1, che è risultato essere uno dei principali *target* di VviNAC33 (D'Inca et al., 2021). VviSGR1 viene attivato a monte da VviNAC33, andando poi a catalizzare importanti attività legate alla degradazione di alcune componenti delle clorofille. Quest'ultimo, dunque, viene considerato di primaria importanza nella transizione molecolare che si registra nel frutto a livello della *veraison*.

4.8.2. *VviSGR1*

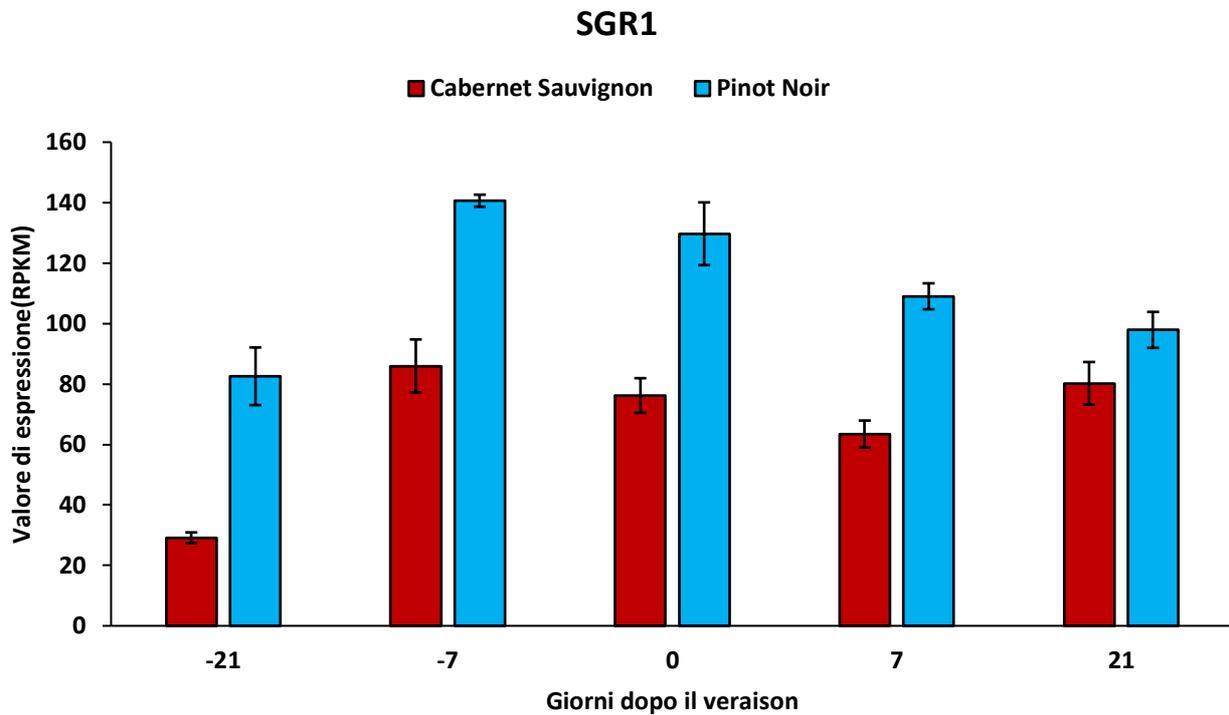


Figura 21: Profilo di espressione del gene *VviSGR1* in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir (Fasoli et al., 2018).

I risultati emersi per il gene *VviSGR1* in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir (Fig. 21) (Fasoli et al., 2018) sembrano confermare il possibile collegamento tra l'espressione di tale gene e l'attività relativa al fattore di trascrizione *VviNAC33*, mostrando per entrambe le varietà un profilo di espressione in parte associabile a quello riscontrato nel grafico riportato precedentemente (Fig. 19) (Fasoli et al., 2018). Nello specifico, è apprezzabile come Cabernet Sauvignon mostri un picco di espressione non più in relazione alla *veraison*, ma 7 giorni prima di quest'ultima, proprio quando si registra anche un incremento di espressione per il gene *VviNAC33*, per poi gradualmente diminuire nella seconda parte del processo di maturazione. In relazione, invece, all'andamento riscontrato per Pinot Noir, questo risulta del tutto simile a quello di Cabernet Sauvignon, mostrando però differenze per quanto riguarda i livelli di espressione.

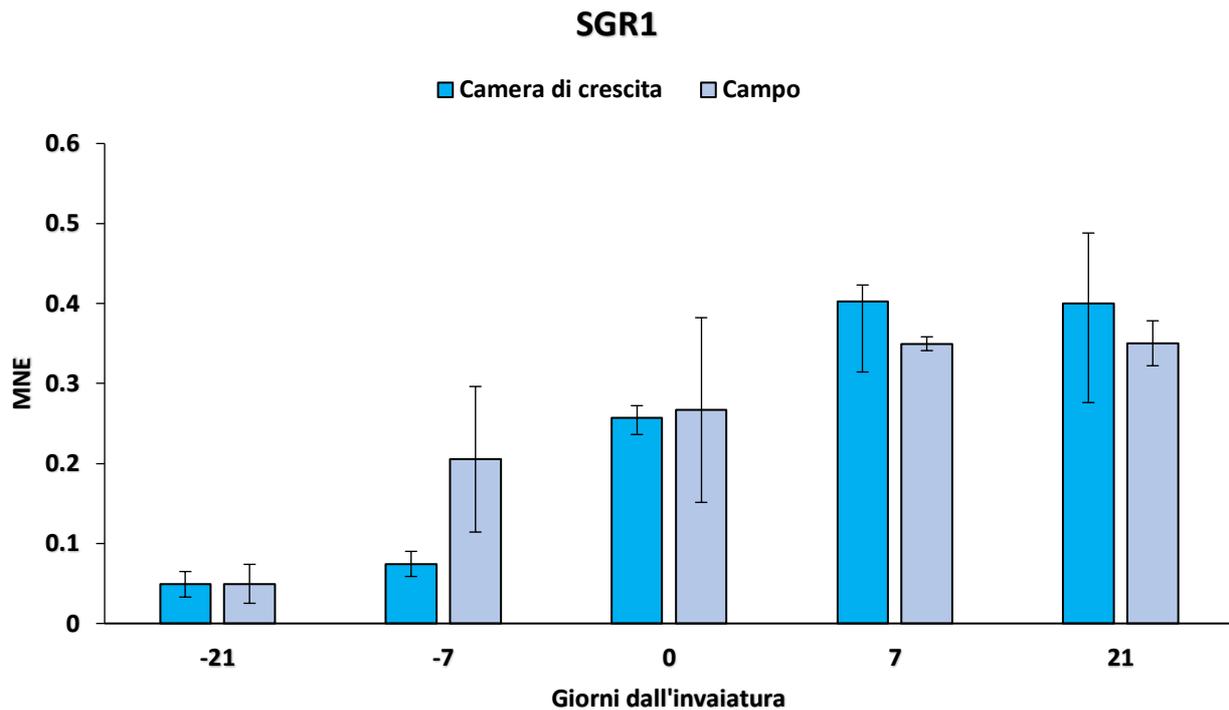


Figura 22: Profilo di espressione del gene *VviSGR1* nelle due condizioni di crescita analizzate in Chardonnay. MNE = Mean normalized expression.

Per quanto riguarda, invece, i profili di espressione riscontrati in questo lavoro i risultati riportati in figura 22 non mostrano evidenti differenze nelle due differenti condizioni di crescita. In pieno campo si osserva un marcato incremento di espressione fino al *veraison*, rimanendo costante nelle ultime fasi analizzate. Per ciò che concerne, invece, lo sviluppo all'interno della camera di crescita, l'andamento è risultato essere in parte differente a quello riscontrato in pieno campo poiché risulta in costante aumento. In entrambe le condizioni fino all'invaiaatura *VviSGR1* è maggiormente espresso in campo rispetto alla camera di crescita con un'inversione del trend a 7 e 21 giorni dall'invaiaatura. Rispetto a quanto emerge dai profili in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir si può quindi affermare che Chardonnay mostri un comportamento differente. In definitiva, in entrambe le condizioni è apprezzabile come l'andamento di *VviSGR1*, importante nel processo di maturazione, non risulti comparabile con l'andamento di espressione emerso nelle due condizioni di crescita per il gene *VviNAC33*, evidenziando quindi che in Chardonnay non vi è un'attivazione a monte causata da quest'ultimo fattore di trascrizione. Inoltre, dai dati è possibile evidenziare un importante ruolo dell'ambiente sull'espressione di tali geni, i quali mostrano un andamento del tutto differente, in relazione al luogo di sviluppo impiegato. I possibili effetti delle condizioni stringenti riscontrabili all'interno della camera di crescita sull'espressione relativa al gene *VviNAC33* potrebbero quindi

essere considerati uno dei principali *input* alla base della grande variabilità fenotipica della vite, essendo quest'ultimo un'importante fattore trascrizione.

4.8.3. *VviNAC60*

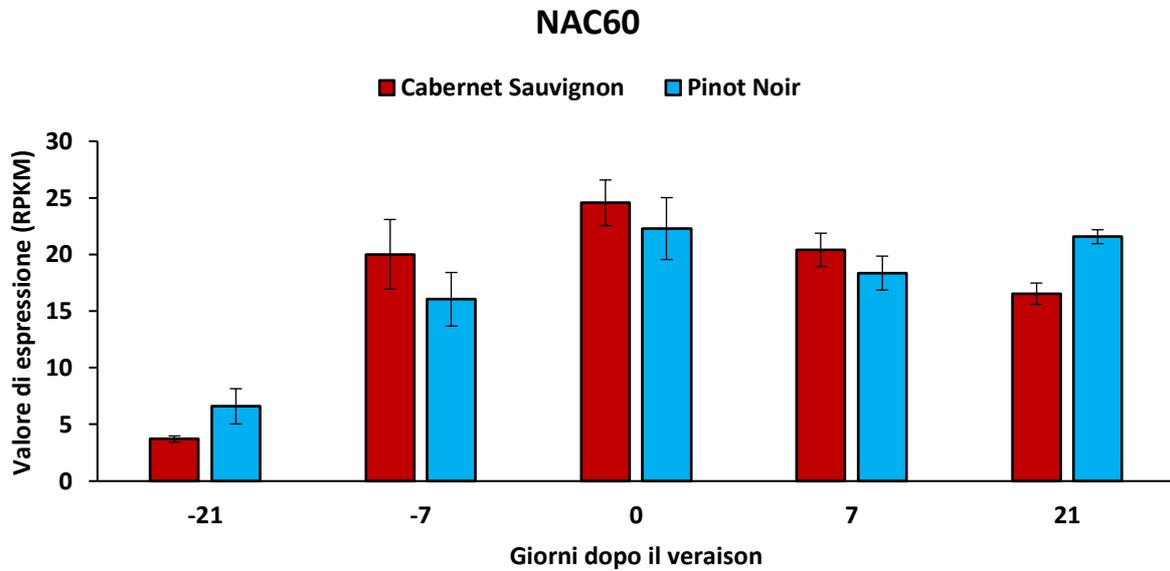


Figura 23: Profilo di espressione del gene *VviNAC60* in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir (Fasoli et al., 2018).

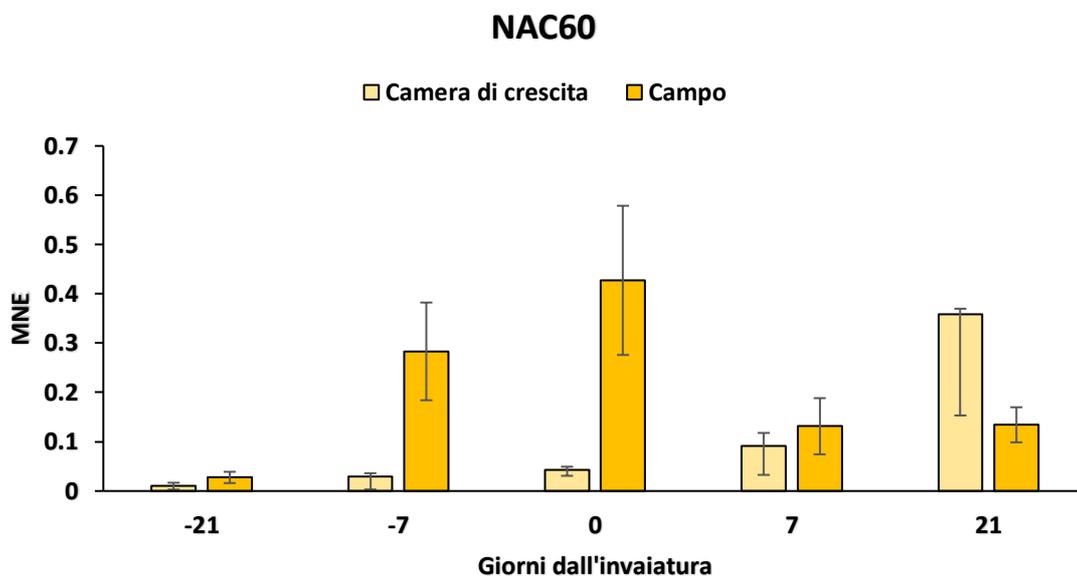


Figura 24: Profilo di espressione del gene *VviNAC60* nelle due condizioni di crescita analizzate in Chardonnay. MNE = Mean normalized expression.

In merito a *VviNAC60*, in Cabernet Sauvignon l'espressione aumenta fino alla *veraison* per poi diminuire leggermente dopo la maturazione, mentre in Pinot aumenta fino all'invasatura, scende a 7 giorni dopo la *veraison* per poi tornare ad un livello simile all'invasatura a 21 dopo tale fase (Fig. 23). L'espressione registrata in Chardonnay in pieno campo è risultata simile a quello di Cabernet, mentre in camera di crescita l'andamento di espressione è caratterizzato da una crescita costante fino ad arrivare ad un massimo nell'ultimo campione analizzato (Fig. 24). Si può quindi presupporre, come per il gene *VviNAC33*, che vi sia una spiccata incidenza dell'ambiente sull'espressione del suddetto gene. Questa causerebbe un mantenimento del livello d'espressione nella seconda parte della maturazione nel caso in cui lo sviluppo del frutto avvenga in presenza di evidenti condizioni stringenti per la pianta. Inoltre, *VviNAC60* è responsabile della differente modulazione dei geni che si sono visti essere *target* molecolari di tale fattore di trascrizione. Tra questi geni selezionati si trovano *VviWRKY16* (VIT_06S0004G07500), appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione WRKY, i cui membri sono coinvolti in molti processi associati alle risposte allo stress, *VviNAC26* (VIT_01S0026G02710), un gene NAC coinvolto nella determinazione della dimensione finale dell'acino d'uva (Tello et al., 2015) e una GALACTINOL SYNTHASE (VIT_05S0077G00430), coinvolta nella regolazione della segnalazione degli zuccheri (Bertini, 2019).

4.8.4. *Vv*bHLH75

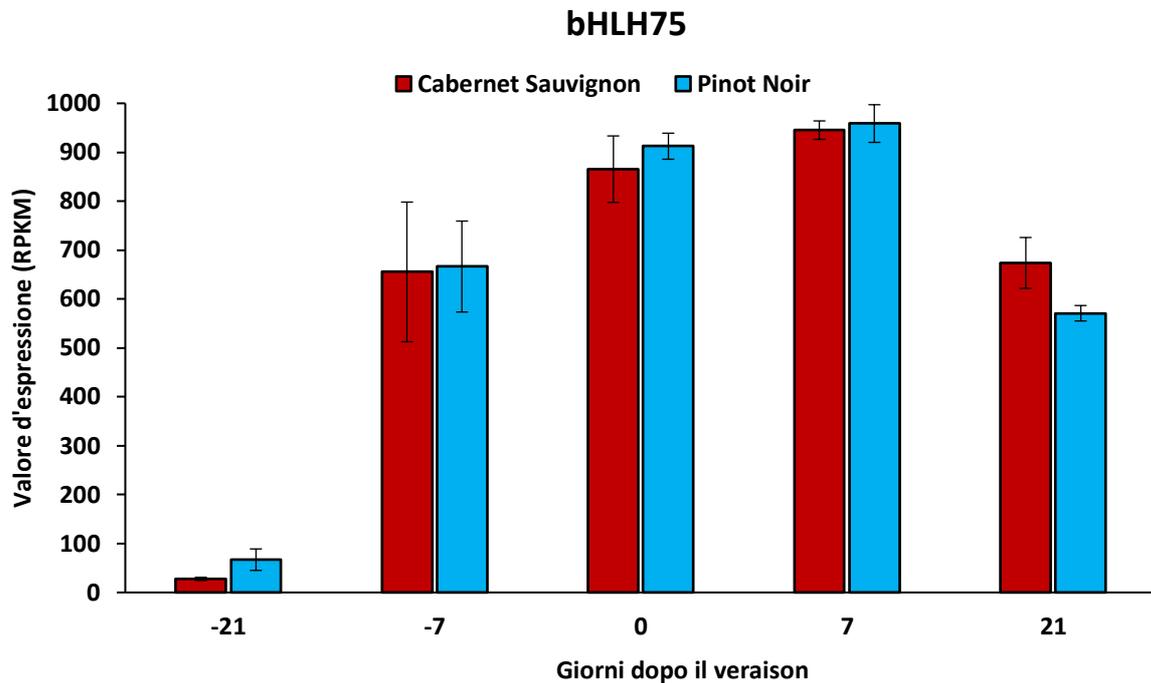


Figura 25: Profilo di espressione del gene *Vv*bHLH75 in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir (Fasoli et al., 2018).

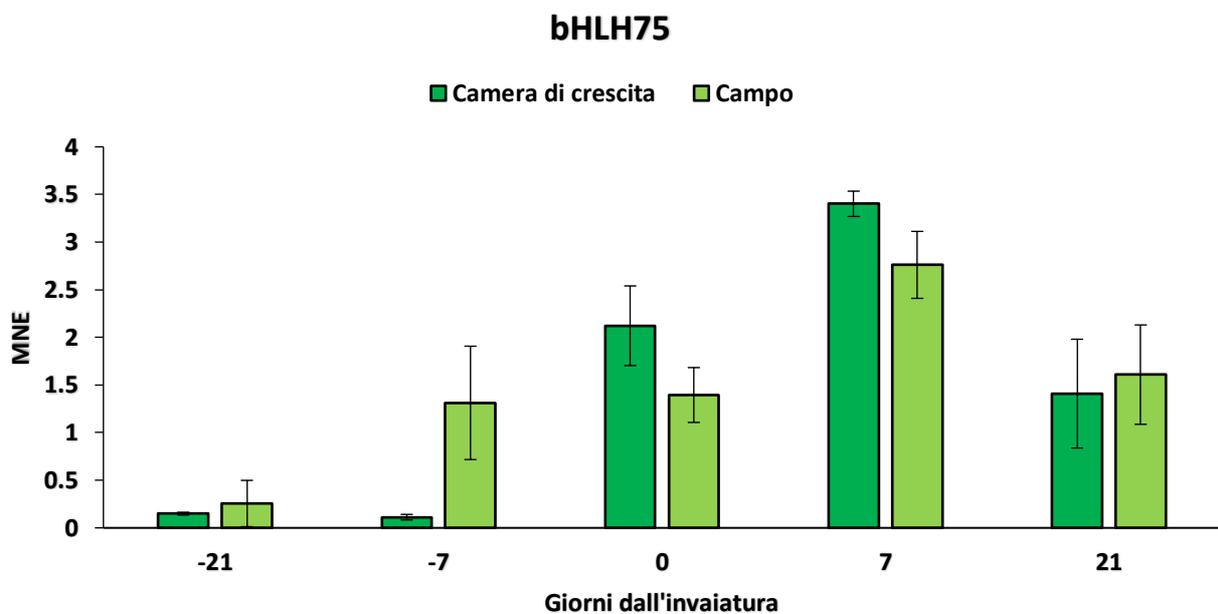


Figura 26: Profilo di espressione del gene *Vv*bHLH75 relativo nelle due condizioni di crescita analizzate in Chardonnay. MNE = Mean normalized expression.

Per quanto riguarda *VvibHLH75*, i profili di espressione sono risultati simili sia in Cabernet e Pinot (Fig. 25) che in Chardonnay in entrambe le condizioni (Fig. 26), con un aumento fino a 7 giorni dall'invasatura e un leggero calo a 21 giorni. In Chardonnay l'espressione di *VvibHLH75*, un importante regolatore trascrizionale di molteplici geni legati alla seconda fase del processo di maturazione, risulta essere marcatamente anticipata in riferimento al pieno campo, mostrando un evidente incremento 7 giorni prima della *veraison*. Tutto ciò avviene anche in camera di crescita, dove però l'incremento è risultato essere meno accentuato nella prima fase per poi aumentare in relazione alla *veraison* e per i successivi 7 giorni. Sia per la condizione di pieno campo sia per la camera di crescita il picco d'espressione si è avuto in corrispondenza dei sette giorni dopo l'invasatura. La più elevata espressione nella seconda fase del processo riscontrabile in entrambe le condizioni e nei lavori precedenti conferma il ruolo del suddetto gene nell'attivazione dei processi legati alla seconda fase della maturazione. Tra i target molecolari importanti nella seconda fase del processo di maturazione si trovano un CHAPERONE BCS1 MITOCHONDRIAL, tre enzimi della famiglia del citocromo P450s (CYPs) (VIT_18s0001g09660, VIT_18s0001g11540, VIT_18s0001g11450), una wall kinasi di parete associata 1 (WAK1) e una GERMIN-LIKE PROTEIN 3, confermando un ruolo specifico di *VvibHLH75* nella regolazione dell'omeostasi cellulare, dei processi cellulari e della trasduzione del segnale (Bertini, 2019). Vi sono molti geni coinvolti nella biosintesi dei fenilpropanoidi e dei flavonoidi e molte STILBENE SINTASI. Inoltre, molti altri geni sovra-regolati codificano per enzimi coinvolti nella modifica, nella regolazione della struttura e nel rimodellamento dei componenti della parete cellulare come la POLYGALACTURONASE GH28, una PECTINESTERASE (VIT_07s0005g01930), una PECTATE LYASE (VIT_17s0000g09810), le espansine *VviEXPA17* e *VviEXPB3* e due β 1-3 GLUCANASI (VIT_08s0007g06060 e VIT_08s0007g06030) (Bertini, 2019).

L'effetto della camera di crescita sul comportamento dei geni risulta importante non tanto nel mantenere attiva l'espressione, quanto nell'anticipare quest'ultima, come nel caso in cui la pianta risulti sottoposta a stringenti condizioni di crescita, simili a quelle riscontrate nelle ultime annate influenzate dai cambiamenti del clima.

4.8.5. VviAGLa15

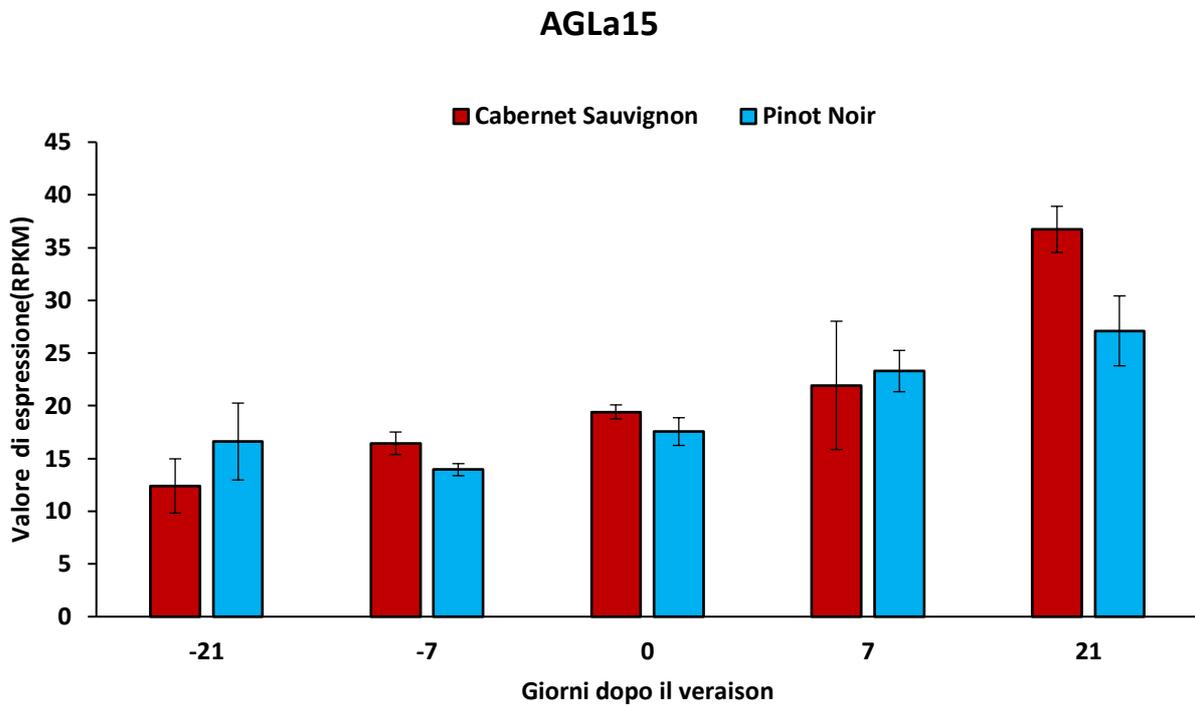


Figura 27: Profilo di espressione del gene VviAGLa15 in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir (Fasoli et al., 2018).

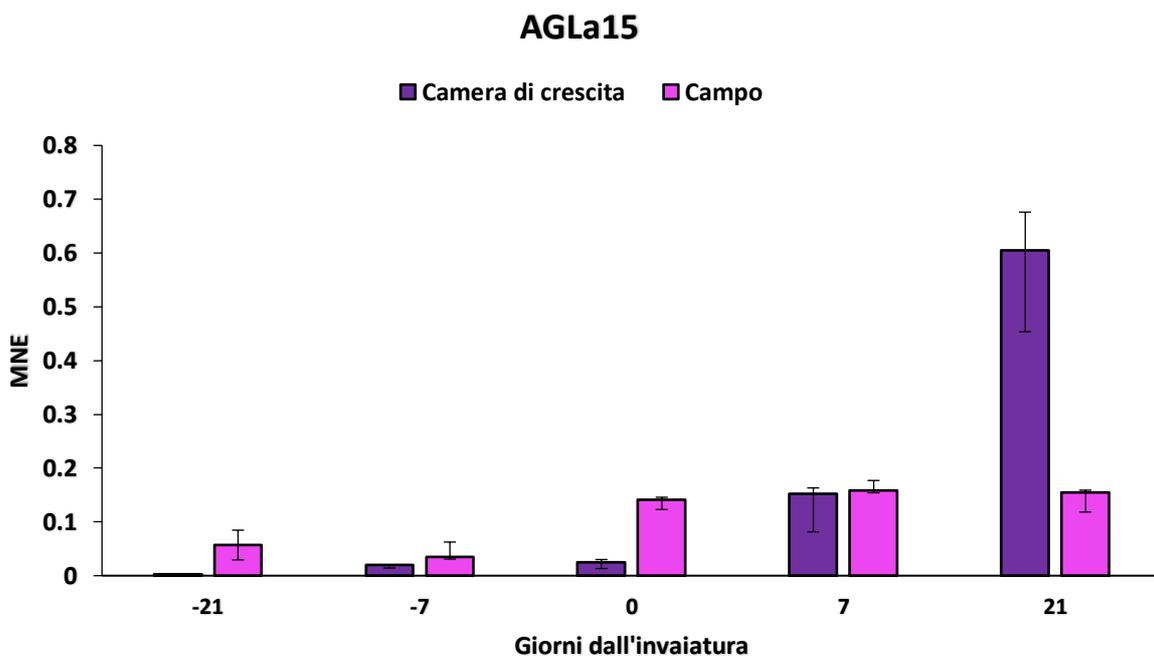


Figura 28: Profilo di espressione del gene VviAGLa15 nelle due condizioni di crescita analizzate in Chardonnay. MNE = Mean normalized expression.

Riguardo a *VviAGL15*, nello studio di (Fasoli et al., 2018) sia l'andamento che i valori di espressione sono risultati simili e comparabili tra le due varietà Cabernet e Pinot, mostrando un incremento graduale lungo le fasi del processo di maturazione con un picco a 21 giorni dall'invasatura (Fig. 27). Per quanto riguarda, invece, i profili di espressione riscontrati in questo lavoro di tesi (Fig. 28), vi è una marcata differenza dei livelli di espressione riscontrati tra le due condizioni di crescita: in pieno campo l'espressione aumenta all'invasatura per rimanere costante anche nei due successivi stadi di maturazione analizzati. In camera di crescita, invece, si nota un aumento di espressione più tardi, a 7 giorni dopo l'invasatura per arrivare ad un picco a 21 giorni dopo. Tale andamento è simile a quello riscontrato in Cabernet Sauvignon. Grazie a studi precedenti (Soldà, 2020), si potrebbe associare il differente andamento emerso nelle due condizioni di crescita con il relativo grado di consistenza degli acini sviluppati. Questo perché è stato riscontrato come in vite, attraverso una over-espressione transiente di tale gene (Bertini, 2019), si riesca a generare una progressiva e marcata attivazione di specifici target molecolari, successivamente citati, deputati al rimodellamento della parete cellulare. A tal proposito, infatti, gli acini derivanti dallo sviluppo all'interno della camera di crescita hanno mostrato in generale una minore consistenza e fragilità, la quale potrebbe essere associata all'espressione maggiore di tale gene derivante dalle specifiche condizioni ambientali di sviluppo. In entrambe le condizioni ambientali viene confermato il ruolo associato a tale gene, che si è visto essere un putativo *master regulator* in grado di innescare l'attivazione o la disattivazione di specifici target molecolari, importanti specialmente nella seconda fase del processo della maturazione. Tra i geni bersaglio si trovano molti XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE, enzimi coinvolti nella modifica della struttura della parete cellulare (Bertini, 2019). La sovra-regolazione di un elevato numero di questi geni indica che essi sono un bersaglio specifico di *VviAGL15a*, suggerendo un suo ruolo nella modificazione della parete cellulare che avviene durante la maturazione delle bacche. Un altro target putativo di *VviAGL15a* è rappresentato da *VviERF045*, appartenente alla famiglia dei geni *ERF/AP2*, una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti in vari processi (Licausi et al., 2010). *VviERF045* regola diversi processi cellulari implicati nella maturazione delle bacche: la biosintesi delle cere, la morfologia della cuticola e, probabilmente, la struttura della parete cellulare nelle cellule epidermiche, i quali portano a un ammorbidimento e a un'espansione dell'acino. Inoltre, è stato osservato che *VviERF045* ha un effetto sulla down-regolazione di geni importanti per l'accumulo delle clorofille e una up-regolazione in molti geni correlati alla resistenza ai patogeni, suggerendo che la sua attivazione

aumenti la difesa delle piante attivando il sistema di difesa immunitaria di base (Leida et al., 2016). Questi risultati suggeriscono che *VviERF045* è un bersaglio di *VviAGL15a*, che, pertanto, potrebbe svolgere un ruolo nelle risposte mediate dall'etilene. Infine, altri bersagli putativi sono la *FERONIA RECEPTOR-LIKE KINASE*, il secondo gene più sovra-regolato, la cui funzione risiede nella trasduzione del segnale per regolare la crescita in risposta a forze meccaniche interne o esterne, e la *BTB/POZ DOMAIN-CONTAINING PROTEIN*, indicando che *VviAGL15a* potrebbe essere coinvolto nella trasduzione del segnale e nella regolazione di altri fattori di trascrizione. In generale si può notare che l'espressione del gene aumenta con il progredire della maturazione (Bertini, 2019).

4.8.6. *VviWRKY19*

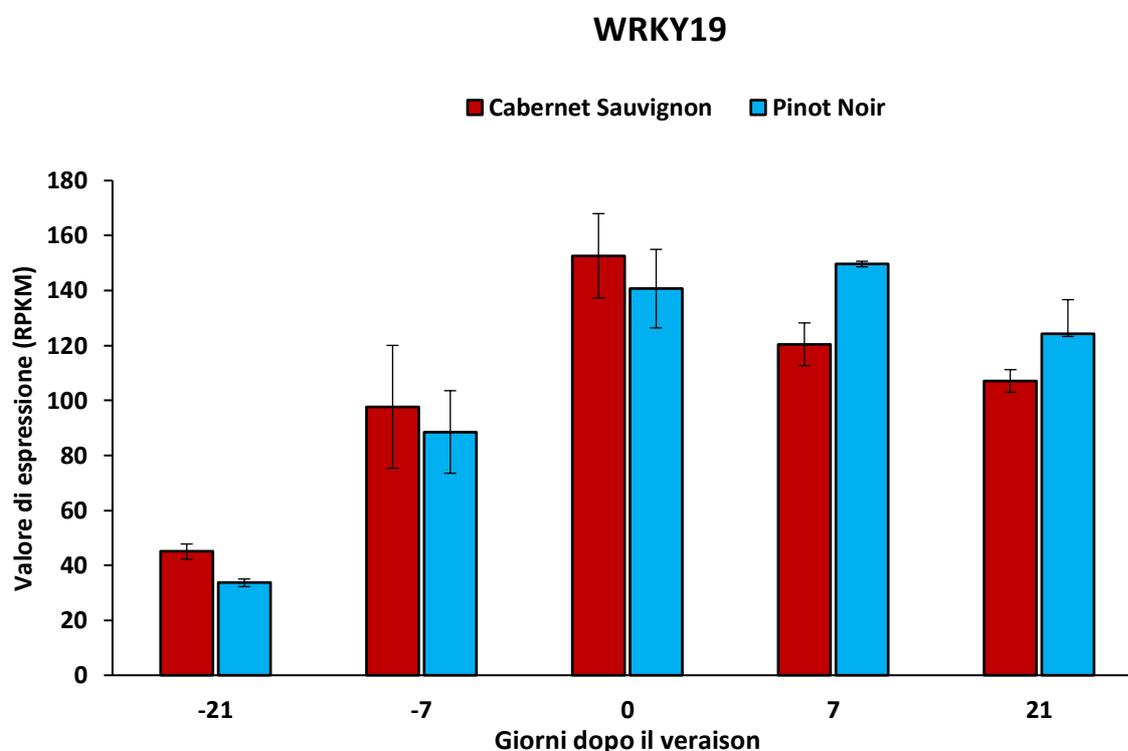


Figura 29: Profilo di espressione del gene *VviAGLa15* in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir (Fasoli et al., 2018).

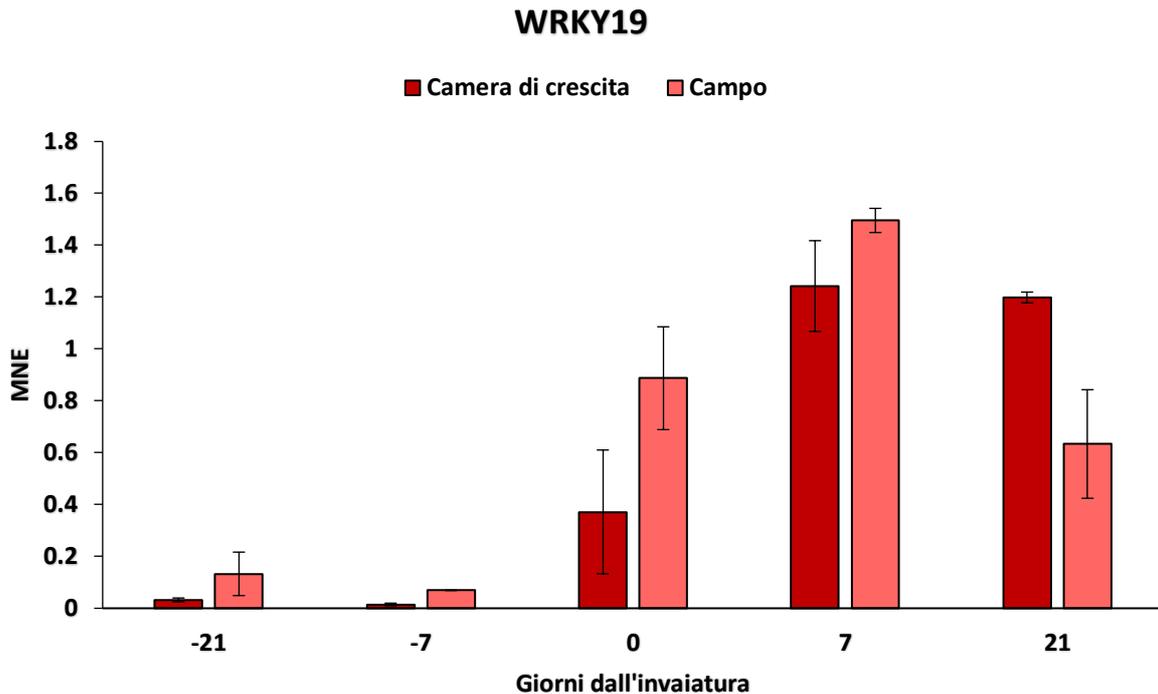


Figura 30: Profilo di espressione del gene *VviAGLa15* nelle due condizioni di crescita analizzate in Chardonnay. MNE = Mean normalized expression.

Per quanto riguarda *VviWRKY19*, tale gene mostra un profilo d'espressione simile per le due varietà analizzate nel lavoro di (Fasoli et al., 2018) (Fig.29): in Cabernet Sauvignon tale fattore di trascrizione risulta essere più espresso rispetto a Pinot Noir per quanto riguarda le fasi precedenti all'invaiaatura. Successivamente la situazione si inverte: Pinot noir dopo l'invaiaatura mostra un valore d'espressione in calo ma abbastanza costante mentre Cabernet Sauvignon mostra un calo più evidente. Nello studio svolto per Chardonnay (Fig. 30) si evince un profilo d'espressione simile per le due condizioni di crescita. A -21 e -7 giorni dall'invaiaatura nella condizione di pieno campo il gene risulta essere più espresso rispetto alla camera di crescita, con livelli d'espressione bassi in entrambi i casi. All'invaiaatura si nota un incremento marcato che raggiunge il picco 7 giorni dopo. Nell'ultimo campionamento si nota come in camera di crescita l'espressione del gene rimanga costante, mentre in pieno campo si ha una diminuzione di circa la metà del valore d'espressione.

Si può notare che Chardonnay mostra un profilo d'espressione genica più simile a Pinot Noir che a Cabernet Sauvignon con il picco di espressione a 7 giorni dall'invaiaatura invece che all'invaiaatura, come accade in Cabernet. Un'ipotesi potrebbe ritrovarsi nella maggiore somiglianza dal punto di vista genomico tra Chardonnay e Pinot Noir. Anche per quanto riguarda l'albero filogenetico le due varietà si trovano molto vicine tra loro dal punto di vista evolutivo (D'Onofrio et al., 2021).

La differenza che si nota tra camera di crescita e pieno campo si può spiegare con le condizioni limitanti che si riscontrano in ambiente controllato. Lo stress di temperatura e umidità a cui le piante

sono sottoposte ha causato probabilmente un'espressione costante e prolungata fino a 21 giorni dopo l'invasione.

Per quanto riguarda l'andamento riscontrato in questo lavoro di tesi, in entrambe le condizioni ambientali viene confermato il ruolo associato a tale gene, che si è visto essere un putativo *master regulator* in grado di innescare l'attivazione o la disattivazione di specifici *target* molecolari, importanti specialmente nella seconda fase del processo della maturazione. I geni più *up*-regolati da *VviWRKY19* includono un INIBITORE DELL'ALFA-AMILASI/SUBTILISINA ed alcuni INIBITORI DELLA TRYPSINA E DELLA PROTEASI FAMIGLIA KUNITZ, coinvolti nella risposta della pianta agli attacchi di microrganismi, in linea con il ruolo di molti membri della famiglia dei fattori di trascrizione WRKY nell'attività di risposte agli stress biotici ((Amato et al., 2016); (Wang et al., 2014). Inoltre, vi sono altri geni sovra-regolati come due XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE (VIT_11s0052g01220, VIT_11s0052g01300), una BETA-FRUCTOFURANOSIDASI e due TREHALOSE 6-PHOSPHATE SYNTHASE (VIT_17s0000g08010 e VIT_14s0036g01210), suggerendo un ruolo di *VviWRKY19* nella regolazione della struttura della parete cellulare, nella segnalazione degli zuccheri e nel metabolismo, eventi importanti che si verificano durante la maturazione delle bacche (Bertini, 2019). Altri geni maggiormente espressi sono rappresentati da molti fattori di trascrizione, tra cui molti fattori di trascrizione NAC e tre proteine LATERAL ORGAN BOUNDARIES. La sovra-regolazione di *VviNAC33* e *VviNAC26* indica una possibile regolazione della loro trascrizione da parte di *VviWRKY19* (Bertini, 2019).

Merita una riflessione il rapporto gerarchico di attivazione tra i geni *VvibHh75* e *VviWRKY19*. I profili di espressione di entrambi i geni hanno evidenziato una sovra-regolazione simile prima dell'inizio della maturazione, ma l'espressione di *VviWRKY19* non è diminuita quanto quella di *VvibHh75* dopo l'invasione. Le analisi funzionali dei due marcatori positivi hanno fornito le informazioni preliminari per districare l'intricata rete trascrizionale dell'inizio della maturazione (Fasoli et al., 2018). È interessante notare che *VviWRKY19* è stato trovato tra i geni bersaglio putativi di *VvibHh75*. Ciò ci consente di ipotizzare non solo che i due fattori di trascrizione agiscano in comune nell'innescare eventi molecolari di maturazione iniziale, ma anche che *VvibHh75* potrebbe funzionare a monte di *VviWRKY19*. Sebbene *VvibHh75* e *VviWRKY19* fossero co-espressi, *VviWRKY19* non sembra indurre geni che codificano per proteine che modificano la parete cellulare (pectato liasi ed EXPA17) che mostrano il picco di espressione all'inizio della maturazione. La gerarchia dell'attivazione trascrizionale potrebbe coinvolgere innanzitutto *VvibHh75* che

induce i geni correlati all'ammorbidimento delle bacche e *VviWRKY19*, a sua volta, amplificando il segnale di attivazione ad altri regolatori trascrizionali.

In tale lavoro di tesi, osservando gli andamenti dell'espressione dei due geni selezionati in camera di crescita ed in pieno campo, si può confermare la correlazione tra di essi, poiché si nota un aumento di espressione prima per *VvibHLH75* e poi successivamente per *VviWRKY19* (Figg. 26 e 30). Rispetto agli andamenti in Cabernet Sauvignon e Pinot Noir, in Chardonnay tale gerarchia trascrizionale risulta essere meno accentuata ma comunque è presente.

5. Conclusioni e prospettive future

Sono ancora poco conosciuti i complessi meccanismi che permettono alla vite di adattarsi ai differenti ambienti di crescita, soprattutto considerando la rapidità dei cambiamenti climatici. Questo lavoro di tesi confronta a livello fisiologico e molecolare il processo di sviluppo del frutto in due condizioni di crescita. Per questo scopo è stato sviluppato un protocollo sperimentale che usa talee fruttificanti cresciute in ambiente controllato e piante cresciute in pieno campo. Gli esperimenti in campo sono stati condotti in provincia di Verona. I risultati ottenuti mostrano un anticipo della maturazione dei frutti ottenuti in camera di crescita rispetto a quelli ottenuti in vigneto. L'anticipo è stato misurato a livello fenologico e molecolare. L'ipotesi sperimentale è che le talee subiscono una forzatura del processo di crescita e sviluppo ipogeo ed epigeo. Inoltre, le condizioni della camera di crescita sono più stringenti di quelle di campo, risultando nel blocco della maturazione per i frutti cresciuti in ambiente controllato. Questo è emerso chiaramente dall'andamento del grado zuccherino, il quale è risultato essere di due gradi Brix inferiore in camera di crescita rispetto al pieno campo. Ulteriore conferma del rallentamento del processo di maturazione arriva dalla graduale diminuzione del peso degli acini specialmente nelle ultime fasi di maturazione. Per quanto riguarda l'acidità non si evidenziano particolari differenze, mentre il pH è minore in frutti cresciuti in camera di crescita. Questa tesi si è inoltre focalizzata sulla analisi della espressione genica di selezionate classi di geni durante la maturazione nei due ambienti. L'analisi di espressione è stata condotta su geniche regolano il processo di sviluppo del frutto, specialmente durante l'invasatura. I geni considerati sono: *VviNAC33*, *VviSGR1*, *VviNAC60*, *VviAGL15a*, *VvibHLH075*, *VviWRKY19*.

L'espressione di *VviNAC33* misurata in questo studio, nella varietà Chardonnay, è diversa da quanto precedentemente osservato in Cabernet e Pinot. I dati ottenuti in questo studio mostrano che, in pieno campo l'espressione aumenta fino all'invasatura, diminuisce per i successivi 7 giorni e poi raggiunge il massimo livello di espressione 21 giorni dopo. In camera di crescita, il profilo d'espressione del gene durante la maturazione e raggiunge il picco 21 giorni dopo l'invasatura. Il risultato ottenuto è che l'espressione del gene è prolungata nel tempo in camera di crescita rispetto al campo. I dati presentati in questa tesi confermano che il gene sia un marcatore della transizione dalla "bacca verde/immaturo" a "inizio maturazione".

Il gene *VviSGR1* potrebbe agire a monte di *VviNAC33*. L'espressione di *VviSGR1* però non sembra associabile a quella di *VviNAC33* in entrambe le condizioni di crescita considerate. In Chardonnay, in pieno campo osserviamo che l'incremento di espressione iniziale è seguito da una fase di

stabilizzazione, fino alla *véraison*. In camera di crescita, invece, l'aumento dell'espressione è costante. *VviSGR1* è maggiormente espresso in campo rispetto all'ambiente controllato, con un'inversione dell'andamento a 7 ed a 21 giorni dall'invasatura. In Chardonnay non si è notata, quindi, un'associazione tra i due fattori di trascrizione. Il fattore di trascrizione *VviNAC60*, si esprime in pieno campo come osservato in altri studi in Cabernet. In camera di crescita, invece, ha un aumento di espressione costante fino all'ultimo campione analizzato. Questo fattore di trascrizione è, quindi, un marcatore della prima transizione.

L'espressione del gene *VviAGLa15* aumenta in pieno campo fino all'invasatura e poi si stabilizza. In camera di crescita, invece, l'aumento dell'espressione è posticipato, 7 giorni dopo l'invasatura con il massimo 21 giorni dopo. Tale andamento è simile a quello riscontrato in Cabernet Sauvignon in precedenti studi.

I risultati molecolari sono confortati dalle analisi fenologiche, che mostrano una minore consistenza ed una maggiore fragilità delle bacche. La causa di ciò potrebbe essere il rimodellamento ed ammorbidimento della parte cellulare degli acini dovuta all'incremento di espressione del gene. Per questi motivi concludiamo che il fattore di trascrizione è uno "switch gene", attivo nella seconda parte del processo di maturazione.

Il gene *VvibHLH75* in Chardonnay ha un profilo di espressione simile a quanto osservato in altri studi in Cabernet Sauvignon e a Pinot Noir: l'espressione aumenta fino a 7 giorni dopo l'invasatura e poi cala a 21 giorni. Le talee cresciute in camera di crescita mostrano un anticipo dell'espressione di *VvibHLH75* di circa una settimana. I dati ottenuti in questo lavoro mostrano che *VvibHLH75* è un marcatore della prima transizione.

L'espressione di *VviWRKY19* mostra differenze nel profilo di espressione in campioni cresciuti in camera di crescita o pieno campo. Questo potrebbe essere dovuto alle condizioni limitanti che si riscontrano in ambiente controllato. In Chardonnay il gene ha un profilo d'espressione genica più simile a Pinot Noir che a Cabernet Sauvignon. Infatti, il lavoro qui presentato mostra il picco di espressione a 7 giorni dall'invasatura, invece che all'invasatura come accade in Cabernet. Le differenti condizioni di temperatura ed umidità, a cui le piante sono state sottoposte in camera di crescita, ha causato probabilmente un'espressione costante e prolungata del gene fino a ventuno giorni dopo l'invasatura. Il gene è un marcatore sia della prima che della seconda transizione.

Questo lavoro studia inoltre la possibile interazione tra i geni *VvibHLH75* e *VviWRKY19*. L'ipotesi è che *VvibHLH75* controlli l'ammorbidimento delle bacche e poi *VviWRKY19* intervenga su ulteriori

fattori di trascrizione. I dati ottenuti in questo lavoro confermano l'associazione tra i due geni, in cui *VvibHLH75* agisce a monte di *VviWRKY19*.

In conclusione, questo lavoro conferma che il protocollo sperimentale adottato possa diventare un modello per studiare e prevenire gli effetti causati dai cambiamenti climatici. Per questo è necessario incrementare le conoscenze molecolari dell'adattamento delle piante alle differenti condizioni ambientali. I risultati ed i protocolli adottati ed ottenuti in questo lavoro possono essere estesi ad altre cultivar. Per esempio, la varietà Glera ha mostrato buoni risultati dal punto di vista fisiologico nella camera di crescita. L'approccio utilizzato in questo lavoro potrebbe essere utilizzato per il monitoraggio di ulteriori geni e dei rispettivi regolatori, per valutare l'influenza ambientale sulla loro interazione. Inoltre, i risultati prodotti indicano che le talee fruttificanti in camera di crescita sono un sistema sperimentale adatto per valutare l'impatto dei futuri cambiamenti climatici sulle piante. In futuro, tale protocollo sperimentale potrebbe diventare utile anche per confrontare la differente espressione di specifici geni a partire da piante mantenute in condizioni controllate diverse, arrivando così ad associare ad un singolo parametro ambientale la differente espressione di un singolo gene. Una volta individuati geni candidati, si potrebbe ipotizzare l'utilizzo dell'editing genomico su quei geni che nella vite modulano la risposta della pianta all'incremento della temperatura. L'obiettivo sarebbe quello di limitare in questo modo l'eccessiva accelerazione del processo di maturazione, ed evitare il disaccoppiamento temporale tra maturazione tecnologica e fenolica.

6. Referenze

- Adamczyk, B. J., Lehti-Shiu, M. D., & Fernandez, D. E. (2007). The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J*, 50(6), 1007-1019. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03105.x>
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., & Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 9(6), 841-857. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.6.841>
- Alikadic, A., Pertot, I., Eccel, E., Dolci, C., Zarbo, C., Caffarra, A., De Filippi, R., & Furlanello, C. (2019). The impact of climate change on grapevine phenology and the influence of altitude: A regional study. *Agricultural and Forest Meteorology*, 271(April 2018), 73-82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.02.030>
- Amato, A., Cavallini, E., Zenoni, S., Finezzo, L., Begheldo, M., Ruperti, B., & Tornielli, G. B. (2016). A Grapevine TTG2-Like WRKY Transcription Factor Is Involved in Regulating Vacuolar Transport and Flavonoid Biosynthesis. *Front Plant Sci*, 7, 1979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01979>
- Atchley, W. R., Terhalle, W., & Dress, A. (1999). Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. *J Mol Evol*, 48(5), 501-516. <https://doi.org/10.1007/pl00006494>
- Baby, T., Hocking, B., Tyerman, S. D., Gilliam, M., & Collins, C. (2014). Modified method for producing grapevine plants in controlled environments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(2), 261-267. <https://doi.org/https://doi.org/10.5344/ajev.2014.13121>
- Bertini, E. (2019). *Identification and functional characterization of master regulators of the onset of berry ripening in grapevine (vitis vinifera l.)*
- Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants *Academic Press* 13, 115-155. [https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60048-6](https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60048-6)
- Bu, Q., Jiang, H., Li, C. B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q., & Li, C. (2008). Role of the Arabidopsis thaliana NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res*, 18(7), 756-767. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.53>
- Cenci, A., Guignon, V., Roux, N., & Rouard, M. (2014). Genomic analysis of NAC transcription factors in banana (*Musa acuminata*) and definition of NAC orthologous groups for monocots and dicots. *Plant Mol Biol*, 85(1-2), 63-80. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0169-2>
- Christianson, J. A., Dennis, E. S., Llewellyn, D. J., & Wilson, I. W. (2010). ATAF NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling. *Plant Signal Behav*, 5(4), 428-432. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10847>
- Clingeffer, P. R. (2010). Plant management research: Status and what it can offer to address challenges and limitations. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 25-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00075.x>
- Collinge, M., & Boller, T. (2001). Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol*, 46(5), 521-529. <https://doi.org/10.1023/a:1010639225091>
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1(1), 1-22. <http://hdl.handle.net/1822/6820>

- Crews, S. T. (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev*, 12(5), 607-620. <https://doi.org/10.1101/gad.12.5.607>
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibsouda, S., & Vincent, A. (1996). Collier, a novel regulator of *Drosophila* head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr Biol*, 6(6), 707-718. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(09\)00452-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(09)00452-7)
- D'Inca, E., Cazzaniga, S., Foresti, C., Vitulo, N., Bertini, E., Galli, M., Gallavotti, A., Pezzotti, M., Battista Tornielli, G., & Zenoni, S. (2021). VviNAC33 promotes organ de-greening and represses vegetative growth during the vegetative-to-mature phase transition in grapevine. *New Phytol*, 231(2), 726-746. <https://doi.org/10.1111/nph.17263>
- D'Onofrio, C., Tumino, G., Gardiman, M., Crespan, M., Bignami, C., de Palma, L., Barbagallo, M. G., Muganu, M., Morcia, C., Novello, V., Schneider, A., & Terzi, V. (2021). Parentage Atlas of Italian Grapevine Varieties as Inferred From SNP Genotyping. *Plant science*, 11, 605-934. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpls.2020.605934>
- Dai, Z. W., Ollat, N., Gomès, E., Decroocq, S., Tandonnet, J. P., Bordenave, L., Pieri, P., Hilbert, G., Kappel, C., Van Leeuwen, C., Vivin, P., & Delrot, S. (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 413-425. <https://doi.org/https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10116>
- Dal Santo, S., Zenoni, S., Sandri, M., De Lorenzis, G., Magris, G., De Paoli, E., Di Gaspero, G., Del Fabbro, C., Morgante, M., Brancadoro, L., Grossi, D., Fasoli, M., Zuccolotto, P., Tornielli, G. B., & Pezzotti, M. (2018). Grapevine field experiments reveal the contribution of genotype, the influence of environment and the effect of their interaction (G×E) on the berry transcriptome. *Plant Journal*, 93(6), 1143-1159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13834>
- Dang, C. V., Dolde, C., Gillison, M. L., & Kato, G. J. (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(2), 599-602. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.599>
- Dang, C. W., Wang, Y., Chen, K. P., Yao, Q., Zhang, D. B., & Guo, M. (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor family in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Sci*, 11, 84. <https://doi.org/10.1673/031.011.8401>
- De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y., & Theißen, G. (2003). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends in plant science*, 8(10).
- Diaz-Riquelme, J., Lijavetzky, D., Martinez-Zapater, J. M., & Carmona, M. J. (2009). Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiol*, 149(1), 354-369. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131052>
- Duek, P. D., & Fankhauser, C. (2005). bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci*, 10(2), 51-54. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.005>
- Duval, M., Hsieh, T. F., Kim, S. Y., & Thomas, T. L. (2002). Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Mol Biol*, 50(2), 237-248. <https://doi.org/10.1023/a:1016028530943>
- Einset, J., & Pratt, C. (1975). Advances in fruit breeding. *Grapes*, 130-153.
- Endo, H., Yamaguchi, M., Tamura, T., Nakano, Y., Nishikubo, N., Yoneda, A., Kato, K., Kubo, M., Kajita, S., Katayama, Y., Ohtani, M., & Demura, T. (2015). Multiple classes of transcription factors regulate the expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation. *Plant Cell Physiol*, 56(2), 242-254. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu134>

- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., & Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5(5), 199-206. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01600-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01600-9)
- Fasoli, M., Dal Santo, S., Zenoni, S., Tornielli, G. B., Farina, L., Zamboni, A., Porceddu, A., Venturini, L., Bicego, M., Murino, V., Ferrarini, A., Delledonne, M., & Pezzotti, M. (2012). The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. *Plant Cell*, 24(9), 3489-3505. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100230>
- Fasoli, M., Richter, C. L., Zenoni, S., Bertini, E., Vitulo, N., Dal Santo, S., Dokoozlian, N., Pezzotti, M., & Tornielli, G. B. (2018). Timing and Order of the Molecular Events Marking the Onset of Berry Ripening in Grapevine. *Plant Physiol*, 178(3), 1187-1206. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00559>
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E. L., & Grotewold, E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J*, 66(1), 94-116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04459.x>
- Fisher, A., & Caudy, M. (1998). The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays*, 20(4), 298-306. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199804\)20:4<298::AID-BIES6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199804)20:4<298::AID-BIES6>3.0.CO;2-M)
- Fortes, A. M., Teixeira, R. T., & Agudelo-Romero, P. (2015). Complex Interplay of Hormonal Signals during Grape Berry Ripening. *Molecules*, 20(5), 9326-9343. <https://doi.org/10.3390/molecules20059326>
- Fraga, H., Malheiro, A. C., & Santos, J. A. (2013). An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food and Energy Security*, 1(2), 77-147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fes3.14>
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L. S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J*, 39(6), 863-876. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02171.x>
- Geng, J., & Liu, J. H. (2018). The transcription factor CsbHHLH18 of sweet orange functions in modulation of cold tolerance and homeostasis of reactive oxygen species by regulating the antioxidant gene. *J Exp Bot*, 69(10), 2677-2692. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery065>
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16 Suppl(Suppl), S170-180. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>
- Gramzow, L., & Theissen, G. (2010). A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biol*, 11(6), 214. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-6-214>
- Grimplet, J., Martinez-Zapater, J. M., & Carmona, M. J. (2016). Structural and functional annotation of the MADS-box transcription factor family in grapevine. *BMC Genomics*, 17, 80. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2398-7>
- Hannah, L., Roehrdanz, P. R., Ikegami, M., Shepard, A. V., Shaw, M. R., Tabor, G., Zhi, L., Marquet, P. A., & Hijmans, R. J. (2013). Climate change, wine, and conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(17), 6907-6912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210127110>
- Hardin, P. E. (2004). Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J Biol Rhythms*, 19(5), 348-360. <https://doi.org/10.1177/0748730404268052>
- He, X. J., Mu, R. L., Cao, W. H., Zhang, Z. G., Zhang, J. S., & Chen, S. Y. (2005). AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J*, 44(6), 903-916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02575.x>

- Hendelman, A., Stav, R., Zemach, H., & Arazi, T. (2013). The tomato NAC transcription factor SINAM2 is involved in flower-boundary morphogenesis. *J Exp Bot*, *64*(18), 5497-5507. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert324>
- Honkanen, S., Thamm, A., Arteaga-Vazquez, M. A., & Dolan, L. (2018). Negative regulation of conserved RSL class I bHLH transcription factors evolved independently among land plants. *Elife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.38529>
- Ikeda, M., Mitsuda, N., & Ohme-Takagi, M. (2013). ATBS1 INTERACTING FACTORS negatively regulate Arabidopsis cell elongation in the triantagonistic bHLH system. *Plant Signal Behav*, *8*(3), e23448. <https://doi.org/10.4161/psb.23448>
- IPCC. (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Summary for Policymakers*
- Izzo. (2020). *Il futuro dell' enologia sarà frutto dei cambiamenti che sta vivendo il Pianeta*
ICONACLIMA
- Jackson, R. S. (2014). Grapevine Structure and Function. *Wine Science - Principles and Applications*, 3.
- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., . . . French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome, C. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, *449*(7161), 463-467. <https://doi.org/10.1038/nature06148>
- Jensen, M. K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M. M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., & Skriver, K. (2010). The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem J*, *426*(2), 183-196. <https://doi.org/10.1042/BJ20091234>
- Jensen, M. K., Rung, J. H., Gregersen, P. L., Gjetting, T., Fuglsang, A. T., Hansen, M., Joehnk, N., Lyngkjaer, M. F., & Collinge, D. B. (2007). The HvNAC6 transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, *65*(1-2), 137-150. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9204-5>
- Jiang, Y., Yang, B., & Deyholos, M. K. (2009). Functional characterization of the Arabidopsis bHLH92 transcription factor in abiotic stress. *Mol Genet Genomics*, *282*(5), 503-516. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0481-3>
- Kato, H., Motomura, T., Komeda, Y., Saito, T., & Kato, A. (2010). Overexpression of the NAC transcription factor family gene ANAC036 results in a dwarf phenotype in Arabidopsis thaliana. *J Plant Physiol*, *167*(7), 571-577. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.11.004>
- Keller, M. (2010). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: A climate change primer for viticulturists. . *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *16*(1), 56-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00077.x>
- Kennedy, B. Y. J. (2002). Understanding grape berry development. *Practical Winery and Vineyard*, 1-5.
- Khraiweh, B., Zhu, J. K., & Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, *1819*(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.05.001>
- Krishnamurthy, P., Vishal, B., Khoo, K., Rajappa, S., Loh, C. S., & Kumar, P. P. (2019). Expression of AoNHX1 increases salt tolerance of rice and Arabidopsis, and bHLH transcription factors regulate AtNHX1 and AtNHX6 in Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, *38*(10), 1299-1315. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02450-w>

- Kuhn, N., Guan, L., Dai, Z. W., Wu, B. H., Lauvergeat, V., Gomes, E., Li, S. H., Godoy, F., Arce-Johnson, P., & Delrot, S. (2014). Berry ripening: recently heard through the grapevine. *J Exp Bot*, 65(16), 4543-4559. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert395>
- Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. (2011). Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res*, 18(4), 263-276. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsr015>
- Ledent, V., & Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res*, 11(5), 754-770. <https://doi.org/10.1101/gr.177001>
- Leida, C., Dal Ri, A., Dalla Costa, L., Gomez, M. D., Pompili, V., Sonogo, P., Engelen, K., Masuero, D., Rios, G., & Moser, C. (2016). Insights into the Role of the Berry-Specific Ethylene Responsive Factor VviERF045. *Front Plant Sci*, 7, 1793. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01793>
- Li, C., Qiu, J., Ding, L., Huang, M., Huang, S., Yang, G., & Yin, J. (2017). Anthocyanin biosynthesis regulation of DhMYB2 and DhbHLH1 in Dendrobium hybrids petals. *Plant Physiol Biochem*, 112, 335-345. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.019>
- Li, C., Yan, C., Sun, Q., Wang, J., Yuan, C., Mou, Y., Shan, S., & Zhao, X. (2021). The bHLH transcription factor AhbHLH112 improves the drought tolerance of peanut. *BMC Plant Biol*, 21(1), 540. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03318-6>
- Li, F., Guo, S., Zhao, Y., Chen, D., Chong, K., & Xu, Y. (2010). Overexpression of a homeopeptide repeat-containing bHLH protein gene (OrbHLH001) from Dongxiang Wild Rice confers freezing and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, 29(9), 977-986. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0883-z>
- Li, J., Wang, T., Han, J., & Ren, Z. (2020). Genome-wide identification and characterization of cucumber bHLH family genes and the functional characterization of CsbHLH041 in NaCl and ABA tolerance in Arabidopsis and cucumber. *BMC Plant Biol*, 20(1), 272. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02440-1>
- Licausi, F., Giorgi, F. M., Zenoni, S., Osti, F., Pezzotti, M., & Perata, P. (2010). Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in Vitis vinifera. *BMC Genomics*, 11, 719. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-719>
- Liu, J., Shen, Y., Cao, H., He, K., Chu, Z., & Li, N. (2022). OsbHLH057 targets the AATCA cis-element to regulate disease resistance and drought tolerance in rice. *Plant Cell Rep*, 41(5), 1285-1299. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02859-w>
- Liu, X. F., Yin, X. R., Allan, A. C., Wang, L. W., Shi, Y. N., Huang, Y. J., & al., e. (2013). The role of MrbHLH1 and MrMYB1 in regulating anthocyanin biosynthetic genes in tobacco and Chinese bayberry (*Myrica rubra*) during anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 115, 285-298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11240-013-0361-8>
- Luo, B. X., Deng, L. H., Chen, F., Chen, S. Y., Li, W. B., & Xiao, G. Y. (2009). Construction of over-expression vector of OsbHLH1 gene and transformation of rice. *Biotechnol. Bull*, 7, 76-81. <https://doi.org/https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985>
- Mallory, A. C., Dugas, D. V., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol*, 14(12), 1035-1046. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.022>
- Mao, X., Zhang, H., Qian, X., Li, A., Zhao, G., & Jing, R. (2012). TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in Arabidopsis. *J Exp Bot*, 63(8), 2933-2946. <https://doi.org/10.1093/jxb/err462>
- Marchive, C., Leon, C., Kappel, C., Coutos-Thevenot, P., Corio-Costet, M. F., Delrot, S., & Lauvergeat, V. (2013). Over-expression of VvWRKY1 in grapevines induces expression of

- jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew. *PLoS One*, 8(1), e54185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054185>
- Massonnet, M., Fasoli, M., Tornielli, G. B., Altieri, M., Sandri, M., Zuccolotto, P., Paci, P., Gardiman, M., Zenoni, S., & Pezzotti, M. (2017). Ripening Transcriptomic Program in Red and White Grapevine Varieties Correlates with Berry Skin Anthocyanin Accumulation. *Plant Physiol*, 174(4), 2376-2396. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00311>
- Merz, P. R., Moser, T., Holl, J., Kortekamp, A., Buchholz, G., Zyprian, E., & Bogs, J. (2015). The transcription factor VvWRKY33 is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defense against the oomycete pathogen *Plasmopara viticola*. *Physiol Plant*, 153(3), 365-380. <https://doi.org/10.1111/ppl.12251>
- Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of Arabidopsis regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell*, 17(11), 2993-3006. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036004>
- Mullins, M. G., Bouquet, A., & Williams, L. E. (1992). *Biology of the Grapevine*. Press, Cambridge, UK.
- Mullins, M. G., & Rajasekaran, K. (1981). Fruiting Cuttings: Revised Method for Producing Test Plants of Grapevine Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 35-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.5344/ajev.1981.32.1.35>
- Murre, C., McCaw, P. S., & Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, 56(5), 777-783. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90682-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90682-x)
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 1819(2), 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.005>
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., & Laufs, P. (2006). The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(11), 2929-2945. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045617>
- Niu, F., Wang, B., Wu, F., Yan, J., Li, L., Wang, C., Wang, Y., Yang, B., & Jiang, Y. Q. (2014). Canola (*Brassica napus* L.) NAC103 transcription factor gene is a novel player inducing reactive oxygen species accumulation and cell death in plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 454(1), 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.057>
- Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A. M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., & Kikuchi, S. (2010). Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465(1-2), 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.06.008>
- Oda-Yamamizo, C., Mitsuda, N., Sakamoto, S., Ogawa, D., Ohme-Takagi, M., & Ohmiya, A. (2016). The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in Arabidopsis leaves. *Sci Rep*, 6, 23609. <https://doi.org/10.1038/srep23609>
- OIV. (2019). *Statistical Report on World Vitiviniculture*
- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. L., & Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci*, 10(2), 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.010>
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., & Kikuchi, S. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and Arabidopsis thaliana. *DNA Res*, 10(6), 239-247. <https://doi.org/10.1093/dnares/10.6.239>
- Palumbo, M. C., Zenoni, S., Fasoli, M., Massonnet, M., Farina, L., Castiglione, F., Pezzotti, M., & Paci, P. (2014). Integrated network analysis identifies fight-club nodes as a class of hubs

encompassing key putative switch genes that induce major transcriptome reprogramming during grapevine development. *Plant Cell*, 26(12), 4617-4635.

<https://doi.org/10.1105/tpc.114.133710>

- Phillips, S. E. (1994). Built by association: structure and function of helix-loop-helix DNA-binding proteins. *Structure*, 2(1), 1-4. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00002-2](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00002-2)
- Pilati, S., Bagagli, G., Sonogo, P., Moretto, M., Brazzale, D., Castorina, G., Simoni, L., Tonelli, C., Guella, G., Engelen, K., & al., e. (2017). Abscisic acid is a major regulator of grape berry ripening onset: new insights into ABA signaling network. *Front Plant Sci*, 8, 1093.
- Pires, N., & Dolan, L. (2010a). Early evolution of bHLH proteins in plants. *Plant Signal Behav*, 5(7), 911-912. <https://doi.org/10.4161/psb.5.7.12100>
- Pires, N., & Dolan, L. (2010b). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Mol Biol Evol*, 27(4), 862-874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp288>
- Poni. (2011). *Cambiamento climatico ed effetti sulla viticoltura* Georgofili INFO
- Puranik, S., Bahadur, R. P., Srivastava, P. S., & Prasad, M. (2011). Molecular cloning and characterization of a membrane associated NAC family gene, SiNAC from foxtail millet [Setaria italica (L.) P. Beauv]. *Mol Biotechnol*, 49(2), 138-150. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9385-7>
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., & Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 17(6), 369-381. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.004>
- Qiu, J. R., Huang, Z., Xiang, X. Y., Xu, W. X., Wang, J. T., Chen, J., Song, L., Xiao, Y., Li, X., Ma, J., Cai, S. Z., Sun, L. X., & Jiang, C. Z. (2020). MfbHLH38, a Myrothamnus flabellifolia bHLH transcription factor, confers tolerance to drought and salinity stresses in Arabidopsis. *BMC Plant Biol*, 20(1), 542. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02732-6>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H., & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339(1), 62-66. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01423-4)
- Schluttenhofer, C., & Yuan, L. (2015). Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors. *Plant Physiol*, 167(2), 295-306. <https://doi.org/10.1104/pp.114.251769>
- Shaw, J. R., Hampton, T. H., King, B. L., Whitehead, A., Galvez, F., Gross, R. H., Keith, N., Notch, E., Jung, D., Glaholt, S. P., Chen, C. Y., Colbourne, J. K., & Stanton, B. A. (2014). Natural selection canalizes expression variation of environmentally induced plasticity-enabling genes. *Mol Biol Evol*, 31(11), 3002-3015. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu241>
- Simon, P. (2003). Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 19(11), 1439-1440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157>
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., & Koes, R. (1996). The no apical meristem gene of Petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85(2), 159-170. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81093-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81093-4)
- Su, H., Zhang, S., Yuan, X., Chen, C., Wang, X. F., & Hao, Y. J. (2013). Genome-wide analysis and identification of stress-responsive genes of the NAM-ATAF1,2-CUC2 transcription factor family in apple. *Plant Physiol Biochem*, 71, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.022>
- Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci*, 5(12), 537-542. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01797-0](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01797-0)
- Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive

- cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16(9), 2481-2498. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022699>
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., & Dubourdieu, D. (2004). Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(3), 207-217.
- Vannozzi, A., Wong, D. C. J., Holl, J., Hmam, I., Matus, J. T., Bogs, J., Ziegler, T., Dry, I., Barcaccia, G., & Lucchin, M. (2018). Combinatorial Regulation of Stilbene Synthase Genes by WRKY and MYB Transcription Factors in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Physiol*, 59(5), 1043-1059. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy045>
- Walker, A. R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. A., Thomas, M. R., & Robinson, S. P. (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J*, 49(5), 772-785. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02997.x>
- Wang, M., Vannozzi, A., Wang, G., Liang, Y. H., Tornielli, G. B., Zenoni, S., Cavallini, E., Pezzotti, M., & Cheng, Z. M. (2014). Genome and transcriptome analysis of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *Hortic Res*, 1, 14016. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.16>
- Wang, N., Zheng, Y., Xin, H., Fang, L., & Li, S. (2013). Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep*, 32(1), 61-75. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1340-y>
- Wang, P., Wang, H., Wang, Y., Ren, F., & Liu, W. (2018). Analysis of bHLH genes from foxtail millet (*Setaria italica*) and their potential relevance to drought stress. *PLoS One*, 13(11), e0207344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207344>
- Wang, Y., Wang, S., Tian, Y., Wang, Q., Chen, S., Li, H., Ma, C., & Li, H. (2021). Functional Characterization of a Sugar Beet BvbHLH93 Transcription Factor in Salt Stress Tolerance. *Int J Mol Sci*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073669>
- White, M. A., Whalen, P., & Jones, G. V. (2009). Land and wine. *Nature Geoscience*, 2(2), 82-84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ngeo429>
- Zenoni, S., Fasoli, M., Tornielli, G. B., Dal Santo, S., Sanson, A., de Groot, P., Sordo, S., Citterio, S., Monti, F., & Pezzotti, M. (2011). Overexpression of PhEXPA1 increases cell size, modifies cell wall polymer composition and affects the timing of axillary meristem development in *Petunia hybrida*. *New Phytol*, 191(3), 662-677. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03726.x>
- Zhai, Y., Zhang, L., Xia, C., Fu, S., Zhao, G., Jia, J., & Kong, X. (2016). The wheat transcription factor, TabHLH39, improves tolerance to multiple abiotic stressors in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 473(4), 1321-1327. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.071>
- Zhao, Q., Fan, Z., Qiu, L., Che, Q., Wang, T., Li, Y., & Wang, Y. (2020). MdbHLH130, an Apple bHLH Transcription Factor, Confers Water Stress Resistance by Regulating Stomatal Closure and ROS Homeostasis in Transgenic Tobacco. *Front Plant Sci*, 11, 543696. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.543696>
- Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z. H. (2006). SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(11), 3158-3170. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047399>
- Zhou, H., Lin-Wang, K., Wang, H., Gu, C., Dare, A. P., Espley, R. V., He, H., Allan, A. C., & Han, Y. (2015). Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *Plant J*, 82(1), 105-121. <https://doi.org/10.1111/tpj.12792>
- Zhu, M., Chen, G., Zhang, J., Zhang, Y., Xie, Q., Zhao, Z., Pan, Y., & Hu, Z. (2014). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor SINAC4 regulates salt and drought tolerance and

stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Rep*, 33(11), 1851-1863.
<https://doi.org/10.1007/s00299-014-1662-z>

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto i miei genitori, senza i quali non sarei oggi qui a festeggiare questo traguardo con voi. Grazie a tutta la mia famiglia, a partire da mia nonna che durante i due anni della magistrale, ogni qualvolta non fossi a Milano, mi scriveva augurandomi una buona giornata. A mio nonno, che non ha potuto vedere questo traguardo, ma che spero stia brindando con noi dall'alto e che sia fiero del percorso che ho intrapreso. Grazie ai miei zii, ai miei cugini e ai miei nonni. A miei amici di sempre, con cui ho condiviso pane e pensieri, giorno e sera. Marco, Stefano, Saverio, Roberto. A Savio, mio Fratello non di sangue ma di vita, una delle poche persone a cui affiderei la mia esistenza senza pensarci due volte. A Silvia e Sofia, compagne di avventure, con loro ogni cosa è possibile. Alla famiglia Angiulli, persone vere e oneste, che vedo veramente come la mia seconda casa. Ai miei amici di Crispiano e Statte, una delle più belle sorprese in un 2020 avaro di emozioni. La seconda famiglia che tutti vorremmo. Ho passato con voi tre mesi stupendi e so che con voi la distanza fisica non sarà mai un ostacolo. Ad Alberto e Rebecca, compagni delle superiori, che stimo e con cui il legame non si è mai spezzato. A tutti gli amici e fratelli di Verona. Con voi ho imparato a capire cosa significhi fare gruppo. Tornassi indietro rifarei la scelta di vivere lì altre mille volte. Un'altra famiglia sparsa per l'Italia. A miei compagni di corso Giacomino, Lorenzo, Felipe, Martha, Tommaso. A mio fratello Giacomo con cui ho condiviso laurea magistrale, casa, macchina, vestiti, di tutto. Ti auguro il meglio nella vita, te lo meriti. A due donne speciali, che mi hanno accudito, coccolato e viziato forse. A Sara ed Alessandra, siete meravigliose, non cambiate mai. A tutti voi che siete oggi qui, grazie. Non sarei la persona che sono senza il vostro contributo. L'essere umano vive di relazioni ed affetti come queste. Vi auguro di fare della vostra passione un lavoro e di trovare il vostro posto nel mondo.