



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione - BCA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente –
DAFNAE

Corso di Laurea Magistrale in Biotechnologies for food science

Tesi di Laurea Magistrale

**Trascrittomica della bacca in due varietà di vite contrastanti per epoca di
maturazione**

Berry transcriptomics in two grapevine varieties contrasting in ripening time

Relatore

Prof. Alessandro Vannozzi

Laureanda

Carla Perzia

Correlatori

Damiano Riommi

Dott. Gabriele Magon

Matricola: 20028706

Anno Accademico 2023/2024

Indice

Riassunto	2
Abstract.....	3
1. Introduzione	4
1.1 Importanza economica della vite e benefici per la salute	4
1.2 Morfologia e fisiologia della vite	4
1.3 Fenologia e cambiamento climatico.....	6
1.4 Composizione della bacca.....	8
1.5 Maturazione	9
1.6 Trascrittomica della maturazione	10
1.7 Ormoni coinvolti nella maturazione.....	11
1.8 Caratteristiche di Pinot Grigio	13
1.9 Caratteristiche di Raboso Piave	14
2. Scopo dello studio	16
3. Materiali e metodi	17
3.1 Campionamento e dissezione del materiale vegetale	17
3.2 Analisi FOSS.....	18
3.3 Estrazione dell'RNA e valutazione qualitativa e quantitativa	18
3.4 Sequenziamento dell'RNA	19
3.5 Analisi trascrittomiche	19
3.6 Raccolta di dati in letteratura	20
4. Risultati	22
4.1 Analisi comparativa della maturazione e delle caratteristiche chimiche di Pinot Grigio e Raboso Piave	22
4.2 RNAseq: statistiche di sequenziamento	23
4.3 Statistiche di mappatura.....	24
4.3 Visualizzazione del clustering dei campioni	25
4.4 Analisi dei Geni Differenzialmente Espressi (DEGs)	27
4.5 Analisi di Arricchimento Funzionale dei DEGs	29
4.6 Espressione genica geni candidati.....	33
5. Discussione.....	40

6. Conclusioni	43
7. Appendice	44
7.1 Appendice A	44
7.2 Appendice B	47
Bibliografia	53

Riassunto

La vite (*Vitis vinifera* L.) è una delle colture più importanti a livello mondiale ed è caratterizzata da una grande varietà di cultivar che possono mostrare differenze fenotipiche e fisiologiche importanti, come il colore, la dimensione o la forma dei grappoli, la capacità di adattarsi a condizioni climatiche diverse e caratteristiche fenologiche quali l'epoca di germogliamento e di maturazione delle uve. In questo studio sono state prese in esame due varietà di vite, il Pinot Grigio e il Raboso Piave, caratterizzate da cinetiche di maturazione del frutto molto diverse. Pinot Grigio è una varietà a maturazione precoce ed è contraddistinto da grappoli piccoli con uve grigio-rosate. Al contrario, Raboso Piave è una varietà a maturazione tardiva, con grappoli di dimensioni importanti e uve scure. L'epoca di maturazione è una caratteristica estremamente importante in viticoltura, soprattutto nell'ottica della cocente questione riguardante il cambiamento climatico, influenzando non solo le tempistiche della vendemmia, ma anche le caratteristiche organolettiche dei vini. Comprendere quindi la natura dei determinanti genetici legati a queste differenze è di fondamentale importanza nell'ottica di futuri programmi di miglioramento genetico mediato da tecniche convenzionali o di nuova generazione. Al fine di identificare possibili geni chiave coinvolti nell'epoca di maturazione e nella sua precocità/tardività, è stata eseguita un'analisi trascrittomica su polpa e buccia di bacche campionate dalle due varietà durante la cinetica di sviluppo, a partire dall'allegagione fino alla maturazione tecnologica. Il confronto tra i profili di espressione genica di Pinot Grigio e Raboso Piave potrebbe fornire le basi per comprendere i meccanismi molecolari alla base delle diverse cinetiche di maturazione anche in altre varietà, ponendo le basi per studi funzionali su specifici loci genici o genomici.

Abstract

The grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most important crops worldwide and is characterized by a wide variety of cultivars that can show significant phenotypic and physiological differences, such as the color, size, or shape of the clusters, the ability to adapt to different climatic conditions, and phenological traits like the timing of budbreak and grape maturation. This study focused on two grapevine varieties, Pinot Grigio and Raboso Piave, which are characterized by very different fruit maturation kinetics. Pinot Grigio is an early-maturing variety, with small clusters and gray-rosy grapes. In contrast, Raboso Piave is a late-maturing variety, with larger clusters and dark grapes. The timing of maturation is an extremely important characteristic in viticulture, especially in light of the pressing issue of climate change, as it influences not only the timing of the harvest but also the organoleptic characteristics of the wines. Therefore, understanding the nature of the genetic determinants underlying these differences is crucial for future breeding programs, whether conventional or using new-generation techniques. To identify potential key genes involved in the timing of maturation and its early/late characteristics, a transcriptomic analysis was performed on the pulp and skin of berries sampled from the two varieties during the development kinetics, from fruit set to technological maturity. Comparing the gene expression profiles of Pinot Grigio and Raboso Piave could provide insights into the molecular mechanisms underlying the different maturation kinetics, even in other varieties, laying the groundwork for functional studies on specific genetic or genomic loci.

1. Introduzione

1.1 Importanza economica della vite e benefici per la salute

La vite (*Vitis* spp.) è una specie frutticola di rilevanza economica mondiale, coltivata sia per il consumo del frutto fresco che per la produzione di derivati come uvetta, succhi e soprattutto vino. Sebbene il genere comprenda più di 60 specie differenti, la quasi totalità del vino prodotto a livello mondiale deriva dalla specie *Vitis vinifera* L., originaria dell'area a sud del Caucaso e del Mar Caspio (Zenoni et al., 2010; Wei et al., 2020) e successivamente diffusa in Europa e nel resto del mondo. Oltre alla significativa importanza economica, il consumo del prodotto fresco e dei suoi derivati implica numerosi benefici nutrizionali e sulla salute umana. Da menzionare, ad esempio, il ruolo del *trans*-resveratrolo, un potente antiossidante, importante nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, del cancro o del diabete. Inoltre, la bacca è ricca di composti polifenolici, che non solo influenzano le proprietà organolettiche del vino, conferendogli colori, aromi e sapori specifici, ma esercitano anche un'azione antiossidante importante per la salute umana. (Deluc et al., 2007; Wong et al., 2016).

1.2 Morfologia e fisiologia della vite

La vite è una pianta rampicante, perenne e dallo spiccato rigoglio vegetativo. È una pianta legnosa costituita da organi vegetativi come radici, tronco e foglie e da organi riproduttivi come fiori e frutti. A causa della crisi della fillossera che colpì l'Europa nel XIX secolo, le varietà europee di vite furono innestate su portainnesti americani resistenti all'afide vettore dell'agente eziologico della fillossera (*Daktulosphaira vitifoliae*), al quale le radici di *V. vinifera* L. sono suscettibili. Nella vite si distinguono una parte ipogea, costituita dalle radici, e una parte epigea, formata dal tronco e dai germogli che danno origine alla chioma (Hellman, 2003; Viret e Gindro, 2024). Le radici hanno la funzione di ancorare la vite al suolo, di assorbire acqua e minerali dal terreno, immagazzinarli e trasportarli al resto della pianta tramite i tessuti conduttori. Inoltre, fungono da struttura di stoccaggio dei carboidrati accumulati sotto forma di granuli di amido, e sono il sito di biosintesi di fitormoni che regolano la crescita della pianta. Il sistema radicale della vite si compone principalmente di radici primarie, che crescono in profondità nel terreno fornendo stabilità e consentendo l'accesso a riserve d'acqua. Da queste si diramano le radici secondarie e le radichette, radici molto piccole che grazie alle loro pareti estremamente sottili rappresentano i siti principali per l'assorbimento di acqua e sali minerali (Viret e Gindro, 2024). Il tronco ha la funzione di sostenere le strutture vegetative e riproduttive che si trovano al di sopra del suolo. La parte superiore del tronco prende il nome di testa, la cui altezza viene

determinata dalla potatura iniziale che definisce il sistema di allevamento. Dal tronco di una vite originano brevi ramificazioni da cui si generano tralci o speroni. Sono definiti tralci sia quei rami che ricrescono annualmente, che quelli lignificati. Il tralcio presenta un asse centrale che funge da supporto strutturale per infiorescenze, grappoli e foglie, e contiene i tessuti conduttori (xilema e floema) che trasportano acqua, nutrienti e zuccheri prodotti dalla fotosintesi. Esso è inoltre caratterizzato da nodi e internodi: i nodi sono aree leggermente ingrossate da cui si sviluppano foglie, grappoli e gemme, mentre gli internodi rappresentano i segmenti tra i nodi, la cui lunghezza varia in base alla velocità di crescita stagionale. Le foglie si sviluppano a partire dal meristema apicale del germoglio e sono costituite da una lamina pentalobata con bordo seghettato. Svolgono un ruolo fondamentale nel processo di fotosintesi e negli scambi gassosi grazie alla presenza degli stomi nella pagina inferiore, i quali mantengono l'equilibrio idrico e prevengono la disidratazione, chiudendosi in condizioni di siccità. (Hellman, 2003). Le infiorescenze si sviluppano attorno a un asse centrale, il rachide, collegato al germoglio mediante un peduncolo. La maggior parte dei fiori è ermafrodita, con cinque petali fusi all'apice a formare una caliptra, una sorta di cappuccio che protegge gli organi riproduttivi. A maturità degli organi sessuali, la caliptra raggrinzisce e cade esponendo pistillo ed antere, dando così inizio alla fase di antesi. Gli stami rilasciano i granuli di polline che germinano a contatto con l'apertura stigmatica del pistillo. Questa fase è caratterizzata dalla formazione del tubetto pollinico che, raggiungendo l'ovulo contenuto nell'ovario, dà luogo alla fecondazione (Hellman, 2003; Viret e Gindro, 2024). Le bacche si sviluppano a seguito della fecondazione, quando gli stami degenerano e l'ovario inizia a ingrandirsi. Questa fase prende il nome di allegagione e segna l'inizio della crescita erbacea della bacca che procede fino alla fase di invaiatura (Viret e Gindro, 2024). Le gemme si sviluppano a partire dai nodi delle piante. Nella parte ascellare delle foglie si trovano due tipi di gemme: quella ascellare, che sviluppandosi produce i germogli laterali, e quella latente, che rimane dormiente durante l'inverno per poi svilupparsi l'anno successivo. La gemma latente è costituita da una gemma principale e da una o due gemme secondarie più piccole, che possono crescere simultaneamente o sostituire la gemma primaria in caso di danneggiamento. Il ciclo di sviluppo della vite si estende su due cicli vegetativi consecutivi: il primo anno si formano i primordi dell'infiorescenza, mentre l'anno successivo avviene la differenziazione dei fiori, lo sviluppo dei grappoli e la maturazione di bacche e semi. Le gemme dormienti sono ricoperte da brattee e peli epidermici, che le difendono da condizioni climatiche avverse, insetti e malattie. All'interno di queste gemme si formano i primordi di tutti gli organi vegetativi e riproduttivi. Dopo la formazione delle strutture

riproduttive, le gemme entrano in dormienza fino alla primavera successiva, quando riprendono la loro crescita in risposta alle condizioni ambientali e completano il loro sviluppo con la formazione di fiori e bacche. (Viret e Gindro, 2024; Monteiro et al., 2021).

1.3 Fenologia e cambiamento climatico

La fenologia è la scienza che studia le fasi di sviluppo ciclico delle piante e degli animali, in relazione ai cambiamenti stagionali e alle condizioni climatiche. Nella vite, la fenologia è un aspetto complesso che riflette l'interazione di diversi tratti quantitativi e qualitativi dello sviluppo, come germogliamento, fioritura, invaiatura e maturazione dei frutti, in relazione all'adattamento all'ambiente di crescita e ai cambiamenti climatici (Costantini et al., 2008). Il cambiamento climatico, con fenomeni sempre più frequenti e intensi, pone nuove sfide e minacce al settore vitivinicolo (Bernáth et al., 2021). La composizione delle bacche e la qualità del vino dipendono dai principali fattori climatici, come la disponibilità idrica, le radiazioni, la temperatura e la concentrazione di gas serra (CO₂) (Pastore et al., 2022). Gli effetti più rilevanti del cambiamento climatico sono la compressione della fenologia e l'anticipo della data di raccolta. Inoltre, il clima, anche con piccole variazioni nella temperatura media stagionale, influisce sul metabolismo primario e secondario delle bacche nonché sulla performance varietale nello specifico agroecosistema. In ambienti più caldi, è stato osservato un anticipo degli eventi fenologici, uno sviluppo vegetativo accelerato e una maturazione più veloce o talvolta più lenta, con effetti più intensi nelle cultivar rosse rispetto a quelle bianche (Pastore et al., 2022). La fenologia della vite e gli indici di maturazione delle bacche, oltre ad essere estremamente sensibili al clima, sono fortemente specifici per genotipo. È stata osservata una variabilità nella risposta fenologica non solo tra regioni distanti, ma anche su brevi distanze all'interno di una stessa area vinicola (Bernáth et al., 2021). È quindi fondamentale conoscere la fenologia della vite per valutare l'impatto del cambiamento climatico e l'adattamento delle colture a quest'ultimo, al fine di selezionare varietà idonee a determinati ambienti e climi, preservandone la resa e la qualità dei prodotti. A tal proposito vi sono numerose scale fenologiche che descrivono accuratamente le fasi di sviluppo delle piante coltivate. Queste spesso si basano su principi diversi, rendendo difficile il confronto dei dati raccolti sul campo. Per garantire una maggiore comparabilità e uniformità è stato messo a punto un sistema standardizzato che descrive le fasi fenologiche di crescita delle piante, inclusa la vite: la scala BBCH. Questa è cruciale per monitorare le varie fasi di sviluppo, dal germogliamento fino alla maturazione, supportando decisioni gestionali come la potatura, l'applicazione di trattamenti fitosanitari e la vendemmia. La scala BBCH suddivide il ciclo di crescita delle piante in stadi di sviluppo principali (macro-stadi) e in stadi secondari (micro-stadi) che descrivono brevi periodi

specifici per lo sviluppo di ciascuna coltura. Le fasi che compongono gli stadi di sviluppo principali e secondari sono codificate con numeri da 0 a 9, consentendo una codifica precisa di ciascuna fase mediante numeri a due cifre. Nello sviluppo fenologico della vite sono state omesse le macro-fasi 2 (formazione dei germogli laterali), 3 (sviluppo del germoglio) e 4 (sviluppo degli organi di propagazione vegetativa), in quanto poco significative per definire periodi specifici per l'applicazione di trattamenti fitosanitari (Tabella 1). Per quanto riguarda invece le fasi di sviluppo e maturazione del frutto, rispettivamente le fasi principali 7 e 8, sono necessari trattamenti fitosanitari per proteggere non solo le bacche in fase di sviluppo, ma anche foglie e germogli. (Lorenz et al., 1995).

Tabella 1. Codifica e descrizione delle fasi fenologiche della vite secondo lo schema BBCH (Lorenz et al., 1995)

BBCH-Code	Description	BBCH-Code	Description
Principal growth stage 0	Sprouting	61	Beginning of flowering: 10% of flowerhoods fallen
00	Dormancy: winter buds pointed to rounded, bright or dark brown according to cultivar, bud scales more or less closed according to cultivar	63	Early flowering: 30% of flowerhoods fallen
01	Beginning of bud swelling: buds begin to expand inside the bud scales	65	Full flowering: 50% of flowerhoods fallen
03	End of bud swelling: buds swollen, but not green	68	80% of flowerhoods fallen
05	"Wool stage": brown wool clearly visible	69	End of flowering
07	Beginning of bud burst: green shoot tips just visible	Principal growth stage 7	Development of fruits
09	Bud burst: green shoot tips clearly visible	71	Fruit set: fruits begin to swell, remains of flowers lost
Principal growth stage 1	Leaf development	73	Berries goat-sized, bunches begin to hang
11	First leaf unfolded and spread away from shoot	75	Berries pea-sized, bunches hang
12	Two leaves unfolded	77	Begin of berry touch
13	Three leaves unfolded	79	Berry touch complete
14	Four leaves unfolded	Principal growth stage 8	Ripening of berries
15	Five leaves unfolded	81	Beginning of ripening: berries begin to brighten in colour
16	Six leaves unfolded	83	Berries brightening in colour
19	Nine or more leaves unfolded	85	Softening of berries
Principal growth stage 5	Inflorescence emergence	89	Berries ripe for harvest
53	Inflorescence clearly visible	Principal growth stage 9	Senescence
55	Inflorescence swelling, flowers closely pressed together	91	After harvest: end of wood maturation
57	Inflorescences fully developed, flowers separating	92	Beginning of leaf discoloration
Principal growth stage 6	Flowering	93	Beginning of leaf fall
60	First flowerhoods detached from the receptacle	95	50% of leaves fallen
		97	End of leaf fall
		99	Post-harvest treatments

1.4 Composizione della bacca

La vite produce bacche carnose derivanti dall'ovario del fiore (Serrano et al., 2017). La struttura dei frutti carnosì si è evoluta per attrarre vertebrati frugivori, facilitando così la dispersione dei semi. Inoltre, i frutti contengono sostanze che favoriscono il rapido transito dei semi nell'apparato digerente degli animali, riducendo l'impatto negativo dei predatori di semi e aumentando le possibilità di germinazione (Cerri e Reale, 2020).

In seguito all'antesi, l'ovario inizia a sviluppare il pericarpo, composto da tre tessuti anatomicamente distinti (Figura 1):

- **l'esocarpo**: comunemente chiamato buccia, è ricoperto da uno strato cuticolare costituito da cutina e cere, con cellule che possono presentare pareti cellulari sottili o ispessite (Cerri e Reale 2020). L'esocarpo ha la funzione di proteggere i tessuti interni sia da stress biotici, come attacchi di parassiti, che da stress abiotici, come variazioni di temperatura e umidità. Durante la maturazione, nell'esocarpo ha luogo la sintesi di antociani, pigmenti che conferiscono il caratteristico colore alla bacca (Lijavetzky et al., 2012).
- il **mesocarpo**: comunemente chiamato polpa, è composto da 25-30 strati di cellule parenchimatiche altamente vacuolate, situate tra gli strati ipodermici dell'esocarpo e gli strati dell'endocarpo (Hardie et al., 1996). Durante la maturazione, la polpa funge da serbatoio di zuccheri e acidi, elementi chiave che influenzano il sapore del frutto. Il principale carboidrato importato nella polpa è il saccarosio, prodotto nelle foglie in seguito alla fotosintesi e traslocato nella bacca attraverso il floema. Il saccarosio, a partire dall'inizio dell'invasatura, viene convertito in glucosio e fruttosio, immagazzinati nel vacuolo delle cellule del mesocarpo (Robinson et al., 2000; Lijavetzky et al., 2012).
- **l'endocarpo**: è uno strato sottile di cellule, talvolta degenerato, che aderisce strettamente alle pareti epidermiche del tegumento del seme o alla regione locale, contribuendo alla protezione dei semi (Cerri e Reale, 2020).

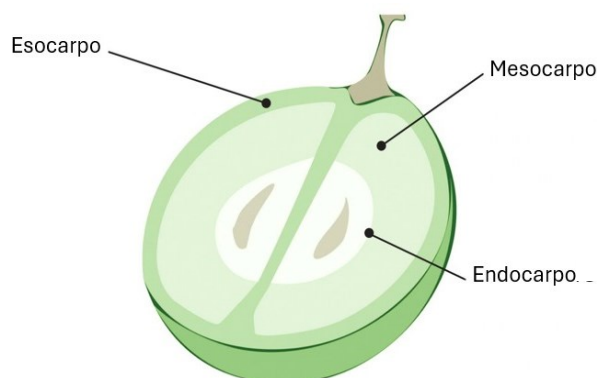


Figura 1. Struttura della bacca d'uva (immagine modificata da Fontes et al., 2011).

1.5 Maturazione

L'uva è un frutto non climaterico e lo sviluppo delle sue bacche segue una curva di crescita a doppio andamento sigmoide, con tre stadi distinti che coinvolgono due fasi di rapida crescita separate da una fase di stasi, durante la quale l'espansione cellulare rallenta e i semi maturano (Wei et al., 2020). Nella prima fase, in concomitanza di una rapida crescita cellulare, ha luogo la biosintesi di composti fenolici come tannini e idrossicinnamati, e di acidi organici, tra cui acido tartarico e malico. (Wong et al., 2016). Alla fine della seconda fase, la bacca entra in invaiatura, fase in corrispondenza di cui ha inizio la vera e propria maturazione. Durante questa fase, la bacca è soggetta ad un secondo periodo di rapida espansione cellulare, con il pericarpo che cresce fino a raggiungere le dimensioni finali. La fase di invaiatura segna l'inizio di una serie di cambiamenti significativi che includono l'accumulo di zuccheri, l'ammorbidimento delle bacche, la sintesi degli antociani, il catabolismo degli acidi organici e la maturazione del sapore (Figura 2) (Zenoni et al., 2010). La degradazione del malato durante la maturazione causa un incremento del pH della linfa cellulare che, mediamente, da 2,5 della fase erbacea raggiunge un valore di 3,5. (Terrier et al., 2005). Al contrario, il livello di acido tartarico rimane costante dopo l'invaiatura ed è più elevato a maturazione (Zenoni et al., 2010).

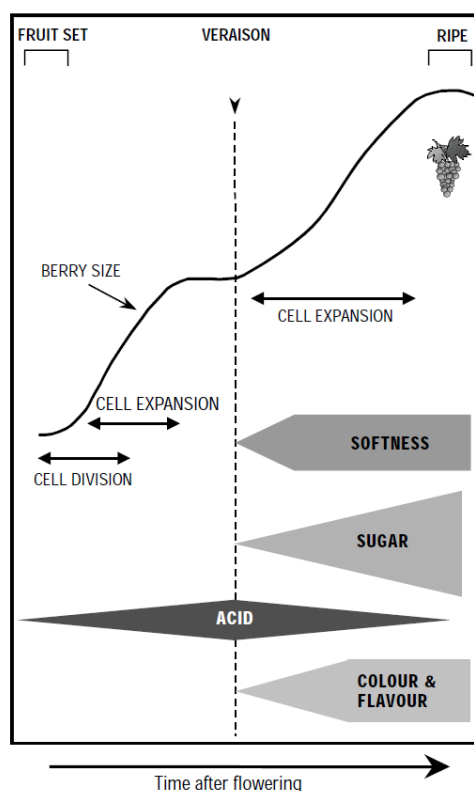


Figura 2. Rappresentazione schematica dello sviluppo della bacca. La curva indica le variazioni nella dimensione dell'acino. L'inizio della maturazione (invaiatura) è indicato dalla linea verticale tratteggiata. Dopo l'invaiatura avvengono l'ammorbidimento, l'accumulo degli zuccheri, il metabolismo degli acidi organici e la sintesi dei composti responsabili di colore ed aroma (immagine modificata da Robinson et al., 2000).

1.6 Trascrittomica della maturazione

La maturazione delle bacche inizia con l'invaiaitura e prosegue fino alla raccolta dei frutti (Theine et al., 2021). Poiché l'invaiaitura è un tratto quantitativo, essa è controllata da numerosi loci genetici. Zyprian et al. (2016) hanno identificato un *Quantitative Trait Locus* (QTL) associato al momento dell'invaiaitura, situato sul cromosoma 16, denominato *Ver1*, il quale era stato individuato anche precedentemente da Costantini et al. (2008). A questo QTL si associa un ulteriore QTL sul cromosoma 18, chiamato *Ver2*, che esercita un effetto minore. Integrando diverse studi su analisi QTL, sono stati identificati diversi meta-QTL associati al controllo genetico del tempo di invaiaitura, i più significativi si trovano sui cromosomi 14, 16, 18. (Theine et al., 2021). Uno studio di Frenzke et al. (2024), ha identificato un fattore di trascrizione (TF), VviERF27, localizzato nel locus *Ver1*, ritenuto il possibile candidato per il controllo dell'inizio della maturazione. Questo TF appartiene alla famiglia multigenica di fattori di trascrizione *APETALA2/Ethylene Responsive Factor* (*AP2/ERF*) coinvolta nel controllo del metabolismo, nella risposta allo stress e nello sviluppo delle piante mediante il legame ai motivi DRE e GCC nelle regioni a monte dei geni target. Diversi studi hanno dimostrato che i membri della sottoclasse degli ERF hanno un ruolo cruciale nella maturazione dei frutti, contribuendo a regolare diversi processi, come l'ammorbidimento, mediante l'attivazione dei geni responsabili della degradazione della parete cellulare (Theine et al., 2021; Wong et al., 2016). Il passaggio dalla fase vegetativa a quella di maturazione è accompagnato da una significativa riprogrammazione trascrittomica. In uno studio condotto da Palumbo et al. (2014) sono stati individuati numerosi geni, definiti geni **switch**, responsabili di questa transizione. In particolare, è stato osservato come i geni *switch* agiscano da regolatori negativi dei processi metabolici vegetativi, sottoregolando geni coinvolti nella fotosintesi, nel metabolismo energetico, nel metabolismo lipidico e nella risposta allo stress abiotico. Al contrario, risultano attivate le vie di risposta allo stress biotico, il metabolismo secondario (tra cui quello dei carboidrati), suggerendo che il passaggio alla fase di maturazione coinvolga prevalentemente la soppressione delle vie vegetative piuttosto che l'attivazione di vie specifiche della maturazione. Tra i TF ritenuti i principali regolatori del passaggio dalla fase vegetativa a quella di maturazione vi sono membri della famiglia NAC, MYB e proteine con dominio *Lateral Organ Boundaries* (LOB), necessarie per la determinazione della forma degli organi. Uno studio successivo, condotto da Fasoli et al. (2018) ha individuato come principali attori dell'inizio della maturazione, i TF appartenenti alle famiglie geniche bHLH e WRKY. In particolare, bHLH075, che induce i geni associati all'ammorbidimento dell'acino tra cui geni che codificano per espansine e pectato liasi, e WRKY19, che amplifica il segnale di

attivazione verso altri regolatori trascrizionali. I TF WRKY legano un dominio del DNA noto come W-box, presente nei promotori di un gran numero di geni correlati alla difesa delle piante (Terrier et al., 2005). I TF bHLH invece, si legano al dominio CATGTG nel promotore dei geni target, riconosciuto anche dai TF della famiglia NAC. La rete trascrizionale che coinvolge i fattori di trascrizione bHLH e NAC potrebbe essere fondamentale per regolare la crescita delle bacche e la determinazione della dimensione nella vite (Wong et al., 2016). In numerosi lavori, tra cui quello condotto da Zenoni et al. (2010) sono state individuate altre famiglie geniche responsabili di alcuni cambiamenti fisici e biochimici che avvengono durante lo sviluppo delle bacche. Tra queste vi sono membri della famiglia della glutazione sintasi (GST), coinvolti nell'accumulo di antocianine nel vacuolo, membri della famiglia delle stilbene sintasi (STS) responsabili della sintesi del resveratrolo e membri della famiglia dei TF MYB, direttamente coinvolti nella regolazione della biosintesi dei flavonoidi. Nel caso delle cultivar a bacca rossa, i fattori di trascrizione MYBA1 e MYBA2 controllano la glicosilazione delle antocianidine attraverso la regolazione dell'espressione del gene *flavonoide 3-O-glucosiltransferasi (UFGT)*. La via di biosintesi delle antocianine è inoltre controllata dal complesso trascrizionale R2R3-MYB/bHLH/WD40 (MBW) nella vite (Serrano et al., 2017). Questi esempi suggeriscono che la fase di maturazione sia regolata da una cascata gerarchica di attivazione e repressione genica, orchestrata da numerosi TF che cooperano in una rete trascrizionale finemente regolata.

1.7 Ormoni coinvolti nella maturazione

La complessa riprogrammazione del trascrittoma, proteoma e metaboloma richiede l'interazione di molteplici segnali ormonali (Figura 3), alcuni dei quali promuovono la maturazione mentre altri la reprimono. In particolare, l'acido abscissico (ABA), i brassinosteroidi (BR) e l'etilene (ET), attraverso interazioni complesse, sono dei promotori della maturazione, mentre l'auxina (IAA) si comporta da repressore (Fortes et al., 2015).

L'ABA è il principale regolatore dell'inizio della maturazione della bacca. È stato osservato che un aumento dei livelli di ABA nella fase di invaiatura è accompagnato da un accumulo di zuccheri, colorazione e ammorbidimento. Un ruolo noto dell'ABA è quello di favorire la produzione di composti fenolici, come antociani e tannini, e di stimolare l'assorbimento e l'accumulo degli zuccheri catalizzando l'attività delle invertasi, enzimi responsabili della conversione del saccarosio in glucosio e fruttosio, e inducendo i trasportatori di zucchero (Xu et al., 2018; Fortes et al., 2015; Cramer et al., 2014).

I BR sono ormoni vegetali steroidi essenziali per il normale sviluppo delle piante (Fortes et al., 2015). Come dimostrato dall'applicazione di BR esogeni, questi ormoni sembrano avere

un effetto simile all'ABA nell'aumentare il contenuto di antociani, portando a una colorazione prematura delle bacche (Serrano et al., 2017).

Nonostante l'uva sia considerata un frutto non climaterico, si sono evidenziati leggeri aumenti di etilene e di CO₂, poco prima dell'invasatura, in concomitanza di un incremento dell'attività della 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC) ossidasi, enzima chiave della biosintesi dell'etilene. La rilevazione dell'etilene nella bacca risulta difficile a causa dei bassi livelli presenti e delle problematiche tecniche associate. Alcuni studi mostrano modesti aumenti dei livelli di etilene intorno all' invasatura, mentre altri non lo confermano. Tuttavia, c'è un consenso generale sul fatto che i livelli di etilene rimangano bassi durante la maturazione (Böttcher et al., 2013; Pilati et al., 2007). Il ruolo dell'etilene nella maturazione è stato ampiamente studiato attraverso l'applicazione di acido 2-cloroetilfosfonico (CEPA), un composto che rilascia etilene durante l'uso. L'effetto dell'etilene risulta però controverso: a seconda della fase di sviluppo in cui viene applicato, può agire sia come promotore dell'invasatura, accelerando la maturazione, sia come repressore, ritardandola. In particolare, se applicato durante la fase di pre-invasatura tende a ritardarla. Questa risposta bifasica all'etilene evidenzia la complessità della regolazione ormonale durante lo sviluppo della bacca (Böttcher et al., 2013).

Le auxine sono coinvolte in molti aspetti dello sviluppo delle piante. Tuttavia, all'inizio della maturazione si osservano dei bassi livelli della forma attiva di IAA, associati ad un aumento della forma coniugata. I trattamenti con auxina durante il periodo di pre-invasatura inibiscono la maturazione, ritardando l'aumento delle dimensioni delle bacche, l'accumulo di zuccheri e il contenuto di antociani, a differenza dell'ABA e dei BR (Fortes et al., 2015; Serrano et al., 2017).

La maturazione delle bacche è regolata dall' interazione di diversi ormoni che influenzandosi mutualmente agiscono a livello trascrizionale regolando i vari processi fisiologici che stanno alla base della maturazione. Durante l'invasatura, si osserva infatti un'interazione sinergica tra ABA ed etilene, con l'etilene che influenza l'accumulo di ABA e l'espressione del gene *VvNCED1*, fondamentale per la biosintesi di tale ormone. Questo suggerisce che sia ABA che etilene siano essenziali per avviare la maturazione. Mentre l'etilene stimola l'ABA, l'auxina ha un effetto regolatore negativo sui processi di maturazione indotti dall'ABA. Analisi trascrittomiche delle bacche trattate con acido naftalenacetico (NAA) in pre-invasatura hanno evidenziato un significativo ritardo nella maturazione, con sottoregolazione dei geni della biosintesi dei flavonoidi e dell'espansione cellulare,

accompagnata da un aumento dell'espressione dei geni dell'etilene e da una diminuzione di quelli coinvolti nella biosintesi e percezione dell'ABA (Fortes et al.,2015).

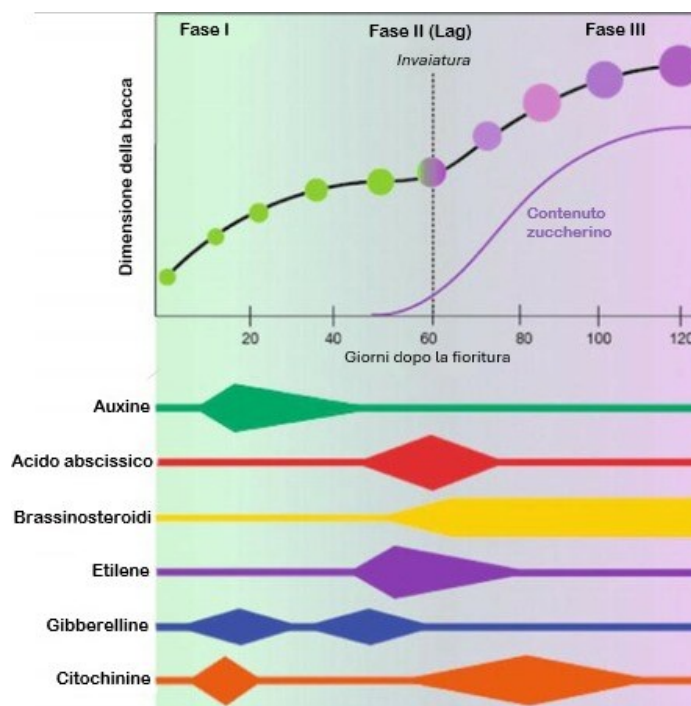


Figura 3. Rappresentazione schematica del contenuto ormonale nelle fasi di sviluppo della bacca d'uva. I cambiamenti nei livelli ormonali sono mostrati per auxine, acido abscissico, brassinosteroidi, etilene, gibberelline e citochinine nelle fasi I, II e III dello sviluppo della bacca d'uva (immagine modificata da Parada et al., 2016).

1.8 Caratteristiche di Pinot Grigio

Il Pinot Grigio è una mutazione genetica naturale e instabile del Pinot Nero. Questa mutazione riguarda il colore della buccia, che nel Pinot Grigio varia dal grigio-rosato al ramato, a seconda delle condizioni ambientali e delle tecniche di coltivazione. Originario della Francia, in particolare dalla regione della Borgogna, il Pinot Grigio si è poi diffuso in molte altre zone vitivinicole, tra cui l'Italia, dove ha trovato il suo massimo successo, specialmente nel Nord-Est, come in Veneto, Friuli-Venezia Giulia e Trentino-Alto Adige.

Il tralcio, quando raggiunge le dimensioni di 10-20 cm, presenta un apice espanso di colore bianco-verdastro con leggere sfumature rosa pallido. Le foglie apicali sono spiegate e di colore verde-biancastro, mentre quelle basali sono verdi, rotondeggianti e spiegate. Durante la fioritura, le foglie appaiono piccole e trilobate con la pagina superiore lucida e di colore verde-cupo (Figura 4B), mentre la pagina inferiore appare più chiara. Durante la stagione autunnale, le foglie assumono una colorazione giallastra, mentre il picciolo, corto e glabro, diventa di colore rosso-violaceo. Il tralcio erbaceo ha sezione ellittica, a superficie liscia e di colore grigio-verde con striature marroni. I tendili sono bifidi. L'infiorescenza raggiunge una lunghezza tra gli 8 e i 10 cm, composta da fiori ermafroditi ed autofertili. Il

grappolo, una volta raggiunta la maturità industriale, si presenta compatto e di piccole dimensioni, lungo 13 cm circa con una conformazione cilindrica (Figura 4A). I pedicelli, che collegano la bacca al rachide, risultano corti, sottili e di colore verde. Le bacche sono piccole e leggermente ellittiche con una buccia di medio spessore, consistente e di colore grigio-violetto. La polpa risulta essere succosa, molle e dal sapore neutro. Il tralcio legnoso è corto, sottile e non ramificato, con una sezione trasversale ellittica, leggermente striata. I nodi sono evidenti con una colorazione violacea, mentre le gemme appaiono piccole e sporgenti. Il tronco risulta essere di media vigoria. Il Pinot Grigio è caratterizzato da un germogliamento e una maturazione precoci. Nello specifico, il germogliamento ha luogo nella III decade di aprile e la maturazione nella II decade di settembre. La varietà è normalmente resistente alla peronospora e all'oidio, ma è sensibile al marciume dell'uva (Cosmo e Polsinelli, 1960).

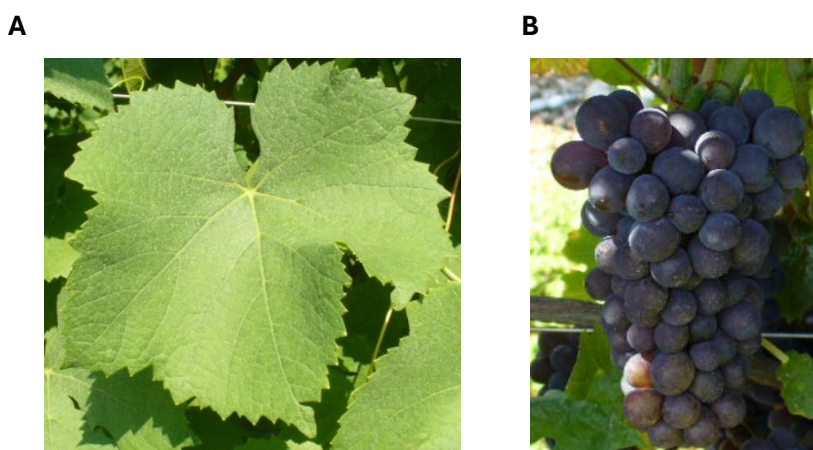


Figura 4. Foglia (A) e grappolo (B) della varietà Pinot Grigio (immagine modificata da Catalogo Nazionale delle Varietà di Vite)

1.9 Caratteristiche di Raboso Piave

Il Raboso Piave è un vitigno italiano coltivato principalmente nel Veneto, particolarmente diffuso nelle province di Treviso, Venezia, Padova e Rovigo. Quando il germoglio raggiunge una lunghezza di 10-20 cm, presenta un apice globoso, di colore biancastro, con l'asse visibilmente ricurvo. Le foglie apicali appaiono bianche nella pagina superiore e verdastre nella pagina inferiore. Quelle basali sono invece di colore verde chiaro superiormente e grigiastre inferiormente. Nella fase di fioritura, l'apice del germoglio è espanso, biancastro e un po' ricurvo. Le foglie sono di media grandezza, pentagonali e spesso lobate, dal colore verde scuro e una leggera pubescenza sulla pagina inferiore (Figura 5A). Nella stagione autunnale, le foglie assumono una colorazione rossastra. Il tralcio ha una sezione trasversale circolare o leggermente ellittica, con una superficie liscia e glabra, e dal colore verde con riflessi dorati, a volte bronzee da un lato. I tendili sono bifidi. L'infiorescenza è

cilindrica, alata e raggiunge una lunghezza di 10-15 cm. Il grappolo, a maturità industriale, è di circa 15-20 cm, compatto, spesso un po' ricurvo, e di forma cilindro-piramidale (Figura 5B). Inizialmente i pedicelli sono corti e di colore verde, per poi diventare rossastri alla maturazione del frutto. La bacca è di medie dimensioni, ha una forma sferoidale, con buccia spessa, pruinosa e di colore scuro. La polpa risulta carnosa, acidula e astringente. Il tralcio legnoso ha una lunghezza media di 1,5-2 m, è abbastanza robusto e presenta una superficie liscia e leggermente striata. I nodi sono evidenti, di colore chiaro, mentre le gemme appaiono coniche e sporgenti. Raboso Piave germoglia precocemente, ma matura tardivamente. In particolare, il germogliamento avviene nella I decade di aprile, mentre la maturazione, nella II decade di ottobre. La varietà mostra una buona resistenza verso i marciumi, peronospora e botrite, ma il germogliamento precoce lo rende particolarmente sensibile alle gelate primaverili, che possono comprometterne il raccolto (Cosmo e Polsinelli, 1960).

A



B



Figura 5. Foglia (A) e grappolo (B) della varietà Raboso Piave (immagine modificata da Catalogo Nazionale delle Varietà di Vite).

2. Scopo dello studio

Il processo di selezione varietale basato sul contenuto zuccherino ha determinato, in modo indiretto, una selezione anche per un altro carattere di grande rilevanza agronomica: la precocità di maturazione. Tuttavia, alla luce dell'attuale cambiamento climatico, questa precocità sta emergendo come una sfida critica, poiché è associata a diverse problematiche di natura agronomica, enologica e sociale.

L'aumento delle temperature accelera ulteriormente il ciclo di maturazione, causando squilibri tra la maturazione tecnologica (zuccheri e alcol) e quella fenolica e aromatica, compromettendo la qualità del vino. Inoltre, la raccolta anticipata genera pressioni sulla gestione delle operazioni viticole e può comportare ricadute economiche e sociali, soprattutto nelle aree viticole tradizionali dove il calendario vendemmiale è parte integrante della cultura e della società locale. La comprensione approfondita delle determinanti genetiche che influenzano la precocità o la tardività della maturazione rappresenta un aspetto cruciale per affrontare le sfide poste dal cambiamento climatico al settore vitivinicolo. Fattori ambientali, quali la disponibilità idrica, le radiazioni solari, temperature e concentrazione di gas serra, esercitano un impatto significativo sulla composizione delle bacche, alterando le proprietà organolettiche dei vini. Pertanto, l'identificazione dei geni coinvolti nella maturazione e lo studio delle loro risposte alle variazioni ambientali costituiscono strumenti fondamentali per il miglioramento genetico della vite.

L'obiettivo di questa tesi è identificare i geni chiave coinvolti nella regolazione del processo di maturazione delle bacche in due varietà di vite caratterizzate da epoche di maturazione molto diverse, Pinot Grigio e Raboso Piave, mediante un'analisi trascrittomica condotta su campioni collezionati in diversi stadi dello sviluppo. La comparazione tra i profili di espressione genica tra le due varietà ha consentito e consentirà di evidenziare eventuali variazioni nei pattern di espressione genica che potrebbero spiegare le divergenze nei tempi di maturazione.

Questo studio mira a fornire una comprensione dettagliata della regolazione genica della maturazione delle bacche, utilizzando un approccio comparativo tra varietà caratterizzate da tempistiche di maturazione differenti. I risultati ottenuti potranno contribuire allo sviluppo di varietà di vite adattate a specifiche condizioni climatiche, favorendo una viticoltura sostenibile e resiliente agli effetti del cambiamento climatico.

3. Materiali e metodi

3.1 Campionamento e dissezione del materiale vegetale

Il materiale vegetale è stato campionato presso i campi collezione dei Vivai Cooperativi di Rauscedo, situati a Fossalon di Grado (GO) nella stagione produttiva 2023. Le varietà interessate sono Pinot Grigio (VCR5) e Raboso Piave (R11), entrambe innestate su Kober 5BB, messe a dimora nel 2017 con sesto d'impianto 1 x 2.8 m e allevate con sistema Guyot singolo senza irrigazione. Per Pinot Grigio sono state campionate bacche in otto diversi stadi di maturazione, mentre per Raboso Piave in dodici, ognuno dei quali in triplice replica biologica costituita da 100/200 bacche, in base allo stadio di sviluppo. I campionamenti sono stati sempre effettuati tra le 7.30 AM e le 9.30 AM secondo l'ordine riportato in tabella (Tabella 2). Le bacche di ogni replica sono state contate, pesate e suddivise in 3 gruppi. Le 50 bacche per le analisi molecolari sono state congelate in azoto liquido direttamente in campo, trasferite in laboratorio e conservate a -80°C. Dieci bacche sono state conservate per future analisi supplementari, mentre le rimanenti sono state trasportate in laboratorio in un frigo elettrico portatile e impiegate ai fini della valutazione dei parametri qualitativi del mosto. Ogni campione è stato denominato con:

- Le iniziali della varietà di appartenenza (PG; RP)
- Il giorno dell'anno corrispondente alla data di campionamento (DOY)
- Il numero relativo alla replica biologica (1,2,3)

Per quanto riguarda il materiale destinato alle analisi trascrittomiche, ogni bacca è stata dissezionata nelle sue componenti principali: esocarpo (SK), mesocarpo (PU), seme (SE).

Tabella 2. La tabella riporta le date di campionamento e i codici assegnati ai campioni di entrambe le varietà.

Data di Campionamento	Denominazione campioni di Pinot Grigio	Denominazione campioni di Raboso Piave
26/06/2023	PG-177-1	RP-177-1
26/06/2023	PG-177-2	RP-177-2
26/06/2023	PG-177-3	RP-177-3
07/07/2023	PG-188-1	RP-188-1
07/07/2023	PG-188-2	RP-188-2
07/07/2023	PG-188-3	RP-188-3
18/07/2023	PG-199-1	RP-199-1
18/07/2023	PG-199-2	RP-199-2
18/07/2023	PG-199-3	RP-199-3
27/07/2023	PG-208-1	RP-208-1
27/07/2023	PG-208-2	RP-208-2

27/07/2023	PG-208-3	RP-208-3
03/08/2023	PG-215-1	RP-215-1
03/08/2023	PG-215-2	RP-215-2
03/08/2023	PG-215-3	RP-215-3
16/08/2023	PG-228-1	RP-228-1
16/08/2023	PG-228-2	RP-228-2
16/08/2023	PG-228-3	RP-228-3
24/08/2023	PG-236-1	RP-236-1
24/08/2023	PG-236-2	RP-236-2
24/08/2023	PG-236-3	RP-236-3
04/09/2023	PG-247-1	RP-247-1
04/09/2023	PG-247-2	RP-247-2
04/09/2023	PG-247-3	RP-247-3
13/09/2023		RP-256-1
13/09/2023		RP-256-2
13/09/2023		RP-256-3
22/09/2023		RP-265-1
22/09/2023		RP-265-2
22/09/2023		RP-265-3
03/10/2023		RP-276-1
03/10/2023		RP-276-2
03/10/2023		RP-276-3
12/10/2023		RP-285-1
12/10/2023		RP-285-2
12/10/2023		RP-285-3

3.2 Analisi FOSS

Per effettuare una valutazione qualitativa dei parametri del mosto, gli acini di entrambe le varietà sono stati torchiati manualmente. Il mosto ottenuto è stato raccolto in tubi da 50 ml, centrifugato per 5 minuti a 10.000 rpm (Hermle, Z306), quindi trasferito in un nuovo tubo e successivamente analizzato utilizzando un analizzatore FT-IR (FOSS, WineScan). Questo strumento consente un'analisi rapida dei parametri chimici, inclusi il contenuto di zuccheri, gli acidi organici e il pH.

3.3 Estrazione dell'RNA e valutazione qualitativa e quantitativa

L'esocarpo e il mesocarpo sono stati successivamente macinati in azoto liquido con l'utilizzo di mortaio e pestello. L'RNA è stato estratto utilizzando l'RNA Pure Plant Plus Kit (Tiagen) seguendo il protocollo fornito a partire da 100 mg di tessuto precedentemente macinato. La concentrazione e la qualità dell'RNA di ciascun campione sono state misurate con il NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE), mentre l'integrità è stata valutata tramite l'RNA Nano 6000 Assay Kit del sistema Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent

Technologies, CA, USA). La valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA è stata essenziale per garantire l'efficacia della corsa di sequenziamento.

3.4 Sequenziamento dell'RNA

Il sequenziamento e le analisi bioinformatiche di base sono state eseguite dal service di Biomarker Technologies BMK (Münster, Germania).

La corsa di sequenziamento è stata eseguita tramite piattaforma Illumina Novaseq 6000 che ha permesso di eseguire un sequenziamento massivo in parallelo di short reads della lunghezza di 50-500 bp con un output fino a 6 Tb. La piattaforma prevede la preparazione di librerie, la generazione di cluster attraverso l'amplificazione e il sequenziamento per sintesi (SBS). Le librerie di sequenziamento sono state generate mediante il NEBNext Ultra™ RNA Library Prep Kit per Illumina (NEB, USA) a partire da 1 µg di RNA per campione. A questi sono stati aggiunti gli adattatori e gli index, per poter effettuare un sequenziamento sincrono di più campioni, differenti tra loro. I campioni sono stati clusterizzati in base all'index utilizzando il TruSeq PE Cluster Kit v4-cBot-HS (Illumina). Il sequenziamento in ogni cluster è avvenuto tramite sintesi Illumina (SBS). Le reads ottenute dal sequenziamento sono state sottoposte ad una fase di "trimming" e di filtraggio, per rimuovere gli adattatori ed eliminare le reads di bassa qualità. Quest'ultime sono state poi mappate sul genoma di riferimento: PN40024_T2T (Shi et al., 2023) utilizzando il sistema HISAT2 (Kim et al., 2015).

3.5 Analisi trascrittomiche

Tutte le analisi trascrittomiche sono state svolte in RStudio (v.2024.9.0.375).

Sono state condotte delle analisi esplorative, tra cui un'analisi delle componenti principali (PCA) che ha permesso di esaminare la variabilità dei campioni delle due varietà di vite, Pinot Grigio (PG) e Raboso Piave (RP), nei tessuti di buccia e polpa. Per la pipeline di analisi dei geni differenzialmente espressi (DEG) è stato utilizzato il pacchetto DESeq2 (Love et al., 2014).

Successivamente è stata condotta un'analisi dei geni differenzialmente espressi (DEGs) mediante DESeq2, al fine di evidenziare variazioni significative nei livelli di espressione genica. In particolare, sono stati confrontati i campioni di Raboso Piave e Pinot Grigio all'interno delle classi individuate mediante l'analisi PCA. I confronti sono stati eseguiti distintamente per buccia e polpa, poiché i due tessuti rappresentano differenze sia dal punto di vista anatomico che metabolico. I criteri per i geni differenzialmente espressi sono stati impostati come $|\log_2\text{Fold Change}| > 2$ e False Discovery Rate < 0.05 . Il Fold Change (FC) rappresenta il rapporto di espressione genica in due campioni, mentre il False

Discovery Rate (FDR) fa riferimento al p-value aggiustato, che viene utilizzato per limitare il numero di falsi positivi.

È stata effettuata un'analisi di arricchimento funzionale dei geni di interesse utilizzando il pacchetto R gprofiler2 (Kolberg et al., 2020) che ha permesso di classificare i geni in base alle funzioni molecolari, alla componente cellulare e ai processi biologici in cui sono coinvolti. Sono stati considerati come significativamente arricchiti i termini con un p-value inferiore a 0.05.

3.6 Raccolta di dati in letteratura

È stata condotta una ricerca bibliografica esaminando e confrontando studi trascrittomici dedicati al processo di maturazione delle bacche d'uva. Da questa ricerca sono stati selezionati nove articoli, in cui sono stati identificati geni coinvolti in vari processi che avvengono durante la maturazione. Negli studi considerati sono state analizzate diverse cultivar di vite, sia bianche che rosse, utilizzando quattro principali tecniche analitiche: RNA-Seq, analisi QTL, Genotyping-by-sequencing (GBS) e Microarray (Tabella 3). Complessivamente, dalle fonti esaminate sono stati identificati 784 geni.

Tabella 3. La tabella riporta alcune informazioni sugli articoli utilizzati per la ricerca bibliografica, tra cui: il titolo, la referenza, la varietà di vite utilizzata, la tipologia di analisi effettuata e il numero di geni identificati.

Titolo	Referenza	Varietà	Tipo di analisi	N. di geni
Transcriptomic analysis of temporal shifts in berry development between two grapevine cultivars of the pinot family reveals potential genes controlling ripening time	Theine J et al., 2021	Pinot Noir (PN) e Pinot Noir Precoce (PNP)	RNA-Seq	12
Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines	Zyprian et al., 2016	F1 derivante dall'incrocio tra GF.GA-47-42 ('Bacchus' × 'Seyval') e 'Villard blanc'	Analisi QTL	4
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	Palumbo et al., 2015	Sangiovese, Barbera, Negro amaro, Refosco e Primitivo	RNA-Seq	40
Transcriptome profiling and identification of the functional genes involved in berry development and ripening in vitis vinifera	Ma Q., Yang J., 2019	Cultivar 8612 derivante dall'ibridazione di 'Zaohong' e 'Kyoho	RNA-Seq	40
Selection of candidate genes controlling veraison time in grapevine through integration of meta-qtL and transcriptomic data	Delfino et al., 2019	ND	Meta-analisi	78
Timing and order of the molecular events marking the onset of berry ripening in grapevine.	Fasoli et al., 2018	Cabernet Sauvignon e Pinot Noir	RNA-Seq	429
Genotyping-by-sequencing-based high-resolution mapping reveals a single candidate gene for the grapevine veraison locus ver1	Frenzke et al., 2024	F1 derivante dall'incrocio tra cultivar 'Calardis Musqué' e 'Villard Blanc'	Genotyping-by-sequencing (GBS) e analisi QTL	33
Ripening transcriptomic program in red and white grapevine varieties correlates with berry skin anthocyanin accumulation	Massonnet et al., 2017	Sangiovese, Barbera, Negro amaro, Refosco dal peduncolo rosso, Primitivo, Vermentino, Garganega, Glera, Moscato bianco e Passerina	RNA-seq	19
Transcriptomic analysis of the late stages of grapevine (vitis vinifera cv. Cabernet sauvignon) berry ripening reveals significant induction of ethylene signaling and flavor pathways in the skin	Cramer et al., 2014	Cabernet Sauvignon	Microarray	130

4. Risultati

4.1 Analisi comparativa della maturazione e delle caratteristiche chimiche di Pinot Grigio e Raboso Piave

Per comprendere i cambiamenti che avvengono durante il processo di maturazione, sono state effettuate analisi chimiche del mosto delle due varietà di vite studiate, Pinot Grigio e Raboso Piave, utilizzando il sistema FOSS WineScan. Questo strumento FT-IR permette una rapida e precisa valutazione dei principali parametri chimici del mosto, come il contenuto di zuccheri (TSS), gli acidi organici (acido malico e tartarico), l'acidità totale (TA) e il pH. L'utilizzo del WineScan ha consentito di monitorare in modo dettagliato e continuo le variazioni di questi parametri nel corso della maturazione, offrendo un quadro completo delle dinamiche chimiche nelle due varietà, ed evidenziandone le differenze.

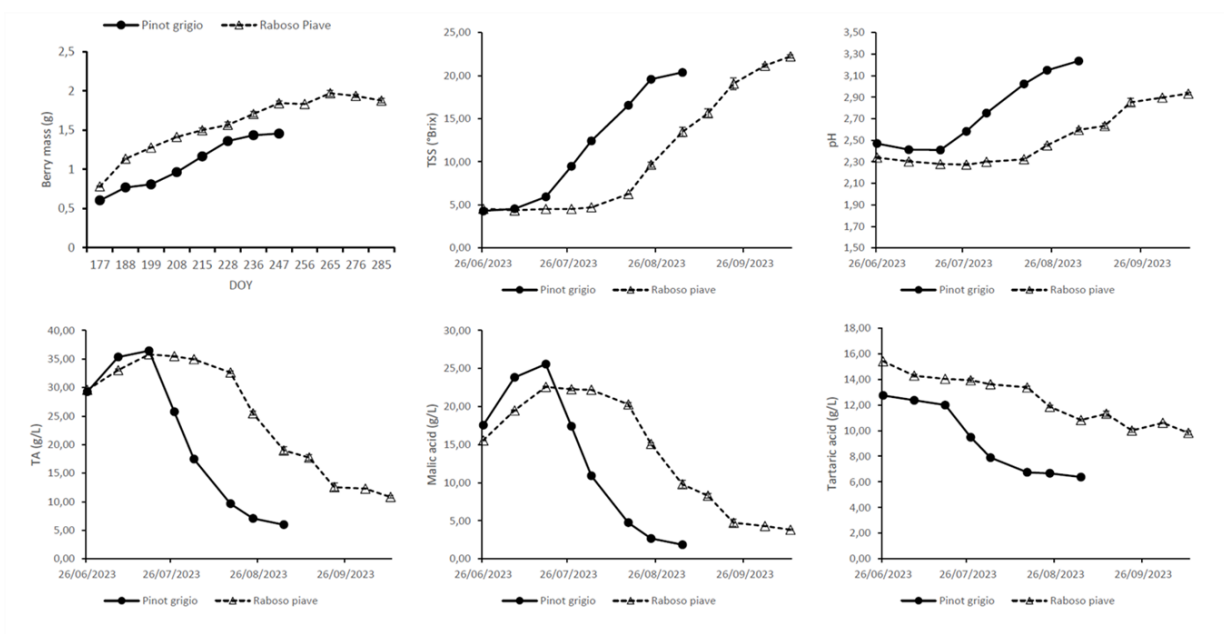


Figura 6. Il confronto tra Pinot Grigio e Raboso Piave è mostrato in grafici che evidenziano le differenze nei parametri chimici durante il processo di maturazione. Le variazioni sono riportate per la massa delle bacche, il grado °Brix (contenuto zuccherino), il pH, l'acidità titolabile, il contenuto di acido malico e di acido tartarico, misurati in diversi giorni dell'anno (DOY). Le linee indicano l'andamento dei parametri per ciascuna varietà: Pinot Grigio (cerchi) e Raboso Piave (triangoli), evidenziando differenze significative nella maturazione, come una maggiore precocità nel Pinot Grigio rispetto al Raboso Piave.

Il peso delle bacche è aumentato gradualmente in entrambe le varietà, ma il plateau è stato raggiunto più velocemente nel Pinot Grigio, indicando che questa varietà precoce ha completato il processo di accumulo della massa prima rispetto alla varietà tardiva (Figura 6).

Per quanto riguarda il grado zuccherino (°Brix), si è osservato uno sfasamento temporale di circa 40 giorni tra le due varietà: in Pinot Grigio, la concentrazione zuccherina (TSS) è aumentata più rapidamente, segnalando una maturazione precoce rispetto al Raboso Piave, che ha accumulato gli zuccheri più lentamente. Questo porta a profili asincroni nell'accumulo di zuccheri: mentre le bacche di Pinot Grigio avviano precocemente i meccanismi di accumulo, quelle di Raboso Piave, pur crescendo in dimensioni, hanno ritardato significativamente l'incremento della concentrazione zuccherina.

Il pH è aumentato nel tempo in entrambe le varietà, ma valori più alti sono stati raggiunti anticipatamente nel Pinot Grigio, indicando un'evoluzione chimica più rapida verso la maturità. Nel Raboso Piave, l'incremento è stato più lento e progressivo. L'acidità totale è diminuita gradualmente durante la maturazione. Nel Pinot Grigio, la diminuzione è stata rapida e si è stabilizzata precocemente, mentre nel Raboso Piave il calo è stato più graduale, mantenendo valori elevati per un periodo più lungo.

Per quanto riguarda gli acidi organici, l'acido malico ha raggiunto livelli più elevati in Raboso Piave durante gran parte del periodo di maturazione, mentre in Pinot Grigio la sua riduzione è stata più rapida. Anche l'acido tartarico ha subito una progressiva riduzione in entrambe le varietà, ma Raboso Piave ha mantenuto livelli leggermente più alti nel tempo.

Questi risultati hanno evidenziato le differenze tra Pinot Grigio e Raboso Piave, due varietà con tempi di maturazione contrastanti. Il Pinot Grigio, varietà precoce, ha raggiunto rapidamente valori indicativi di maturazione tecnologica completa, ma tale comportamento potrebbe rappresentare una criticità in relazione ai cambiamenti climatici, che tendono ad accentuare la precocità. Al contrario, il Raboso Piave, varietà tardiva, ha presentato un'evoluzione più lenta e dilatata nel tempo.

4.2 RNAseq: statistiche di sequenziamento

I risultati preliminari ottenuti dai parametri chimici del mosto hanno evidenziato che il Pinot Grigio, varietà precoce, raggiunge rapidamente la maturità, con un incremento più rapido del contenuto zuccherino e una diminuzione accelerata degli acidi organici. Al contrario, il Raboso Piave, varietà tardiva, ha mostrato un processo di maturazione più dilatato, mantenendo una maggiore stabilità nei parametri chimici per un periodo più lungo. Queste evidenze chimiche suggeriscono che i due genotipi adottano strategie molecolari e metaboliche differenti per affrontare il processo di maturazione. Per approfondire queste differenze, è stata intrapresa un'analisi trascrittomica su campioni

prelevati in momenti chiave della maturazione. Tale approccio consente di identificare i geni e le vie metaboliche coinvolti nei meccanismi regolatori specifici delle due varietà, offrendo una visione globale delle risposte trascrizionali legate alla precocità o tardività del ciclo fenologico.

Per studiare le dinamiche molecolari alla base della maturazione nei genotipi Pinot Grigio e Raboso Piave, sono state effettuate analisi RNA-seq su campioni prelevati in diversi momenti durante la di maturazione. In totale, sono stati raccolti 8 punti temporali per il Pinot Grigio e 12 punti temporali per il Raboso Piave, a partire dall'allegagione fino alla completa maturazione. Per ciascun punto temporale, sono stati analizzati due tessuti distinti: buccia (SK) e polpa (PU), con 3 repliche biologiche per ciascuna condizione, ognuna delle quali costituita da 50 bacche per un totale di 120 RNAseq. Le analisi RNA-seq sono state eseguite utilizzando piattaforme di sequenziamento di ultima generazione, garantendo un'elevata profondità di lettura per una quantificazione accurata dell'espressione genica. In seguito al sequenziamento sono stati prodotti un totale di 752,95 Gb di dati di sequenziamento, corrispondenti a XXX milioni di reads da 150 bp. Il Q-score rappresenta un parametro essenziale per valutare la qualità dei dati di sequenziamento. Dall'analisi è emerso che più del 92,37% delle basi di ogni campione ha registrato un valore pari o superiore a Q30, confermando l'elevata affidabilità del sequenziamento e un margine di errore di lettura estremamente ridotto.

Esaminando nel dettaglio i risultati dei singoli campioni, il campione RP208PU3 si distingue per un'ottima qualità in termini di numero di reads, con un totale di 28387970 reads. Al contrario, il campione con il rendimento più basso è PG177PU1 che ha generato un totale di 1394678 reads.

Per consultare in dettaglio le statistiche di sequenziamento, fare riferimento all'Appendice A.

4.3 Statistiche di mappatura

Il rapporto di mappatura è fondamentale per valutare l'idoneità del genoma di riferimento utilizzato. Questo valore indica la percentuale di reads mappate rispetto al totale delle reads filtrate e può essere influenzato da diversi fattori, come la qualità dei dati di sequenziamento, l'accuratezza dell'assemblaggio del genoma di riferimento e il grado di affinità biologica tra il campione sequenziato e la sottospecie di riferimento. Nei risultati ottenuti, il rapporto di mappatura dei campioni rispetto al genoma di riferimento varia tra il 74,32% e il 96,40%. In particolare, il campione PG228SK2 ha registrato la percentuale

più alta di reads mappate (96,40%), mentre il campione PG177PU3 ha ottenuto la percentuale più bassa (74,32%).

Le reads sono state mappate su diverse regioni del genoma di riferimento, incluse esoni, introni e regioni intergeniche. Le reads associate agli esoni derivano da mRNA, quelle mappate agli introni potrebbero provenire da precursori di RNA, mentre le reads allineate alle regioni intergeniche potrebbero essere il risultato di errori nell'annotazione del genoma.

Per consultare in dettaglio le statistiche di mappatura, fare riferimento all'Appendice B.

4.3 Visualizzazione del clustering dei campioni

Per visualizzare la variabilità tra i campioni delle due varietà di vite, Pinot Grigio (PG) e Raboso Piave (RP), nei tessuti di buccia e polpa, è stata condotta un'analisi delle componenti principali (PCA). Questo approccio statistico aiuta a ridurre la complessità dei dati, concentrando le informazioni sulle principali fonti di variazione. Per l'analisi è stato utilizzato il pacchetto DESeq2 (Love et al., 2014) del software RStudio (v.2024.9.0.375). La trasformazione VST (Variance Stabilizing Transformation) è stata utilizzata per stabilizzare la varianza nei dati di conteggio dell'RNA-seq. I dati di conteggio grezzi, infatti, presentano spesso una varianza dipendente dalla media, che può compromettere l'analisi statistica. Applicando la VST, i dati vengono trasformati in modo che la varianza sia più costante tra diversi livelli di espressione genica. Questo processo non solo migliora la visualizzazione dei dati, ma ottimizza anche il clustering dei campioni e l'analisi delle componenti principali (PCA).

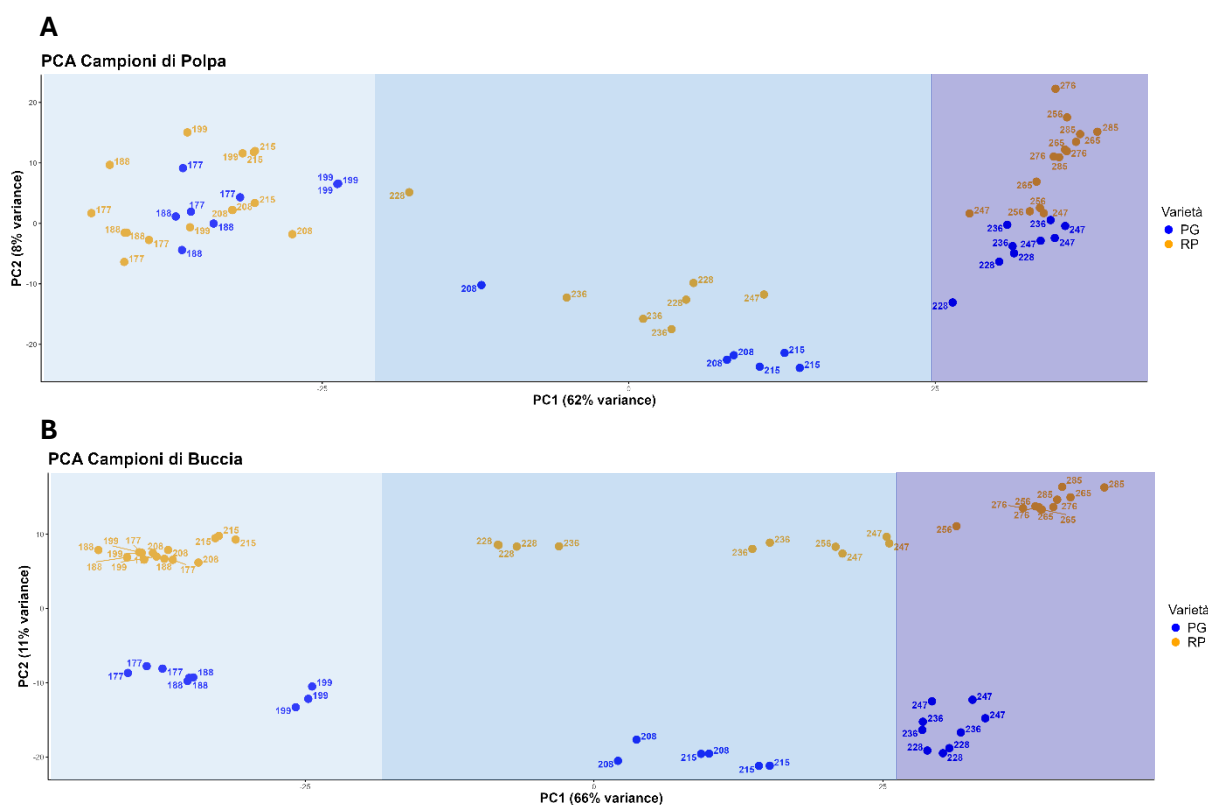


Figura 7. Grafico PCA dei campioni di buccia (A) e polpa (B). I punti rappresentano i campioni, mentre i colori distinguono le varietà. Il grafico è stato suddiviso in tre sezioni, ciascuna rappresentante una fase dello sviluppo delle bacche: pre-invaiaura (sinistra, blu chiaro), invaiaura (centrale, blu) e maturazione (destra, blu scuro), evidenziando le differenze nelle classi trascrizionali tra le fasi

L'analisi esplorativa ha permesso di raggruppare i campioni con pattern trascrizionale simile in tre classi principali, corrispondenti alle tre diverse fasi del processo di maturazione: (i) pre-invaiaura, (ii) invaiaura e (iii) post-invaiaura. Per quanto riguarda i campioni di buccia, la prima componente (PC1) ha spiegato il 66% della varianza, mentre la seconda (PC2) un ulteriore 11% (Figura 7A). Per i dati relativi alla polpa, le prime due componenti hanno spiegato il 70% della varianza complessiva, con il 62% imputabile alla PC1 e il restante 8% alla PC2 (Figura 7B). Nello specifico, nella PCA effettuata per PG, sia per la buccia che per la polpa, tra i campioni appartenenti alla classe di pre-invaiaura rientrano quelli campionati nei primi tre timepoint (DOY 177, 188, 199). Per quanto riguarda RP, invece, la classe pre-invaiaura include i campioni prelevati nei primi cinque timepoint (DOY 177, 188, 199, 208, 215). Questo a ulteriore conferma che la varietà PG entra nella fase di invaiaura più precocemente rispetto a RP. Inoltre, i grafici hanno evidenziato una separazione più netta tra i campioni della cultivar di PG rispetto a quelli della cultivar RP, dove si notano alcune sovrapposizioni tra campioni appartenenti a diverse fasi. Nel caso di RP, una replica biologica del campione RP-256-SK si colloca nella fase di invaiaura anziché in quella di maturazione, mentre l'altra si trova in una posizione intermedia tra le

due fasi (Figura 7A). Nella polpa invece, il campione RP-247-PU si colloca principalmente nella classe di maturazione, con l'eccezione di una replica biologica che rimane molto vicina alla fase di invaiatura (Figura 7B). Nel caso di PG, invece, una delle repliche biologiche del campione PG-208-PU appare più vicina alla fase di pre-invaiatura rispetto a quella di invaiatura (Figura 7B). La clusterizzazione non uniforme di alcune repliche biologiche dello stesso campione potrebbe essere dovuta alla variabilità intra-campione. Ogni replica biologica è costituita da un pool di 50 bacche, alcune delle quali potrebbero essere più vicine a una fase del processo di maturazione rispetto ad altre, a causa della maturazione scalare del grappolo. Questa eterogeneità può influenzare i risultati della PCA, generando differenze nella collocazione delle repliche biologiche dello stesso campione. In tutti i grafici si nota che i campioni appartenenti alla fase di maturazione si dispongono maggiormente lungo la PC2, che spiega una percentuale di varianza inferiore rispetto alla PC1. Questo potrebbe indicare che le principali variazioni a livello trascrittomico si concentrano nelle fasi di pre-invaiatura e invaiatura, durante le quali la PC1 cattura gran parte della variabilità nei dati. Inoltre, tali variazioni appaiono più evidenti nella polpa di entrambe le varietà rispetto alla buccia.

4.4 Analisi dei Geni Differenzialmente Espressi (DEGs)

L'espressione genica può essere influenzata da diversi fattori, come cambiamenti ambientali, trattamenti sperimentali o alterazioni fisiologiche, risultando altamente dipendente dal periodo di sviluppo e dal tipo tessuto. I geni che mostrano variazioni significative nei livelli di espressione in condizioni sperimentali differenti, in diverse fasi di sviluppo o in diversi tipi di tessuti sono definiti come Geni Differenzialmente Espressi (DEG). Per aumentare la sensibilità nell'identificazione dei geni differenzialmente espressi, si è scelto di analizzare separatamente i campioni di polpa e buccia, conducendo analisi parallele. Questa decisione, adottata per l'analisi differenziale eseguita con DESeq2, si basa su considerazioni biologiche e funzionali legate alla fisiologia del frutto della vite. Polpa e buccia, infatti, rappresentano tessuti distinti sia dal punto di vista anatomico che metabolico e svolgono ruoli differenti durante lo sviluppo e il processo di maturazione del frutto. Tali differenze riflettono una regolazione distinta dell'espressione genica nei due tessuti, giustificando un approccio separato per individuare geni differenzialmente espressi, potenzialmente specifici per ogni tessuto.

Le tabelle contenenti le conte grezze per i campioni di polpa e buccia sono state importate in RStudio, dove è stato applicato un filtraggio facendo riferimento al paragrafo “**Pre-filtering**”, del manuale in [Analyzing RNA-seq data with DESeq2](#). In particolare, sono stati

esclusi tutti i geni con meno di 10 conte totali in almeno tre campioni. Al termine di questo passaggio, sono stati ottenuti 22758 geni espressi nel dataset di buccia e 28977 in quello di polpa. Alla luce dei risultati delle PCA si è deciso di focalizzare l'attenzione sui confronti tra le classi trascrizionali “pre-invaiaitura” e “invaiaitura”, in quanto rappresentano due momenti cruciali nel processo di maturazione. Per evidenziare le differenze nei profili di espressione genica tra queste due classi, è stata condotta un'analisi dei DEGs, confrontando i campioni di Pinot Grigio con quelli di Raboso Piave. In ogni confronto i campioni di Pinot Grigio sono stati utilizzati come riferimento. Di conseguenza, come mostrato in Figura 8, i geni con log2FC positivo risultano sovraespressi in Raboso Piave, mentre i geni con log2FC negativo risultano sovraespressi in Pinot Grigio.

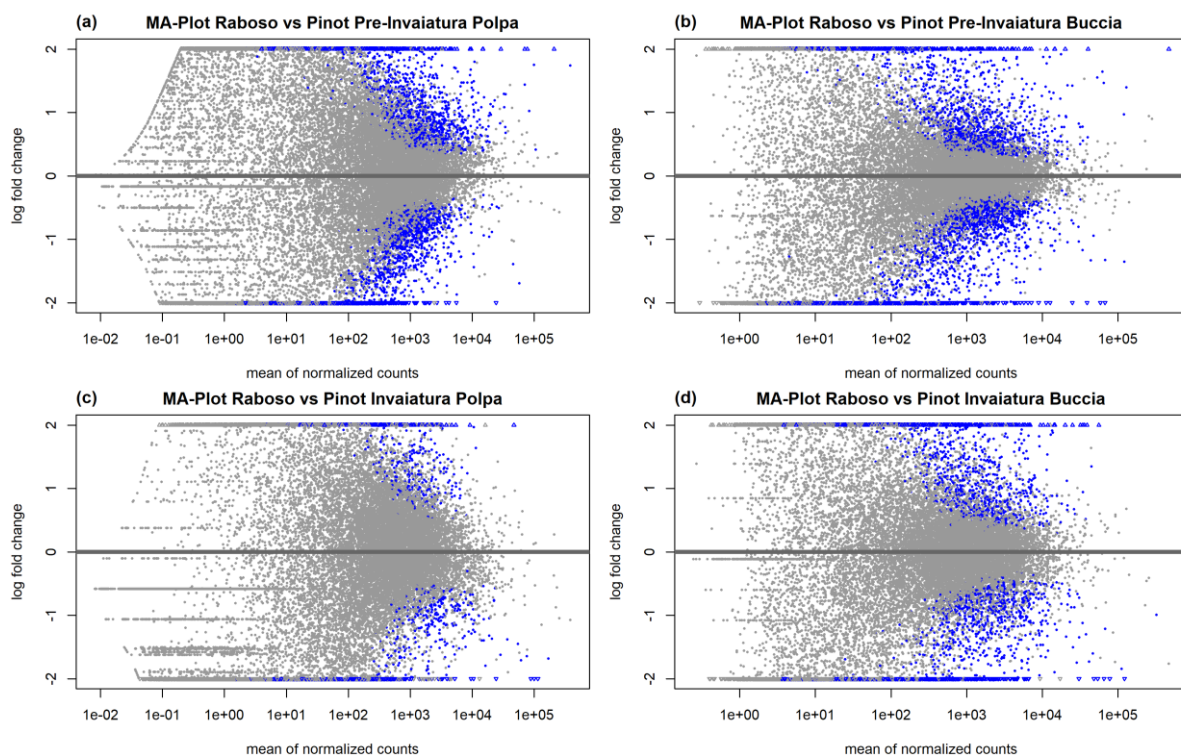


Figura 8. MA-plot per le analisi di espressione differenziale nelle fasi di pre-invaiaitura e invaiaitura e nei due tessuti: Pre-invaiaitura Polpa (a), Pre-invaiaitura Buccia (b), Invaiaitura Polpa (c), Invaiaitura Buccia (d). I punti in blu rappresentano i geni con p-value aggiustato con valore inferiore a 0.05, mentre i triangoli rappresentano i geni che cadono al di fuori della finestra di log2FC.

Nell'analisi differenziale, è stata applicata una soglia stringente per identificare i geni rilevanti: un $|\log_2\text{FoldChange}|$ superiore a 2 in valore assoluto e un p-value aggiustato (FDR) inferiore a 0.05. Questa scelta ha permesso di includere esclusivamente i geni con differenze di espressione biologicamente significative e statisticamente robuste, garantendo una maggiore affidabilità nell'identificazione dei DEGs. I risultati ottenuti sono sintetizzati nella tabella riportata di seguito (Tabella 4). In particolare, per la polpa della varietà RP nella fase di pre-invaiaitura sono stati identificati 1206 geni sovraespressi, mentre

nella fase di invaiatura il numero scende a 372. Per la polpa della varietà PG, invece, sono stati identificati 732 geni sovraregolati nella fase di pre-invaiatura e 977 in quella di invaiatura. Nella buccia della varietà RP ne sono stati identificati 664 nella fase di pre-invaiatura e 733 in quella di invaiatura. Infine, per la varietà PG sono stati individuati 1220 geni sovraregolati nella la fase di pre-invaiatura e 850 in quella di invaiatura.

Tabella 4. Geni differenzialmente espressi sovra regolati in RP o PG con p-value aggiustato (FDR)< 0.05 e $|\log_2FC| > 2$

Tessuto	Stadio di Sviluppo	Raboso Piave	Pinot Grigio
Polpa	Pre-Invaiatura	LFC >2: 1206	LFC >2: 732
	Invaiatura	LFC >2: 372	LFC >2: 977
Buccia	Pre-Invaiatura	LFC >2: 664	LFC >2: 1220
	Invaiatura	LFC >2: 733	LFC >2: 850

4.5 Analisi di Arricchimento Funzionale dei DEGs

Dopo aver estratto i DEGs ottenuti dai confronti tra le varie classi, è stata condotta un'analisi di arricchimento funzionale per comprendere meglio i processi biologici e le funzioni molecolari associati a queste differenze di espressione. L'analisi è stata effettuata tramite il pacchetto R gprofiler2 (Kolberg et al., 2020), con il parametro **"organism:vvinifera"** per selezionare il database relativo a *Vitis vinifera*. L'arricchimento funzionale è stato eseguito mediante un approccio statistico che valuta la sovra-rappresentazione di determinate categorie funzionali tra i geni identificati, rispetto a quanto ci si aspetterebbe per caso. Al fine di ridurre i falsi positivi, sono stati considerati come significativamente arricchiti i termini con un p-value inferiore a 0.05. Quest'analisi ha permesso di associare i DEGs a specifiche categorie funzionali, come processi biologici (BP), funzioni molecolari (MF) e componenti cellulari (CC).

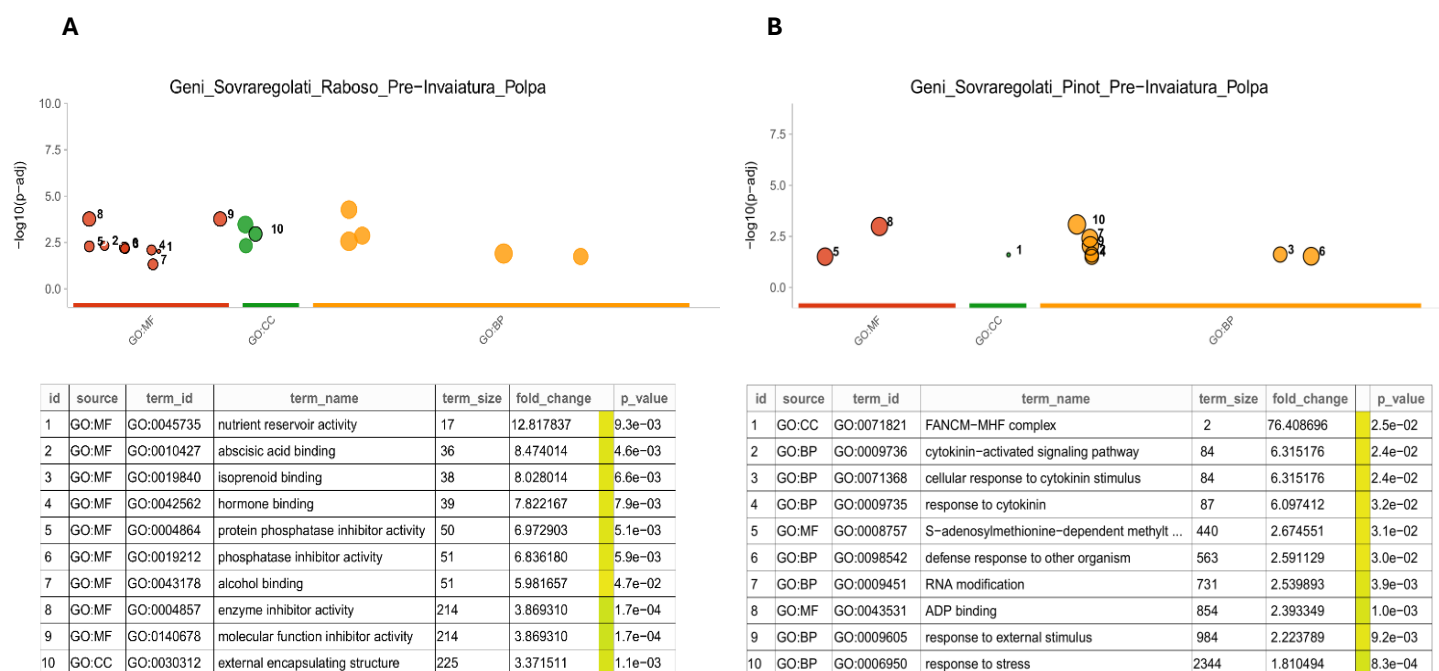


Figura 9. Arricchimento funzionale dei geni sovraregolati in polpa nella varietà RP (A) e PG (B) nella fase di pre-invaiaitura.

Nella polpa di entrambe le varietà, tra le diverse categorie arricchite, quelle di maggiore interesse sono quelle legate all'attività ormonale. In particolare, in Raboso Piave, è emerso un arricchimento delle categorie associate all'acido abscissico: “abscisic binding” (GO:0010427), “isoprenoid binding” (GO:0019840) e “hormone binding” (GO:0042562), noto per stimolare il processo di maturazione (Figura 9A). In Pinot Grigio (Figura 9B), invece, sono emerse categorie associate alla via di segnalazione delle citochinine: “cytokinin-activated signaling pathway” (GO:0009736), “cellular response to cytokinin stimulus (GO:0071368)” e “response to cytokinin” (GO:0009735). È interessante notare che, secondo quanto riportato da Ma e Yang (2018), la concentrazione di citochinine aumenta dopo l'allegagione per poi diminuire con l'invaiaitura.

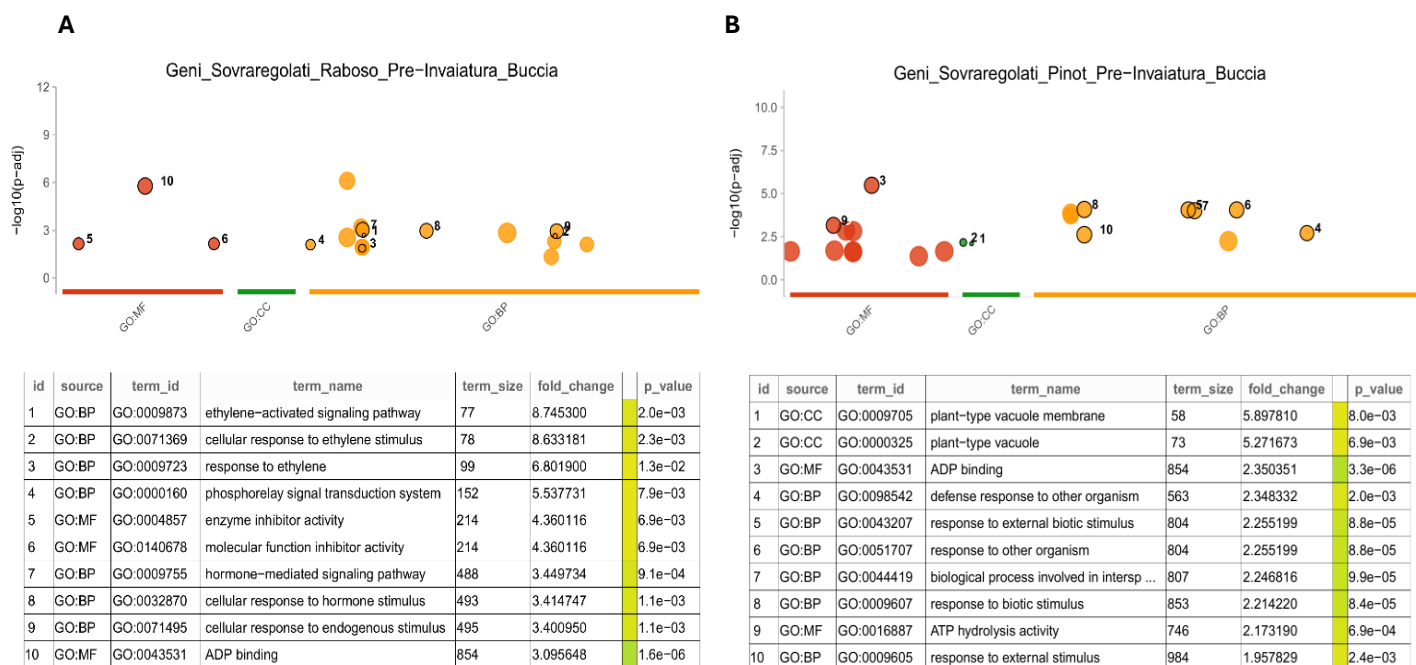


Figura 10. Arricchimento funzionale dei geni sovraregolati nella buccia nelle varietà Raboso Piave (A) e Pinot Grigio (B) nella fase di pre-invaiaitura.

Per quanto riguarda la buccia della varietà RP nella fase di pre-invaiaitura, sono emerse prevalentemente categorie di geni legati alla pathway dell'etilene: “ethylene-activated signaling pathway” (GO:0009873), “cellular response to ethylene stimulus” (GO:0071369), “response to ethylene” (GO:0009723), “hormone-mediated signaling pathway” (GO:0009755) e “cellular response to hormone stimulus” (GO:0032870) (Figura 10A). Mentre, nell'arricchimento funzionale della buccia della varietà PG, le categorie di geni sovraregolati sono principalmente coinvolte nella risposta allo stress biotico: “defense response to other organism” (GO:0098542), “response to external biotic stimulus” (GO:0043207), “response to other organism” (GO:0071707), “response to biotic stimulus” (GO:0009607), “response to external stimulus” (GO:0009605) (Figura 10B).

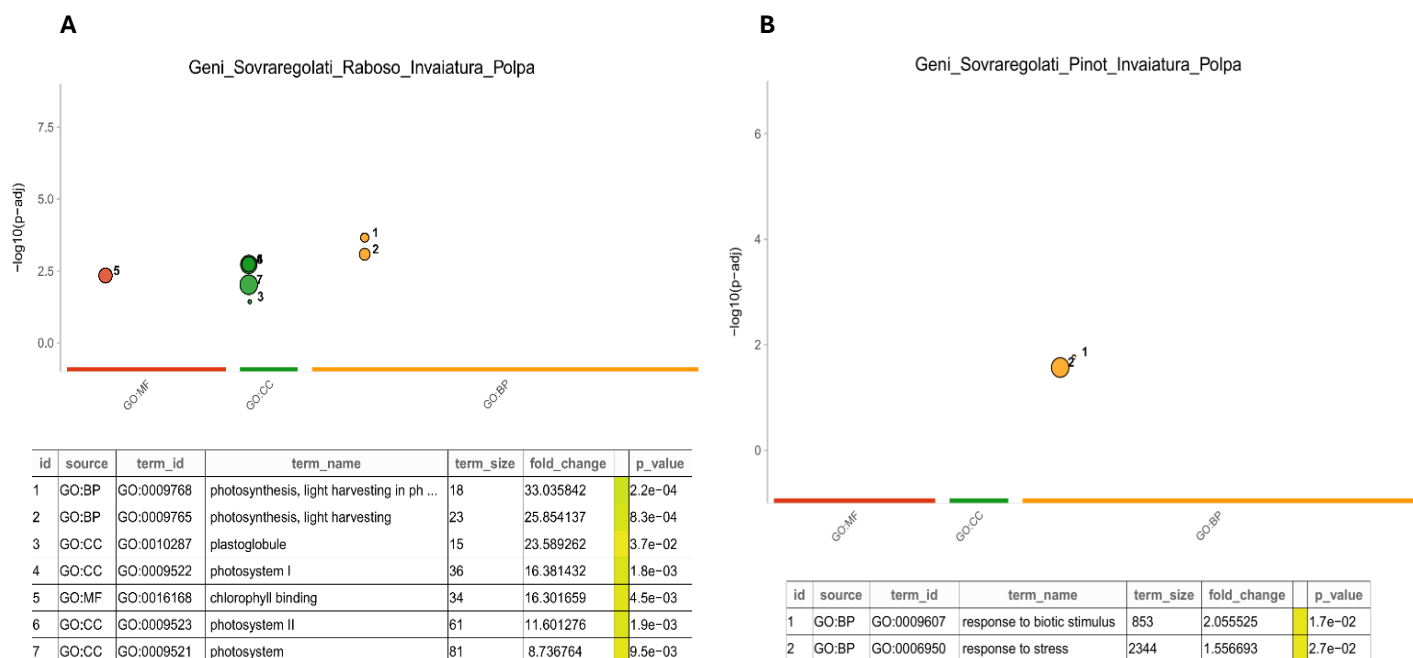


Figura 11. Arricchimento funzionale dei geni sovraregolati nella polpa nelle varietà RP (A) e PG (B) nella fase di invaiatura.

Durante la fase di invaiatura, nella polpa della varietà RP, è stata osservata una sovraregolazione di geni coinvolti nel processo di fotosintesi: “phosynthesis, light harvesting” (GO:0009765), “photosystem I” (GO:0009522), “chlorophyll binding (GO:0016168), “phosystem II” (GO:0009523), “photosystem” (GO:0009621) (Figura 11A). Al contrario, nella varietà PG le categorie rappresentate sono risultate meno numerose con una persistente sovraespressione dei geni associati alla risposta a stress biotici: “response to biotic stimulus” (GO:0009607), “response to stress” (GO:0006950) (Figura 11B).

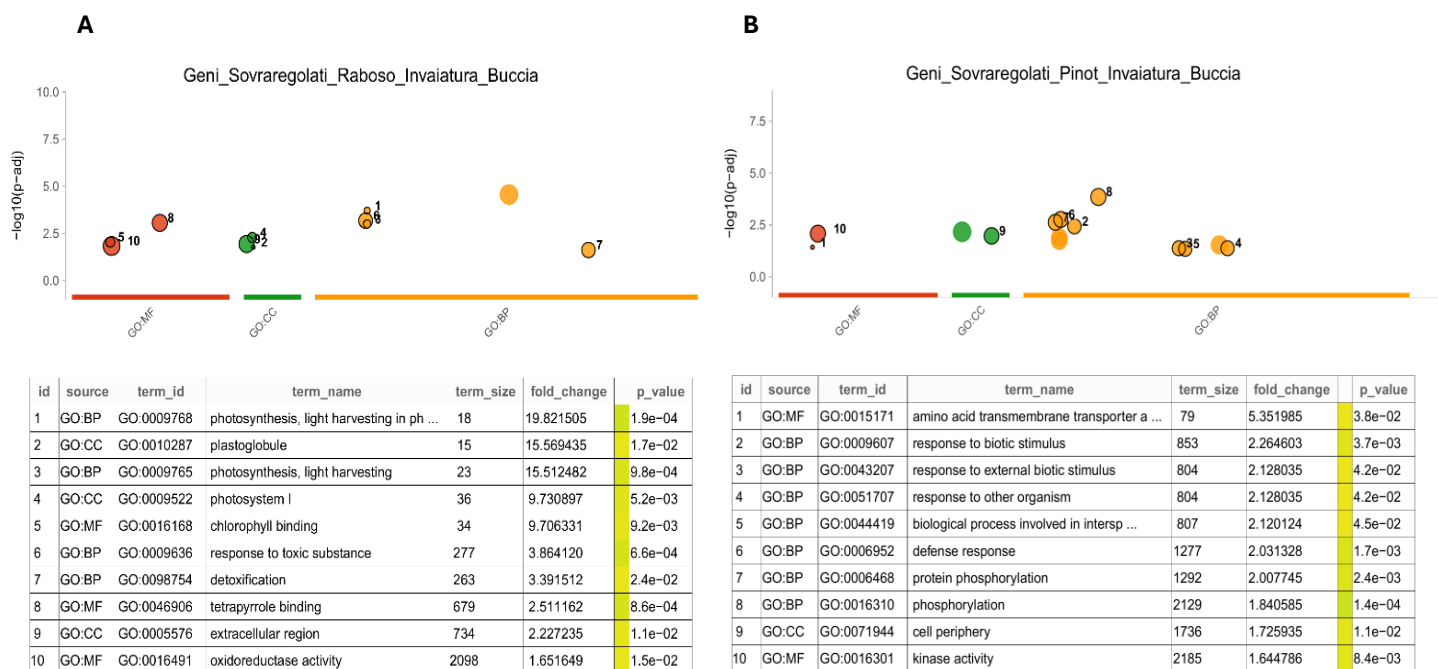


Figura 12. Arricchimento funzionale dei geni sovraregolati nella buccia della varietà RP (A) e PG (B) nella fase di invaiatura

Nella buccia della varietà RP, durante la fase di invaiatura continuavano ad essere sovraesprese le categorie correlate al processo di fotosintesi: “photosynthesis, light harvesting” (GO:0009765), “photosystem I” (GO:0009522), “chlorophyll binding” (GO:0016168), “photosystem II” (GO:0009523), “photosystem” (GO:0009621) (Figura 12A). Mentre, nella buccia di PG, oltre alle categorie di geni implicate nella risposta allo stress biotico: “response to biotic stimulus” (GO:0009607), “response to external stimulus” (GO:0009605), “response to other organism” (GO:0071707), è stata osservata anche una sovraregolazione di geni implicati nell’attività chinasi: “protein phosphorylation” (GO:0006488), “phosphorylation” (GO:0016310) e “kinase activity” (GO:0016301), e nel trasporto transmembrana di amminoacidi: “amino acid transmembrane transporter” (GO:0015171) (Figura 12B).

Alla luce di questi risultati, si può dedurre che durante la fase di pre-invaiatura, in entrambe le varietà e in entrambi i tessuti, le categorie di geni sovraregolati sono risultate più diversificate. Al contrario, nella fase di invaiatura è stata osservata una prevalenza di categorie legate ai processi di fotosintesi e alla risposta agli stress biotici.

4.6 Espressione genica geni candidati

Per identificare potenziali geni candidati coinvolti nel processo di maturazione delle due varietà di vite, è stata effettuata un'analisi incrociata tra i geni associati al processo di maturazione individuati in letteratura (Tabella 3), e i DEGs ottenuti dai confronti tra le classi

trascrizionali “pre-invaiatura” e “invaiatura” di Raboso Piave e Pinot Grigio. Questo approccio ha permesso di determinare quali dei 762 geni descritti in letteratura per il loro ruolo nella maturazione risultassero effettivamente differenzialmente espressi tra le due varietà, Raboso Piave e Pinot Grigio, nelle fasi di pre-invaiatura e invaiatura. Come mostrato in Figura 13, da quest’analisi incrociata sono emersi 160 DEGs, molti dei quali appartenenti alle categorie ontologiche arricchite nell’analisi funzionale di cui al capitolo 4.5.

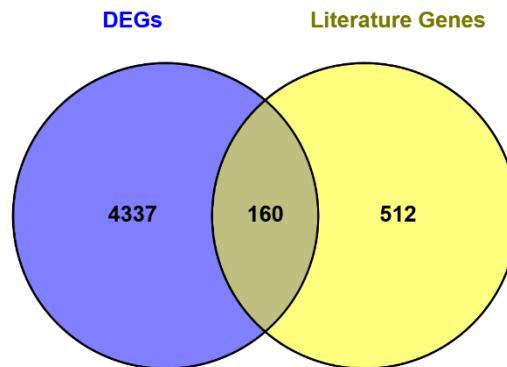


Figura 13. Diagramma di Venn che mostra il numero di geni in comune tra i DEGs ottenuti dalla analisi di RNA-seq e i geni individuati in letteratura.

Allo scopo di esaminare nel dettaglio la cinetica di espressione di alcuni dei geni comuni alla metanalisi sulla letteratura e i DEGs ottenuti dal nostro studio, sono stati prodotti dei box plot che riportano l’andamento delle repliche in tutti i time points considerati nelle due varietà. Tra i 160 DEGs identificati, alcuni hanno mostrato un pattern di espressione particolarmente interessante, mostrando differenze significative sia tra le varietà che tra le diverse fasi di maturazione, evidenziando un potenziale ruolo nel processo stesso e nelle differenze osservate nei due genotipi.

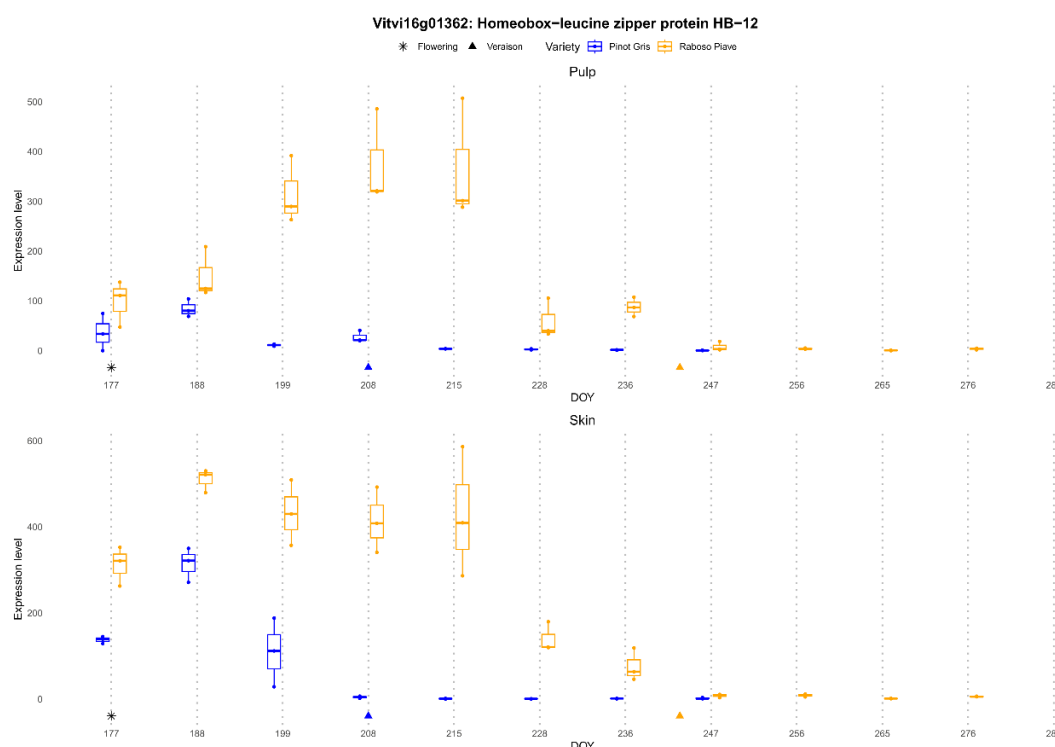


Figura 14. Andamento dell'espressione del gene *Vitvi16g01362* in entrambe le varietà e in entrambi i tessuti per tutto il periodo di campionamento.

Tra i geni di maggiore interesse individuati nel presente studio, il gene *Vitvi16g01362*, codificante per la proteina HB-12, ha mostrato un andamento peculiare nei suoi livelli di espressione. Questo gene è caratterizzato da un incremento significativo dell'espressione durante la fase di pre-invaiaitura, seguito da un drastico calo in prossimità dell'inizio della fase di invaiaitura, con livelli molto bassi nelle fasi successive di sviluppo (Figura 14). Tale andamento è particolarmente evidente nella varietà Raboso Piave, nota per la sua maturazione tardiva. Questi risultati sono coerenti con quanto osservato nello studio di Theine et al. (2021), in cui il gene HB-12 risulta significativamente più espresso nella varietà tardiva Pinot Nero rispetto alla sua variante precoce. Dal punto di vista funzionale, membri della stessa famiglia genica di HB-12 sono stati associati alla capacità di legare e attivare il promotore del gene codificante per l'1-amino-ciclopropano-1-carbossilato ossidasi (ACO), un enzima chiave nella biosintesi dell'etilene (Lin et al., 2008). Questa evidenza, unita all'elevata espressione di HB-12 in Raboso Piave, suggerisce un possibile coinvolgimento dell'etilene nel ritardare la maturazione. Tale ipotesi è supportata dalle osservazioni di Böttcher et al. (2013), secondo cui l'etilene, pur non giocando un ruolo climaterico nella vite, modula comunque lo sviluppo e la maturazione delle bacche. In particolare, nelle fasi iniziali di sviluppo, l'applicazione di CEPA (un rilasciante di etilene) ritarda la maturazione,

mentre l'inibizione della biosintesi dell'etilene tramite AVG (aminoetossivinilglicina) o l'applicazione di acido abscissico anticipano il processo.

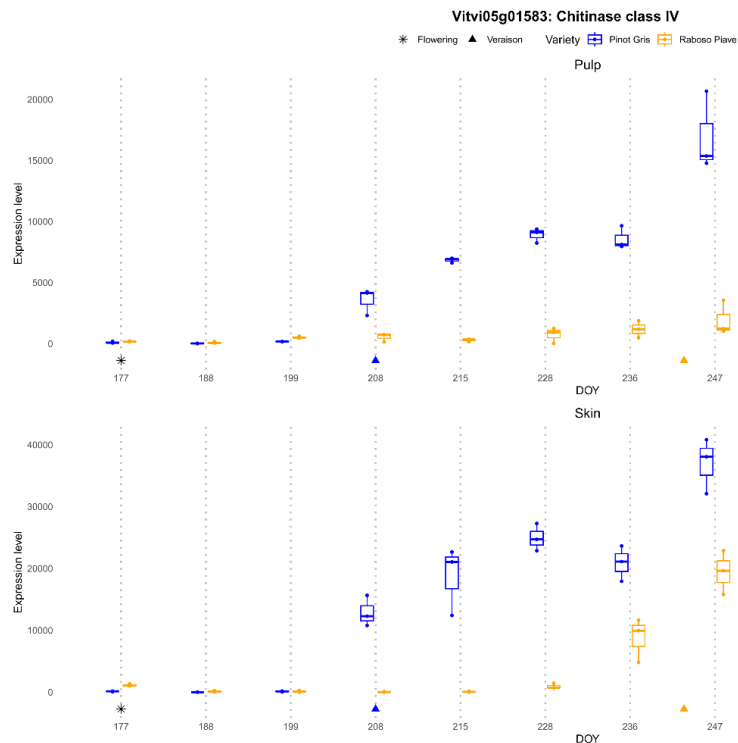


Figura 15. Andamento dell'espressione del gene *Vitvi05g01583* in entrambe le varietà e in entrambi i tessuti per tutto il periodo di campionamento.

A differenza di quanto osservato per HB-12, il gene *Vitvi05g01583*, codificante per la chitinasi di classe IV, ha mostrato livelli di espressione molto bassi nella fase di pre-invaiaitura, seguiti da un incremento repentino a partire dall'invaiaitura (Figura 15). Questo andamento è simile nelle due varietà ma è particolarmente evidente nella varietà Pinot Grigio, in linea con i risultati riportati da Ma e Yang (2016), che hanno osservato una sovra-regolazione di questo gene nel mutante '8612' a maturazione precoce. Questo comportamento suggerisce un ruolo protettivo della chitinasi di tipo IV, la cui attività aumenta drasticamente nelle bacche durante la maturazione, presumibilmente per contrastare potenziali attacchi patogeni (Vincenzi et al., 2014).

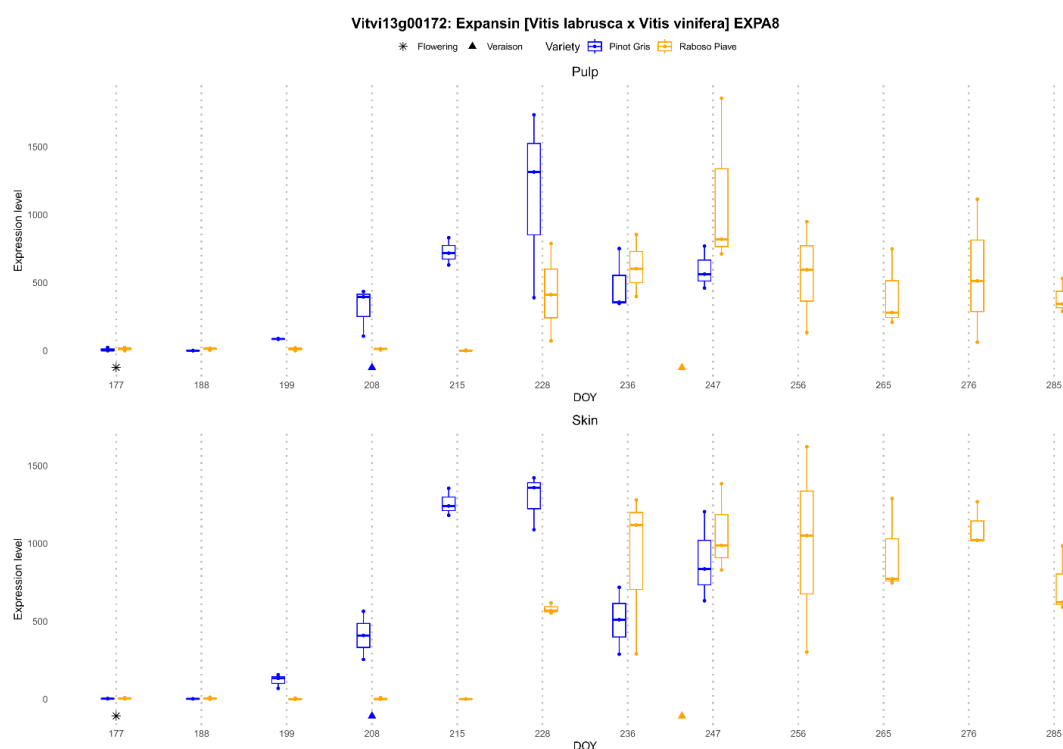


Figura 16. Andamento dell'espressione del gene *Vitvi13g00172* in entrambe le varietà e in entrambi i tessuti per tutto il periodo di campionamento.

Il grafico riportato in Figura 16 mostra l'andamento di espressione del gene *Vitvi13g00172*, codificante per l'espansina (EXP A8). In entrambi i tessuti delle due varietà è stato osservato che i livelli di espressione sono molto bassi nella fase di pre-invaiaatura, per poi aumentare in prossimità dell'inizio dell'invaiaatura. I risultati sono in parte in linea con quanto riportato da Theine et al. (2021), dove è stato osservato un aumento nei livelli di espressione del gene prima dell'invaiaatura, sia nella varietà a maturazione precoce che in quella tardiva. In particolare, per la varietà Raboso Piave caratterizzata da una maturazione tardiva, i dati confermano questa tendenza. Tuttavia, per la varietà Pinot Grigio, i risultati sono meno evidenti, con il gene che risulta espresso a livelli considerevoli solo dopo l'invaiaatura, mostrando una discrepanza rispetto allo studio di Theine et al. (2021). Le expansine sono note per il loro ruolo nell'espansione e nell'ammorbidimento delle bacche, processi che risultano strettamente legati all'invaiaatura. Inoltre, è stato osservato come trattamenti con etilene favoriscano l'incremento dei trascritti coinvolti in tali processi, tra cui le expansine (Chervin et al., 2008).

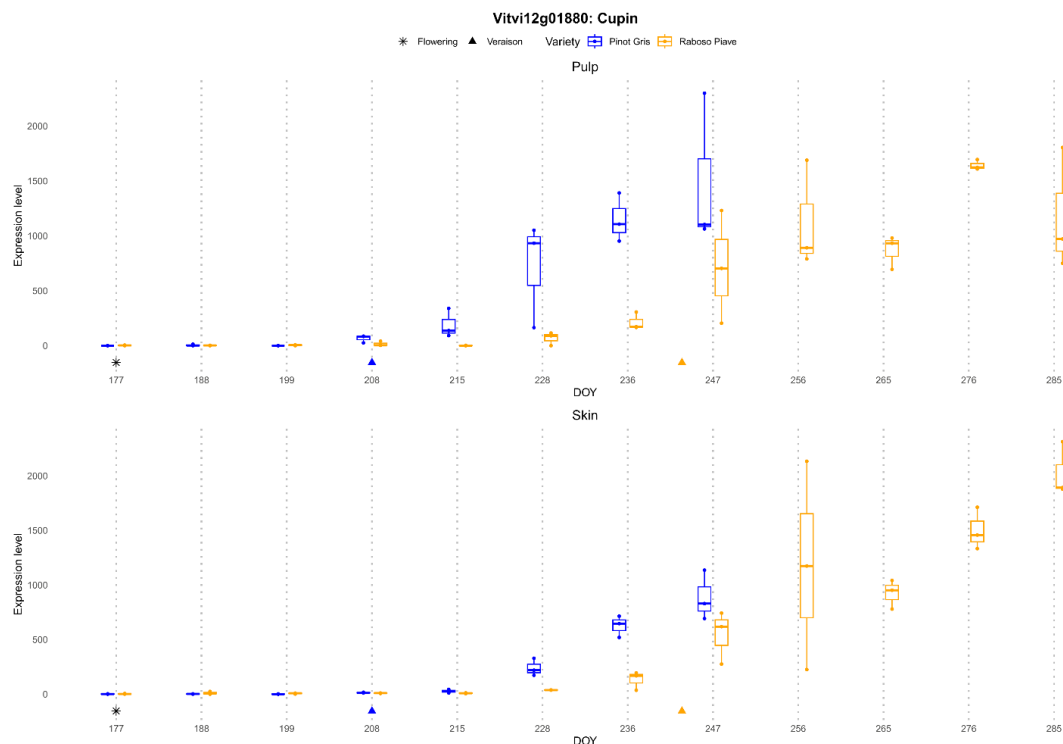


Figura 17. Andamento dell'espressione del gene *Vitvi12g01880* in entrambe le varietà e in entrambi i tessuti per tutto il periodo di campionamento.

Come mostra il grafico riportato in Figura 17, il gene *Vitvi12g01880* presenta bassissimi livelli di espressione durante la fase di pre-invaiatura di Pinot Grigio con un costante aumento dopo l'inizio della fase di invaiatura. Un andamento simile si osserva anche nella varietà tardiva Raboso Piave, sebbene i livelli di espressione si mantengano più bassi rispetto a Pinot Grigio. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Fasoli et al. (2018), che evidenzia come alcuni membri della famiglia genica delle cupine siano target del TF bHLH075, riconosciuto come uno dei principali regolatori della transizione dalla fase di pre-invaiatura a quella di invaiatura. Inoltre, come le espansine, le cupine sono coinvolte nei processi di allungamento cellulare, un fenomeno che può essere favorito da trattamenti con etilene (Chervin et al., 2008).

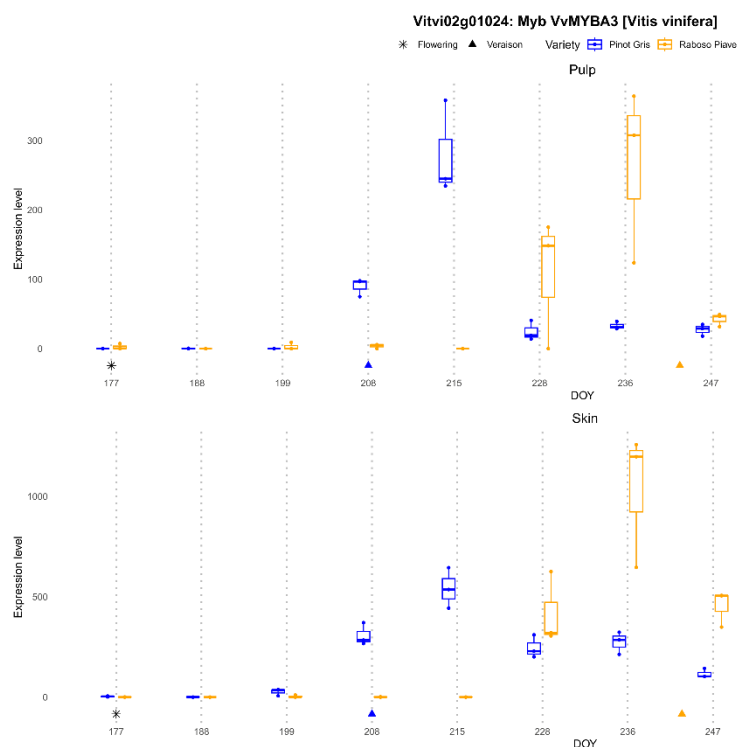


Figura 18. Andamento dell'espressione del gene *Vitvi02g01024* in entrambe le varietà e in entrambi i tessuti per tutto il periodo di campionamento.

Il grafico riportato in Figura 18 mostra l'andamento del gene *Vitvi02g01024* codificante per il TF MYBA3. In Pinot Grigio è stato osservato come i livelli di espressione siano molto bassi nella fase di pre-invaiaura e aumentino invece con l'inizio dell'invaiaura. Nella polpa raggiunge livelli molto alti subito dopo l'invaiaura per poi calare repentinamente e mantenendosi a bassi livelli durante la maturazione. Invece, nella buccia i livelli sono superiori e dopo l'invaiaura calano gradualmente. In Raboso Piave si può osservare lo stesso andamento in entrambi i tessuti con livelli di espressione più alti rispetto a Pinot Grigio. Il gene codificante per il TF MYB3A è collocato nel meta-QTL identificato da Delfino et al. (2019). MYBA3 è coinvolto nella via biosintetica dei fenilpropanoidi (Matus et al., 2017).

5. Discussione

La maturazione delle bacche è un processo complesso, caratterizzato da significativi cambiamenti chimici, fisici e sensoriali che svolgono un ruolo cruciale nella determinazione della qualità dei prodotti finali. Questo processo è fortemente influenzato sia dalle condizioni climatiche, che possono determinare anticipi o ritardi nella maturazione, che dal tipo di cultivar. Alla base di tali cambiamenti vi è una profonda riprogrammazione trascrittomica, operata da numerosi TF che agiscono in sinergia sotto il controllo di specifici segnali ormonali. Alla luce di ciò, in questa tesi è stata condotta un'analisi trascrittomica di due varietà di vite contraddistinte da diverse cinetiche di maturazione. Nella fattispecie, Pinot Grigio è caratterizzato da uno sviluppo rapido che conduce a una maturazione precoce, mentre Raboso Piave evidenzia uno sviluppo più lento che porta ad una maturazione tardiva. L'analisi trascrittomica è stata eseguita su bacche campionate in diversi stadi del loro sviluppo al fine di identificare i possibili geni chiave coinvolti nel processo di maturazione. Come primo passo, sono state effettuate delle analisi FOSS per la valutazione dei principali parametri chimico-fisici delle due varietà, fornendo una caratterizzazione preliminare dettagliata delle bacche. L'analisi FOSS ha rivelato che in Pinot Grigio, tra il primo e il secondo timepoint, vi è un aumento della massa della bacca accompagnato da un leggero incremento della concentrazione degli zuccheri. A partire dal terzo timepoint, i livelli di zuccheri iniziano a crescere rapidamente, suggerendo che l'invasatura abbia inizio intorno al giorno 199. La maturazione di Raboso Piave, invece, segue una cinetica diversa: nella prima fase, l'aumento delle dimensioni della bacca non è accompagnato da un incremento degli zuccheri, che restano costanti per un periodo più lungo rispetto a Pinot Grigio. Solo intorno al sesto timepoint (giorno 228) si registra un aumento significativo degli zuccheri, mostrando un inizio dell'invasatura più tardivo. Queste differenze evidenziano come l'invasatura si manifesti in momenti distinti per le due varietà, influenzando l'intero processo di maturazione.

Successivamente, i dati ottenuti dall'RNA-seq delle bacche sono stati sottoposti a diverse analisi bioinformatiche, tra cui l'analisi delle componenti principali (PCA), l'identificazione dei geni differenzialmente espressi (DEGs) e, infine, un'analisi di arricchimento funzionale per associare i DEGs a specifiche categorie biologiche. Dai risultati della PCA emerge che i geni analizzati si raggruppano in tre classi principali, in base al loro profilo trascrizionale. In linea con quanto riportato da Fasoli et al. (2018), la composizione delle classi risulta influenzata dallo stadio di sviluppo, distinguendo i campioni in tre classi principali: pre-invasatura, invasatura e post-invasatura. I risultati suggeriscono l'esistenza di una riprogrammazione trascrittomica specifica per ciascuna classe, particolarmente evidente

nelle fasi di pre-invaiaitura e invaiatura. Per quanto riguarda l'analisi di espressione differenziale, i confronti sono stati eseguiti tra i campioni appartenenti alle fasi di pre-invaiaitura e invaiatura di entrambe le varietà e di entrambi i tessuti studiati. Parallelamente, è stata effettuata una ricerca bibliografica che ha permesso di individuare numerosi geni coinvolti nel processo di maturazione, i quali sono stati incrociati con i DEGs ottenuti dall'analisi di espressione differenziale. Infine, per i geni ritenuti più interessanti sono stati generati dei boxplot per studiarne la cinetica di espressione lungo l'intero periodo di campionamento. Dall'analisi degli arricchimenti funzionali emerge che tra le classi dei geni sovrarappresentati nella fase di pre-invaiaitura ci sia maggiore diversità rispetto a quelli attivi durante la fase di invaiatura. Durante la pre-invaiaitura, si riscontrano categorie relative al segnalamento ormonale, con l'acido abscissico (ABA), l'etilene (ET) e le citochinine (CK) come principali ormoni coinvolti. Nella polpa si osservano distinzioni significative tra le varietà analizzate: le categorie di geni associate all'ABA risultano sovrarappresentati in Raboso Piave, mentre quelle associate alle citochinine prevalgono in Pinot Grigio. L'ABA è un ormone chiave per l'inizio della maturazione e per lo sviluppo del colore delle bacche. È noto che una riduzione iniziale dell'elasticità della pressione di turgore nelle bacche è seguita da un aumento di ABA e zuccheri (Pilati et al., 2017). Le citochinine, invece, sono ormoni vegetali noti per regolare diversi aspetti della crescita e dello sviluppo delle piante e i loro livelli endogeni sono stati associati al processo di crescita dei frutti (Matsuo et al., 2012). Nella stessa fase, nella buccia di Raboso Piave emergono categorie legate alla risposta e alla segnalazione dell'etilene, a differenza di Pinot Grigio, in cui non si osservano categorie correlate agli ormoni. Studi recenti hanno evidenziato che trattamenti con etilene non solo accelerano la degradazione della pectina, processo fortemente associato all'ammorbidimento delle bacche, ma sembrano stimolare anche la colorazione del frutto e l'accumulo di antocianine (Wang et al., 2022). Durante la fase di invaiatura, si osservano alcune differenze tra le due varietà. In Raboso Piave, essendo una varietà a maturazione tardiva, prevalgono categorie legate ai processi fotosintetici, fondamentali per la biosintesi di zuccheri e acidi organici (Massonnet et al., 2017). Ciò potrebbe indicare che le vie metaboliche associate alla fotosintesi rimangono attivate per un tempo più lungo rispetto a Pinot Grigio. Al contrario, in quest'ultimo si riscontra una maggiore espressione delle categorie associate alla risposta agli stress biotici, suggerendo che la maturazione dei frutti comporta un aumento della sensibilità ai patogeni e parassiti (Malacarne et al., 2024).

L'analisi incrociata tra i geni riportati in letteratura e i DEGs ottenuti dall'RNA-seq ha permesso di identificare numerosi geni coinvolti in processi chiave della maturazione. Tra i più rilevanti per il loro andamento vi sono: *Vitvi16g01362* che codifica per il TF homeobox-

leucina zipper HB-12, *Vitvi05g01583* che codifica per la proteina chitinasi di classe IV, *Vitvi05g01583* codificante per un'espansina, *Vitvi12g01880* che codifica per una cupina e *Vitvi02g1024* che codifica per il TF MYBA3. La proteina HB-12 mostra un'espressione elevata nella fase di pre-invaiaatura, seguita da un calo drastico all'inizio dell'invaiaatura, con livelli significativamente più alti in Raboso Piave rispetto a Pinot Grigio. HB-12 appartiene alla famiglia dei TF homeodomain-leucine zipper (HD-Zip), che svolge ruoli cruciali in vari processi biologici, tra cui la risposta adattativa allo stress abiotico e la regolazione della crescita fogliare. Gli altri geni, invece, presentano un aumento dell'espressione a partire dall'inizio dell'invaiaatura o immediatamente prima, con livelli più alti in Pinot Grigio, fatta eccezione per MYBA3 che risulta più espresso in Raboso Piave. Le cupine e le espansine, entrambe sotto controllo dell'etilene, svolgono un ruolo cruciale nei processi di espansione e ammorbidimento cellulare delle bacche (Chervin et al., 2008). La superfamiglia dei MYB è una delle più grandi famiglie di TF nelle piante, responsabili della regolazione del metabolismo dei flavonoidi durante lo sviluppo della bacca e della regolazione del metabolismo delle antocianine (Deluc et al., 2007).

Le cupine, le espansine e la proteina HB-12 sono strettamente legate al metabolismo dell'etilene, ma con ruoli distinti: le cupine e le espansine sono indotte dall'etilene, mentre HB-12 potrebbe regolarne la biosintesi legandosi al promotore del gene ACO1 (Lin et al., 2008). I nostri risultati mostrano che l'espressione di cupine ed espansine è più elevata durante l'invaiaatura, con livelli significativamente maggiori nel Pinot Grigio, una varietà a maturazione precoce. Al contrario, HB-12 presenta un'espressione più alta nella fase di pre-invaiaatura, con valori significativamente più alti in Raboso Piave, una varietà tardiva. Questo profilo di espressione suggerisce che HB-12 potrebbe influenzare la biosintesi dell'etilene nelle fasi iniziali, rallentando il processo e giustificando le diverse tempistiche di maturazione tra le due varietà. Questi risultati sono coerenti con quelli ottenuti dai trattamenti con CEPA, un induttore di etilene: se applicato in pre-invaiaatura, CEPA ritarda la maturazione, mentre se somministrato durante l'invaiaatura, la accelera. Questo comportamento supporta l'ipotesi che il ruolo dell'etilene nella regolazione della maturazione dipenda strettamente dal momento della sua azione (Böttcher et al., 2013). Infine, è probabile che l'etilene agisca in stretta interazione con altri ormoni, come l'acido abscissico, l'auxina e i brassinosteroidi, noti per la loro influenza sulla maturazione (Leida et al., 2016).

6. Conclusioni

Questo studio ha messo in evidenza significative differenze trascrizionali durante il periodo di sviluppo delle bacche appartenenti alle varietà Raboso Piave e Pinot Grigio. In particolare, è stata osservata una marcata riprogrammazione trascrittomico nelle fasi di pre-invaiaitura e invaiaitura.

L'analisi dei geni espressi in modo differenziale tra le fasi di pre-invaiaitura e invaiaitura, nei tessuti di buccia e polpa, ha evidenziato notevoli differenze nell'espressione genica. Attraverso l'analisi di arricchimento funzionale dei DEGs, i geni sono stati classificati in base alle loro funzioni molecolari. Questo ha permesso di evidenziare il ruolo di alcuni ormoni coinvolti nella maturazione e nello sviluppo delle bacche, tra cui acido abscissico, etilene e citochinine.

Dall'analisi dei geni già noti in letteratura, alcuni hanno mostrato differenze evidenti tra le varietà durante l'intero periodo di campionamento. Tra questi, il gene *Vitvi16g01362*, che codifica per il TF HB-12, è risultato maggiormente espresso in Raboso Piave durante la fase di pre-invaiaitura. Inoltre, la sua interazione con l'etilene in questa fase potrebbe spiegare un ritardo nel processo di maturazione, suggerendo che il gene possa essere un candidato chiave per giustificare le differenze nella cinetica di maturazione delle due varietà.

Lo studio più approfondito della rete di orchestrazione trascrizionale controllata dai TF individuati, potrà certamente fare luce sulle diverse interazioni che intercorrono a livello molecolare tra le diverse determinanti genetiche delle varie fasi del processo di maturazione. Un progressivo aumento delle conoscenze relative alla segnalazione ormonale regolata a livello trascrizionale andrebbe a chiarire gli interruttori molecolari responsabili delle transizioni di fase. Avere una piena padronanza di tali principi, è di importanza fondamentale per una viticoltura improntata sulla riduzione degli input all'interno di uno specifico agroecosistema, che vada quindi a implementare dei sistemi di produzione sostenibili ed efficienti, consentendo di far fronte alle nuove sfide che il cambiamento climatico sta ponendo all'agricoltura contemporanea.

7. Appendice

7.1 Appendice A

Statistiche di sequenziamento

SampleID	ReadSum	BaseSum	GC(%)	N(%)	Q20(%)	Q30(%)
PG177PU1	1394678	417180368	45.97	0.01	98.83	96.46
PG177PU2	20820380	6233185665	45.73	0.01	99.07	97.05
PG177PU3	2648149	792429111	46.92	0.01	98.72	96.20
PG177SK1	7702417	2305210441	45.73	0.01	98.65	96.09
PG177SK2	27255006	8156901523	45.77	0.00	99.07	97.14
PG177SK3	20420101	6114601511	45.60	0.00	99.22	97.33
PG188PU1	20679560	6184506684	46.84	0.00	99.39	97.44
PG188PU2	21291062	6373725704	47.03	0.00	99.23	97.34
PG188PU3	24402647	7305345599	47.07	0.00	99.07	97.13
PG188SK1	25214167	7550615209	45.80	0.00	99.08	97.03
PG188SK2	21078951	6303772506	46.13	0.00	99.39	97.58
PG188SK3	27802694	8299962229	46.12	0.00	99.70	98.17
PG199PU1	12829496	3838032470	46.30	0.01	98.31	95.09
PG199PU2	12829496	3838024665	46.30	0.01	98.31	95.08
PG199PU3	12829496	3838025223	46.30	0.01	98.30	95.08
PG199SK1	9055622	2710131936	46.58	0.01	98.67	96.17
PG199SK2	22889990	6850658563	46.05	0.00	99.24	97.42
PG199SK3	25571973	7656703955	45.96	0.01	98.94	96.78
PG208PU1	2767561	828387823	46.31	0.01	98.68	96.13
PG208PU2	23777444	7097579807	46.98	0.00	99.75	98.46
PG208PU3	22092333	6606191771	47.39	0.00	98.89	96.30
PG208SK1	23896818	7154572967	46.66	0.00	99.29	97.55
PG208SK2	23289536	6970516204	46.94	0.01	99.23	97.38
PG208SK3	23742743	7106000366	47.09	0.01	99.16	97.27
PG215PU1	26304567	7866319761	47.85	0.00	98.27	95.08
PG215PU2	21202365	6335139465	47.56	0.00	98.85	96.35
PG215PU3	21529609	6445277067	48.08	0.00	97.82	94.17
PG215SK1	24472077	7304199910	47.24	0.00	99.42	97.88
PG215SK2	21297696	6368125754	47.10	0.00	99.62	98.23
PG215SK3	22681962	6789174132	47.11	0.00	99.30	97.53
PG228PU1	26993683	8039763186	47.26	0.00	99.76	98.49
PG228PU2	23758553	7073409849	47.10	0.00	99.79	98.65
PG228PU3	21580776	6418919059	47.15	0.00	99.60	98.26
PG228SK1	22839962	6815629389	47.20	0.00	99.76	98.57
PG228SK2	23520241	7014530522	47.32	0.00	99.77	98.59
PG228SK3	21193423	6318361600	47.09	0.00	99.71	98.45
PG236PU1	23524859	7001217230	47.04	0.00	99.78	98.57
PG236PU2	23586776	7033757927	47.12	0.00	99.80	98.74

PG236PU3	22094759	6587814980	47.21	0.00	99.77	98.53
PG236SK1	20525944	6122285559	46.76	0.00	99.78	98.57
PG236SK2	22939168	6866047234	46.76	0.00	99.27	97.42
PG236SK3	23100760	6913753539	47.26	0.00	99.32	97.62
PG247PU1	26429620	7897291325	48.15	0.00	97.92	94.26
PG247PU2	25695198	7673627542	48.83	0.00	96.91	92.37
PG247PU3	25015322	7456845906	47.01	0.00	99.74	98.39
PG247SK1	22864732	6845265595	47.20	0.00	99.28	97.50
PG247SK2	25686221	7691893883	47.78	0.01	98.96	96.74
PG247SK3	24132584	7193762437	46.56	0.00	99.79	98.64
RP177PU1	20474446	6129511021	47.60	0.01	98.58	95.95
RP177PU2	18613789	5571397130	47.46	0.01	99.02	96.97
RP177PU3	22679701	6790405847	47.29	0.00	98.48	95.39
RP177SK1	23918279	7163667635	46.40	0.01	99.13	97.21
RP177SK2	23102138	6916091952	46.11	0.01	99.09	97.14
RP177SK3	25820245	7729155255	46.18	0.01	99.10	97.15
RP188PU1	24165593	7233518409	46.46	0.02	98.42	95.52
RP188PU2	21498779	6432598566	47.10	0.01	98.80	96.17
RP188PU3	26839859	8032186458	47.03	0.00	99.71	98.40
RP188SK1	18967910	5676163086	45.73	0.01	99.08	97.10
RP188SK2	17495942	5234719459	45.92	0.01	98.66	95.96
RP188SK3	4009117	1200069106	46.89	0.01	98.71	96.26
RP199PU1	26225743	7849826041	45.53	0.00	99.04	96.98
RP199PU2	24735094	7404740685	45.97	0.00	99.25	97.48
RP199PU3	1552141	464893562	47.42	0.00	99.67	97.96
RP199SK1	26663871	7985826023	46.44	0.00	99.00	96.83
RP199SK2	20243454	6059239597	46.22	0.01	99.16	97.30
RP199SK3	15180183	4544248154	45.30	0.00	99.22	97.30
RP208PU1	19935261	5958937058	46.60	0.01	97.60	93.55
RP208PU2	22324102	6685474338	46.89	0.01	98.86	96.13
RP208PU3	28387970	8500073689	46.85	0.00	99.66	98.13
RP208SK1	18698388	5598931175	46.65	0.01	98.35	95.38
RP208SK2	24705520	7393525658	46.26	0.00	99.13	97.26
RP208SK3	21392221	6404497136	46.82	0.01	99.04	96.97
RP215PU1	1855395	555710600	47.17	0.00	99.60	97.57
RP215PU2	3411978	1020826268	45.51	0.01	99.24	97.33
RP215PU3	3411978	1020851256	45.51	0.01	99.24	97.33
RP215SK1	20653471	6182727070	46.42	0.00	99.16	97.24
RP215SK2	25602347	7664235808	45.93	0.00	99.14	97.23
RP215SK3	23653743	7081063180	46.15	0.00	99.34	97.63
RP228PU1	6108015	1826285842	45.91	0.02	98.03	94.73
RP228PU2	16606221	4970001358	46.42	0.01	98.71	96.13
RP228PU3	20668125	6187322145	46.86	0.00	99.43	97.71
RP228SK1	21075123	6305663729	46.46	0.00	99.15	96.95
RP228SK2	23115108	6921970147	47.47	0.00	99.62	98.13
RP228SK3	26769585	8016809106	47.31	0.00	98.97	96.75
RP236PU1	24822083	7430868912	47.59	0.00	98.32	95.11

RP236PU2	21073288	6308605336	47.94	0.01	98.36	95.10
RP236PU3	21271503	6366462772	47.49	0.01	98.91	96.75
RP236SK1	26860269	8042685084	46.97	0.00	99.02	96.96
RP236SK2	20331508	6073313844	47.72	0.00	99.70	98.18
RP236SK3	22845108	6837908969	47.52	0.00	99.28	97.44
RP247PU1	20639483	6179481141	47.15	0.00	99.18	97.25
RP247PU2	21482747	6412041078	46.11	0.00	99.77	98.52
RP247PU3	21684067	6478922867	46.98	0.00	99.54	98.01
RP247SK1	23241489	6957645082	46.73	0.00	99.38	97.74
RP247SK2	24950446	7426876477	46.93	0.00	99.78	98.54
RP247SK3	27978601	8345716151	46.99	0.00	99.77	98.50
RP256PU1	21865970	6539649391	47.82	0.00	98.28	95.14
RP256PU2	26898025	8025734595	47.55	0.00	99.71	98.28
RP256PU3	21544318	6437983964	47.04	0.00	99.58	98.11
RP256SK1	22368584	6693349212	46.69	0.00	99.63	98.11
RP256SK2	25474715	7627160802	47.35	0.00	99.46	97.53
RP256SK3	25612919	7665510453	47.42	0.00	99.13	97.04
RP265PU1	24715963	7391265956	47.79	0.00	98.08	94.69
RP265PU2	21782158	6518249230	47.80	0.00	98.15	94.97
RP265PU3	21858470	6542132171	47.75	0.00	97.96	94.34
RP265SK1	23352064	6987754524	47.34	0.00	99.28	97.37
RP265SK2	23272705	6935221132	47.38	0.00	99.78	98.54
RP265SK3	25888097	7741567834	47.96	0.00	99.17	97.24
RP276PU1	23854314	7138678412	47.50	0.00	99.22	97.30
RP276PU2	21777807	6516070203	47.49	0.00	99.53	98.00
RP276PU3	15189711	4540394545	46.24	0.00	99.48	97.84
RP276SK1	21502098	6421659724	47.04	0.00	99.70	98.35
RP276SK2	21949916	6543775438	47.02	0.00	99.79	98.62
RP276SK3	22214994	6619644546	47.56	0.00	99.72	98.37
RP285PU1	21579823	6451670839	47.68	0.00	99.52	97.95
RP285PU2	25738193	7698534617	47.73	0.01	99.09	97.14
RP285PU3	24220468	7232889324	47.91	0.02	97.86	94.42
RP285SK1	23281247	6937598762	47.21	0.00	99.79	98.62
RP285SK2	24025493	7178076193	47.86	0.01	99.15	97.32
RP285SK3	21385595	6387273500	47.30	0.00	99.59	98.20

7.2 Appendice B

Statistiche di mappatura

Sample	Total Reads	Mapped Reads	Uniq Mapped	Multiple Map	Reads Map to	Reads Map to
			Reads		('+')	('−')
PG177PU1	2,789,356	2,324,426 (83.33%)	2,283,099 (81.85%)	41,327 (1.48%)	1,188,806 (42.62%)	1,187,778 (42.58%)
PG177PU2	41,640,760	35,905,523 (86.23%)	35,188,401 (84.50%)	717,122 (1.72%)	18,429,462 (44.26%)	18,415,356 (44.22%)
PG177PU3	5,296,298	3,936,337 (74.32%)	3,876,079 (73.18%)	60,258 (1.14%)	2,005,695 (37.87%)	2,005,306 (37.86%)
PG177SK1	15,404,834	13,610,756 (88.35%)	13,308,269 (86.39%)	302,487 (1.96%)	7,016,163 (45.55%)	7,009,656 (45.50%)
PG177SK2	54,510,012	48,836,148 (89.59%)	47,625,896 (87.37%)	1,210,252 (2.22%)	25,282,774 (46.38%)	25,250,132 (46.32%)
PG177SK3	40,840,202	35,724,562 (87.47%)	34,869,177 (85.38%)	855,385 (2.09%)	18,473,991 (45.23%)	18,451,358 (45.18%)
PG188PU1	41,359,120	39,323,043 (95.08%)	38,397,551 (92.84%)	925,492 (2.24%)	20,257,025 (48.98%)	20,242,077 (48.94%)
PG188PU2	42,582,124	35,728,116 (83.90%)	34,961,574 (82.10%)	766,542 (1.80%)	18,374,693 (43.15%)	18,364,814 (43.13%)
PG188PU3	48,805,294	40,382,456 (82.74%)	39,535,042 (81.01%)	847,414 (1.74%)	20,749,309 (42.51%)	20,741,905 (42.50%)
PG188SK1	50,428,334	45,661,737 (90.55%)	44,672,985 (88.59%)	988,752 (1.96%)	23,497,123 (46.60%)	23,474,692 (46.55%)
PG188SK2	42,157,902	40,180,118 (95.31%)	39,227,132 (93.05%)	952,986 (2.26%)	20,727,982 (49.17%)	20,719,057 (49.15%)
PG188SK3	55,605,388	53,586,840 (96.37%)	52,263,799 (93.99%)	1,323,041 (2.38%)	27,704,913 (49.82%)	27,693,511 (49.80%)
PG199PU1	25,658,992	19,533,891 (76.13%)	19,225,490 (74.93%)	308,401 (1.20%)	9,961,349 (38.82%)	9,969,100 (38.85%)
PG199PU2	25,658,992	19,534,629 (76.13%)	19,220,498 (74.91%)	314,131 (1.22%)	9,965,418 (38.84%)	9,972,850 (38.87%)
PG199PU3	25,658,992	19,532,650 (76.12%)	19,218,537 (74.90%)	314,113 (1.22%)	9,966,140 (38.84%)	9,974,715 (38.87%)
PG199SK1	18,111,244	14,894,189 (82.24%)	14,601,952 (80.62%)	292,237 (1.61%)	7,638,620 (42.18%)	7,638,378 (42.17%)

PG199SK2	45,779,980	40,483,311 (88.43%)	39,562,255 (86.42%)	921,056 (2.01%)	20,886,243 (45.62%)	20,861,084 (45.57%)
PG199SK3	51,143,946	46,316,903 (90.56%)	45,295,705 (88.57%)	1,021,198 (2.00%)	23,848,862 (46.63%)	23,825,353 (46.58%)
PG208PU1	5,535,122	4,762,743 (86.05%)	4,688,995 (84.71%)	73,748 (1.33%)	2,430,514 (43.91%)	2,429,663 (43.90%)
PG208PU2	47,554,888	44,928,226 (94.48%)	43,632,379 (91.75%)	1,295,847 (2.72%)	23,315,875 (49.03%)	23,366,530 (49.14%)
PG208PU3	44,184,666	41,107,088 (93.03%)	39,878,466 (90.25%)	1,228,622 (2.78%)	21,337,520 (48.29%)	21,388,304 (48.41%)
PG208SK1	47,793,636	43,203,298 (90.40%)	42,223,582 (88.35%)	979,716 (2.05%)	22,279,251 (46.62%)	22,256,869 (46.57%)
PG208SK2	46,579,072	41,897,336 (89.95%)	40,922,535 (87.86%)	974,801 (2.09%)	21,616,316 (46.41%)	21,597,945 (46.37%)
PG208SK3	47,485,486	40,906,953 (86.15%)	39,936,703 (84.10%)	970,250 (2.04%)	21,133,570 (44.51%)	21,125,737 (44.49%)
PG215PU1	52,609,134	46,683,092 (88.74%)	45,257,758 (86.03%)	1,425,334 (2.71%)	24,282,631 (46.16%)	24,383,423 (46.35%)
PG215PU2	42,404,730	38,800,808 (91.50%)	37,701,052 (88.91%)	1,099,756 (2.59%)	20,120,148 (47.45%)	20,174,472 (47.58%)
PG215PU3	43,059,218	35,037,457 (81.37%)	34,169,197 (79.35%)	868,260 (2.02%)	18,097,748 (42.03%)	18,172,324 (42.20%)
PG215SK1	48,944,154	45,384,402 (92.73%)	44,180,290 (90.27%)	1,204,112 (2.46%)	23,529,128 (48.07%)	23,526,794 (48.07%)
PG215SK2	42,595,392	39,490,805 (92.71%)	38,520,956 (90.43%)	969,849 (2.28%)	20,420,498 (47.94%)	20,400,027 (47.89%)
PG215SK3	45,363,924	40,479,344 (89.23%)	39,524,615 (87.13%)	954,729 (2.10%)	20,888,801 (46.05%)	20,883,161 (46.03%)
PG228PU1	53,987,366	51,271,691 (94.97%)	49,645,391 (91.96%)	1,626,300 (3.01%)	26,829,721 (49.70%)	26,970,574 (49.96%)
PG228PU2	47,517,106	45,041,196 (94.79%)	43,797,269 (92.17%)	1,243,927 (2.62%)	23,436,359 (49.32%)	23,503,945 (49.46%)
PG228PU3	43,161,552	40,870,441 (94.69%)	39,535,088 (91.60%)	1,335,353 (3.09%)	21,438,803 (49.67%)	21,542,999 (49.91%)
PG228SK1	45,679,924	43,790,475 (95.86%)	42,482,722 (93.00%)	1,307,753 (2.86%)	22,828,885 (49.98%)	22,849,294 (50.02%)
PG228SK2	47,040,482	45,347,081 (96.40%)	44,047,574 (93.64%)	1,299,507 (2.76%)	23,603,262 (50.18%)	23,634,788 (50.24%)
PG228SK3	42,386,846	40,475,593 (95.49%)	39,383,346 (92.91%)	1,092,247 (2.58%)	21,007,412 (49.56%)	21,007,095 (49.56%)

PG236PU1	47,049,718	44,319,403 (94.20%)	42,945,527 (91.28%)	1,373,876 (2.92%)	23,202,264 (49.31%)	23,298,249 (49.52%)
PG236PU2	47,173,552	44,166,226 (93.62%)	42,891,136 (90.92%)	1,275,090 (2.70%)	23,031,687 (48.82%)	23,119,858 (49.01%)
PG236PU3	44,189,518	39,381,116 (89.12%)	38,206,146 (86.46%)	1,174,970 (2.66%)	20,568,967 (46.55%)	20,649,714 (46.73%)
PG236SK1	41,051,888	39,255,288 (95.62%)	38,230,904 (93.13%)	1,024,384 (2.50%)	20,372,234 (49.63%)	20,383,071 (49.65%)
PG236SK2	45,878,336	39,644,908 (86.41%)	38,541,367 (84.01%)	1,103,541 (2.41%)	20,597,943 (44.90%)	20,617,704 (44.94%)
PG236SK3	46,201,520	39,714,102 (85.96%)	38,592,666 (83.53%)	1,121,436 (2.43%)	20,643,797 (44.68%)	20,657,641 (44.71%)
PG247PU1	52,859,240	44,065,142 (83.36%)	42,369,511 (80.16%)	1,695,631 (3.21%)	23,342,022 (44.16%)	23,450,503 (44.36%)
PG247PU2	51,390,396	39,780,312 (77.41%)	38,130,819 (74.20%)	1,649,493 (3.21%)	21,141,424 (41.14%)	21,300,775 (41.45%)
PG247PU3	50,030,644	47,469,281 (94.88%)	45,905,531 (91.75%)	1,563,750 (3.13%)	24,929,673 (49.83%)	25,040,642 (50.05%)
PG247SK1	45,729,464	41,927,906 (91.69%)	40,572,123 (88.72%)	1,355,783 (2.96%)	21,928,676 (47.95%)	21,938,937 (47.98%)
PG247SK2	51,372,442	43,814,203 (85.29%)	42,352,738 (82.44%)	1,461,465 (2.84%)	22,945,761 (44.67%)	22,964,222 (44.70%)
PG247SK3	48,265,168	46,159,455 (95.64%)	44,660,358 (92.53%)	1,499,097 (3.11%)	24,193,715 (50.13%)	24,209,071 (50.16%)
RP177PU1	40,948,892	31,559,850 (77.07%)	30,822,093 (75.27%)	737,757 (1.80%)	16,290,216 (39.78%)	16,291,011 (39.78%)
RP177PU2	37,227,578	29,719,886 (79.83%)	29,065,340 (78.07%)	654,546 (1.76%)	15,299,122 (41.10%)	15,296,129 (41.09%)
RP177PU3	45,359,402	41,330,157 (91.12%)	40,313,433 (88.88%)	1,016,724 (2.24%)	21,323,545 (47.01%)	21,361,593 (47.09%)
RP177SK1	47,836,558	42,551,788 (88.95%)	41,480,856 (86.71%)	1,070,932 (2.24%)	22,031,596 (46.06%)	22,021,564 (46.04%)
RP177SK2	46,204,276	41,257,633 (89.29%)	40,205,959 (87.02%)	1,051,674 (2.28%)	21,381,626 (46.28%)	21,375,233 (46.26%)
RP177SK3	51,640,490	47,560,319 (92.10%)	46,311,462 (89.68%)	1,248,857 (2.42%)	24,688,872 (47.81%)	24,679,529 (47.79%)
RP188PU1	48,331,186	40,895,955 (84.62%)	40,013,980 (82.79%)	881,975 (1.82%)	21,010,378 (43.47%)	21,013,946 (43.48%)
RP188PU2	42,997,558	35,235,759 (81.95%)	34,442,892 (80.10%)	792,867 (1.84%)	18,113,365 (42.13%)	18,137,902 (42.18%)

RP188PU3	53,679,718	44,657,881 (83.19%)	43,660,678 (81.34%)	997,203 (1.86%)	22,963,076 (42.78%)	22,983,437 (42.82%)
RP188SK1	37,935,820	33,930,863 (89.44%)	33,126,809 (87.32%)	804,054 (2.12%)	17,520,805 (46.19%)	17,512,623 (46.16%)
RP188SK2	34,991,884	28,627,459 (81.81%)	28,000,289 (80.02%)	627,170 (1.79%)	14,742,838 (42.13%)	14,748,333 (42.15%)
RP188SK3	8,018,234	6,684,125 (83.36%)	6,551,582 (81.71%)	132,543 (1.65%)	3,433,986 (42.83%)	3,430,451 (42.78%)
RP199PU1	52,451,486	47,573,621 (90.70%)	46,629,212 (88.90%)	944,409 (1.80%)	24,397,089 (46.51%)	24,396,648 (46.51%)
RP199PU2	49,470,188	46,496,440 (93.99%)	45,525,686 (92.03%)	970,754 (1.96%)	23,894,679 (48.30%)	23,879,531 (48.27%)
RP199PU3	3,104,282	2,614,675 (84.23%)	2,566,651 (82.68%)	48,024 (1.55%)	1,338,933 (43.13%)	1,339,389 (43.15%)
RP199SK1	53,327,742	47,430,571 (88.94%)	46,164,577 (86.57%)	1,265,994 (2.37%)	24,641,949 (46.21%)	24,635,009 (46.20%)
RP199SK2	40,486,908	35,629,207 (88.00%)	34,817,488 (86.00%)	811,719 (2.00%)	18,379,006 (45.39%)	18,377,397 (45.39%)
RP199SK3	30,360,366	27,024,823 (89.01%)	26,450,850 (87.12%)	573,973 (1.89%)	13,915,965 (45.84%)	13,925,314 (45.87%)
RP208PU1	39,870,522	32,523,171 (81.57%)	31,916,294 (80.05%)	606,877 (1.52%)	16,682,591 (41.84%)	16,671,143 (41.81%)
RP208PU2	44,648,204	40,185,040 (90.00%)	39,340,584 (88.11%)	844,456 (1.89%)	20,638,949 (46.23%)	20,659,623 (46.27%)
RP208PU3	56,775,940	51,007,185 (89.84%)	49,918,201 (87.92%)	1,088,984 (1.92%)	26,228,279 (46.20%)	26,241,803 (46.22%)
RP208SK1	37,396,776	29,417,884 (78.66%)	28,694,545 (76.73%)	723,339 (1.93%)	15,236,854 (40.74%)	15,226,920 (40.72%)
RP208SK2	49,411,040	44,541,569 (90.14%)	43,364,661 (87.76%)	1,176,908 (2.38%)	23,139,917 (46.83%)	23,128,636 (46.81%)
RP208SK3	42,784,442	35,396,520 (82.73%)	34,472,732 (80.57%)	923,788 (2.16%)	18,373,683 (42.94%)	18,379,548 (42.96%)
RP215PU1	3,710,790	3,139,560 (84.61%)	3,075,800 (82.89%)	63,760 (1.72%)	1,612,741 (43.46%)	1,613,306 (43.48%)
RP215PU2	6,823,956	5,869,739 (86.02%)	5,755,153 (84.34%)	114,586 (1.68%)	3,012,845 (44.15%)	3,019,186 (44.24%)
RP215PU3	6,823,956	5,870,487 (86.03%)	5,758,774 (84.39%)	111,713 (1.64%)	3,011,270 (44.13%)	3,017,163 (44.21%)
RP215SK1	41,306,942	36,484,522 (88.33%)	35,621,861 (86.24%)	862,661 (2.09%)	18,822,261 (45.57%)	18,815,171 (45.55%)

RP215SK2	51,204,694	46,955,992 (91.70%)	45,800,287 (89.45%)	1,155,705 (2.26%)	24,243,901 (47.35%)	24,232,876 (47.33%)
RP215SK3	47,307,486	43,936,803 (92.87%)	42,775,343 (90.42%)	1,161,460 (2.46%)	22,781,713 (48.16%)	22,773,301 (48.14%)
RP228PU1	12,216,030	10,434,957 (85.42%)	10,276,376 (84.12%)	158,581 (1.30%)	5,318,581 (43.54%)	5,326,533 (43.60%)
RP228PU2	33,212,442	30,156,285 (90.80%)	29,495,022 (88.81%)	661,263 (1.99%)	15,516,649 (46.72%)	15,576,833 (46.90%)
RP228PU3	41,336,250	37,497,294 (90.71%)	36,667,071 (88.70%)	830,223 (2.01%)	19,281,542 (46.65%)	19,349,610 (46.81%)
RP228SK1	42,150,246	40,236,013 (95.46%)	39,146,903 (92.87%)	1,089,110 (2.58%)	20,874,071 (49.52%)	20,895,048 (49.57%)
RP228SK2	46,230,216	38,291,034 (82.83%)	37,312,399 (80.71%)	978,635 (2.12%)	19,818,125 (42.87%)	19,822,445 (42.88%)
RP228SK3	53,539,170	45,371,939 (84.75%)	44,231,879 (82.62%)	1,140,060 (2.13%)	23,474,677 (43.85%)	23,471,778 (43.84%)
RP236PU1	49,644,166	43,786,042 (88.20%)	42,661,725 (85.94%)	1,124,317 (2.26%)	22,608,467 (45.54%)	22,700,656 (45.73%)
RP236PU2	42,146,576	35,228,230 (83.59%)	34,357,449 (81.52%)	870,781 (2.07%)	18,183,131 (43.14%)	18,256,795 (43.32%)
RP236PU3	42,543,006	34,155,522 (80.28%)	33,433,456 (78.59%)	722,066 (1.70%)	17,535,646 (41.22%)	17,595,163 (41.36%)
RP236SK1	53,720,538	45,672,157 (85.02%)	44,532,624 (82.90%)	1,139,533 (2.12%)	23,627,936 (43.98%)	23,632,897 (43.99%)
RP236SK2	40,663,016	36,336,515 (89.36%)	35,321,400 (86.86%)	1,015,115 (2.50%)	18,900,182 (46.48%)	18,926,226 (46.54%)
RP236SK3	45,690,216	39,281,939 (85.97%)	38,261,926 (83.74%)	1,020,013 (2.23%)	20,349,163 (44.54%)	20,386,966 (44.62%)
RP247PU1	41,278,966	34,951,421 (84.67%)	34,177,978 (82.80%)	773,443 (1.87%)	17,976,588 (43.55%)	18,045,633 (43.72%)
RP247PU2	42,965,494	40,183,859 (93.53%)	39,092,433 (90.99%)	1,091,426 (2.54%)	20,872,785 (48.58%)	20,959,993 (48.78%)
RP247PU3	43,368,134	40,818,051 (94.12%)	39,427,504 (90.91%)	1,390,547 (3.21%)	21,419,903 (49.39%)	21,573,240 (49.74%)
RP247SK1	46,482,978	43,256,578 (93.06%)	42,142,539 (90.66%)	1,114,039 (2.40%)	22,376,187 (48.14%)	22,447,301 (48.29%)
RP247SK2	49,900,892	47,266,034 (94.72%)	46,013,350 (92.21%)	1,252,684 (2.51%)	24,492,194 (49.08%)	24,558,195 (49.21%)
RP247SK3	55,957,202	52,876,323 (94.49%)	51,309,892 (91.69%)	1,566,431 (2.80%)	27,528,017 (49.19%)	27,590,066 (49.31%)

RP256PU2	53,796,050	50,034,380 (93.01%)	48,130,144 (89.47%)	1,904,236 (3.54%)	26,470,813 (49.21%)	26,614,481 (49.47%)
RP256PU3	43,088,636	38,290,325 (88.86%)	37,164,215 (86.25%)	1,126,110 (2.61%)	19,949,891 (46.30%)	20,017,763 (46.46%)
RP256SK1	44,737,168	41,812,197 (93.46%)	40,609,798 (90.77%)	1,202,399 (2.69%)	21,742,153 (48.60%)	21,766,533 (48.65%)
RP256SK2	50,949,430	43,626,480 (85.63%)	42,435,513 (83.29%)	1,190,967 (2.34%)	22,636,706 (44.43%)	22,657,738 (44.47%)
RP256SK3	51,225,838	45,979,095 (89.76%)	44,353,555 (86.58%)	1,625,540 (3.17%)	24,203,552 (47.25%)	24,312,440 (47.46%)
RP256SPU1	43,731,940	36,448,081 (83.34%)	35,340,623 (80.81%)	1,107,458 (2.53%)	19,006,752 (43.46%)	19,119,829 (43.72%)
RP265PU1	49,431,926	40,875,446 (82.69%)	39,522,554 (79.95%)	1,352,892 (2.74%)	21,379,353 (43.25%)	21,483,433 (43.46%)
RP265PU2	43,564,316	35,826,311 (82.24%)	34,782,060 (79.84%)	1,044,251 (2.40%)	18,654,185 (42.82%)	18,765,580 (43.08%)
RP265PU3	43,716,940	36,069,540 (82.51%)	34,925,579 (79.89%)	1,143,961 (2.62%)	18,823,241 (43.06%)	18,951,312 (43.35%)
RP265SK1	46,704,128	41,516,593 (88.89%)	40,245,194 (86.17%)	1,271,399 (2.72%)	21,651,519 (46.36%)	21,772,738 (46.62%)
RP265SK2	46,545,410	43,848,380 (94.21%)	42,432,915 (91.16%)	1,415,465 (3.04%)	22,927,463 (49.26%)	22,989,912 (49.39%)
RP265SK3	51,776,194	44,412,110 (85.78%)	42,922,106 (82.90%)	1,490,004 (2.88%)	23,251,321 (44.91%)	23,406,846 (45.21%)
RP276PU1	47,708,628	40,920,059 (85.77%)	39,704,857 (83.22%)	1,215,202 (2.55%)	21,308,269 (44.66%)	21,403,465 (44.86%)
RP276PU2	43,555,614	37,070,034 (85.11%)	35,969,121 (82.58%)	1,100,913 (2.53%)	19,317,153 (44.35%)	19,399,108 (44.54%)
RP276PU3	30,379,422	28,852,739 (94.97%)	28,070,876 (92.40%)	781,863 (2.57%)	14,981,621 (49.32%)	15,079,529 (49.64%)
RP276SK1	43,004,196	40,280,696 (93.67%)	39,044,129 (90.79%)	1,236,567 (2.88%)	21,003,145 (48.84%)	21,082,255 (49.02%)
RP276SK2	43,899,832	41,637,029 (94.85%)	40,383,745 (91.99%)	1,253,284 (2.85%)	21,717,164 (49.47%)	21,770,253 (49.59%)
RP276SK3	44,429,988	42,146,503 (94.86%)	40,578,525 (91.33%)	1,567,978 (3.53%)	22,221,069 (50.01%)	22,292,119 (50.17%)
RP285PU1	43,159,646	36,870,463 (85.43%)	35,651,949 (82.60%)	1,218,514 (2.82%)	19,337,236 (44.80%)	19,397,380 (44.94%)
RP285PU2	51,476,386	43,425,594 (84.36%)	42,070,915 (81.73%)	1,354,679 (2.63%)	22,651,133 (44.00%)	22,787,176 (44.27%)

RP285PU3	48,440,936	39,057,822 (80.63%)	37,705,255 (77.84%)	1,352,567 (2.79%)	20,516,957 (42.35%)	20,632,330 (42.59%)
RP285SK1	46,562,494	43,759,384 (93.98%)	42,346,988 (90.95%)	1,412,396 (3.03%)	22,898,366 (49.18%)	22,970,147 (49.33%)
RP285SK2	48,050,986	40,638,616 (84.57%)	39,235,467 (81.65%)	1,403,149 (2.92%)	21,340,032 (44.41%)	21,469,711 (44.68%)
RP285SK3	42,771,190	36,501,816 (85.34%)	35,489,999 (82.98%)	1,011,817 (2.37%)	18,987,978 (44.39%)	19,039,409 (44.51%)

Bibliografia

"Pinot grigio", in Principali vitigni da vino coltivati in Italia - Volume I, Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, 1960 - I. Cosmo e M. Polsinelli.

"Raboso piave", in Principali vitigni da vino coltivati in Italia - Volume I, Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, 1960 - I. Cosmo e M. Polsinelli.

Bernáth, Slavko, Oleg Paulen, Bernard Šiška, Zuzana Kusá, e František Tóth. «Influence of Climate Warming on Grapevine (*Vitis Vinifera* L.) Phenology in Conditions of Central Europe (Slovakia)». *Plants* 10, fasc. 5 (20 maggio 2021): 1020. <https://doi.org/10.3390/plants10051020>.

Böttcher, Christine, Katie E. Harvey, Paul K. Boss, e Christopher Davies. «Ripening of Grape Berries Can Be Advanced or Delayed by Reagents That Either Reduce or Increase Ethylene Levels». *Functional Plant Biology* 40, fasc. 6 (2013): 566. <https://doi.org/10.1071/FP12347>.
Cerri, Martina, e Lara Reale. «Anatomical Traits of the Principal Fruits: An Overview». *Scientia Horticulturae* 270 (agosto 2020): 109390. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109390>.

Chervin, Christian, Arak Tira-umphon, Nancy Terrier, Mohamed Zouine, Dany Severac, e Jean-Paul Roustan. «Stimulation of the Grape Berry Expansion by Ethylene and Effects on Related Gene Transcripts, over the Ripening Phase». *Physiologia Plantarum* 134, fasc. 3 (novembre 2008): 534–46. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01158.x>.

Costantini, Laura, Juri Battilana, Flutura Lamaj, Girolamo Fanizza, e Maria Grando. «Berry and Phenology-Related Traits in Grapevine (*Vitis Vinifera* L.): From Quantitative Trait Loci to Underlying Genes». *BMC Plant Biology* 8, fasc. 1 (2008): 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-38>.

Cramer, Grant R, Ryan Ghan, Karen A Schlauch, Richard L Tillett, Hildegard Heymann, Alberto Ferrarini, Massimo Delledonne, Sara Zenoni, Marianna Fasoli, e Mario Pezzotti. «Transcriptomic Analysis of the Late Stages of Grapevine (*Vitis Vinifera* Cv. Cabernet Sauvignon) Berry Ripening Reveals Significant Induction of Ethylene Signaling and Flavor Pathways in the Skin». *BMC Plant Biology* 14, fasc. 1 (dicembre 2014): 370. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0370-8>.

Degu, Asfaw, Uri Hochberg, Noga Sikron, Luca Venturini, Genny Buson, Ryan Ghan, Inbar Plaschkes, et al. «Metabolite and Transcript Profiling of Berry Skin during Fruit Development Elucidates Differential Regulation between Cabernet Sauvignon and Shiraz Cultivars at Branching Points in the Polyphenol Pathway». *BMC Plant Biology* 14, fasc. 1 (dicembre 2014): 188. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0188-4>.

Delfino Pietro, Sara Zenoni, Zahra Imanifard, Giovanni Battista Tornielli, e Diana Bellin. «Selection of Candidate Genes Controlling Veraison Time in Grapevine through Integration of Meta-QTL and Transcriptomic Data». *BMC Genomics* 20, fasc. 1 (dicembre 2019): 739. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6124-0>.

Deluc, Laurent G, Jérôme Grimplet, Matthew D Wheatley, Richard L Tillett, David R Quilici, Craig Osborne, David A Schooley, Karen A Schlauch, John C Cushman, e Grant R Cramer. «Transcriptomic and Metabolite Analyses of Cabernet Sauvignon Grape Berry Development». *BMC Genomics* 8, fasc. 1 (dicembre 2007): 429. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-429>.

Fasoli Marianna, Chandra L. Richter, Sara Zenoni, Edoardo Bertini, Nicola Vitulo, Silvia Dal Santo, Nick Dokoozlian, Mario Pezzotti, e Giovanni Battista Tornielli. «Timing and Order of the Molecular Events Marking the Onset of Berry Ripening in Grapevine». *Plant Physiology* 178, fasc. 3 (novembre 2018): 1187–1206. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00559>.

Fontes, Natacha, Hernâni Gerós, e Serge Delrot. «Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes». *American Journal of Enology and Viticulture* 62, fasc. 3 (settembre 2011): 270–78. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10125>.

Fortes, Ana, Rita Teixeira, e Patricia Agudelo-Romero. «Complex Interplay of Hormonal Signals during Grape Berry Ripening». *Molecules* 20, fasc. 5 (21 maggio 2015): 9326–43. <https://doi.org/10.3390/molecules20059326>.

Frenzke Lena, Franco Röckel, Torsten Wenke, Florian Schwander, Konrad Grützmann, Julia Naumann, Falk Zakrzewski, et al. «Genotyping-by-Sequencing-Based High-Resolution

Mapping Reveals a Single Candidate Gene for the Grapevine Veraison Locus *Ver1*». *Plant Physiology* 196, fasc. 1 (2 settembre 2024): 244–60. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae272>.

H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.

Hardie, W.J., T.P. O'Brien, e V.G. Jaudzems. «Morphology, Anatomy and Development of the Pericarp after Anthesis in Grape, *Vitis Vinifera* L.» *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2, fasc. 2 (luglio 1996): 97–142. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1996.tb00101.x>.

Hellman E.W “Grapevine structure and function” *Oregon viticulture* (2003): 5-19

Hur, Yoon-Sun, Ji-Hyun Um, Sunghan Kim, Kyunga Kim, Hee-Jung Park, Jong-Seok Lim, Woo-Young Kim, et al. «*Arabidopsis Thaliana* Homeobox 12 (ATHB 12), a Homeodomain-leucine Zipper Protein, Regulates Leaf Growth by Promoting Cell Expansion and Endoreduplication». *New Phytologist* 205, fasc. 1 (gennaio 2015): 316–28. <https://doi.org/10.1111/nph.12998>.

Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature methods*, 2015, 12(4): 357-360.

Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Vilo J, Peterson H. gprofiler2 -- an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g:Profiler. *F1000Res*. 2020 Jul 15;9:ELIXIR-709. doi: 10.12688/f1000research.24956.2. PMID: 33564394; PMCID: PMC7859841.

Leida, Carmen, Antonio Dal Rì, Lorenza Dalla Costa, Maria D. Gómez, Valerio Pompili, Paolo Sonogo, Kristof Engelen, Domenico Masuero, Gabino Ríos, e Claudio Moser. «Insights into the Role of the Berry-Specific Ethylene Responsive Factor VviERF045». *Frontiers in Plant Science* 7 (9 dicembre 2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01793>.

Lijavetzky, Diego, Pablo Carbonell-Bejerano, Jérôme Grimplet, Gema Bravo, Pilar Flores, José Fenoll, Pilar Hellín, Juan Carlos Oliveros, e José M. Martínez-Zapater. «Berry Flesh and Skin Ripening Features in *Vitis Vinifera* as Assessed by Transcriptional Profiling». A cura di Miguel A. Blazquez. *PLoS ONE* 7, fasc. 6 (29 giugno 2012): e39547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039547>.

Lorenz, D.H., K.W. Eichhorn, H. Bleiholder, R. Klose, U. Meier, e E. Weber. «Growth Stages of the Grapevine: Phenological Growth Stages of the Grapevine (*Vitis Vinifera* L. Ssp. *Vinifera*)—Codes and Descriptions According to the Extended BBCH Scale». *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, fasc. 2 (luglio 1995): 100–103.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1995.tb00085.x>.

Love, Michael I., Wolfgang Huber, e Simon Anders. «Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2». *Genome Biology* 15, fasc. 12 (5 dicembre 2014): 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.

Ma Qian, e Jingli Yang. «Transcriptome Profiling and Identification of the Functional Genes Involved in Berry Development and Ripening in *Vitis Vinifera*». *Gene* 680 (gennaio 2019): 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.033>.

Malacarne, Giulia, Jorge Lagreze, Barbara Rojas San Martin, Mickael Malnoy, Marco Moretto, Claudio Moser, e Lorenza Dalla Costa. «Insights into the cell-wall dynamics in grapevine berries during ripening and in response to biotic and abiotic stresses». *Plant Molecular Biology* 114, fasc. 3 (11 aprile 2024): 38. <https://doi.org/10.1007/s11103-024-01437-w>.

Massonnet Mélanie, Marianna Fasoli, Giovanni Battista Tornielli, Mario Altieri, Marco Sandri, Paola Zuccolotto, Paola Paci, Massimo Gardiman, Sara Zenoni, e Mario Pezzotti. «Ripening Transcriptomic Program in Red and White Grapevine Varieties Correlates with Berry Skin Anthocyanin Accumulation». *Plant Physiology* 174, fasc. 4 (agosto 2017): 2376–96. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00311>.

Matsuo, Satoshi, Kaori Kikuchi, Machiko Fukuda, Ichiro Honda, e Shunsuke Imanishi. «Roles and Regulation of Cytokinins in Tomato Fruit Development», s.d.

Matus, José Tomás, Erika Cavallini, Rodrigo Loyola, Janine Höll, Laura Finezzo, Silvia Dal Santo, Sandrine Vialet, et al. «A Group of Grapevine MYBA Transcription Factors Located in Chromosome 14 Control Anthocyanin Synthesis in Vegetative Organs with Different Specificities Compared with the Berry Color Locus». *The Plant Journal* 91, fasc. 2 (luglio 2017): 220–36. <https://doi.org/10.1111/tpj.13558>.

Monteiro, Ana I., Aureliano C. Malheiro, e Eunice A. Bacelar. «Morphology, Physiology and Analysis Techniques of Grapevine Bud Fruitfulness: A Review». *Agriculture* 11, fasc. 2 (5 febbraio 2021): 127. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020127>.

Palumbo Maria Concetta, Sara Zenoni, Marianna Fasoli, Mélanie Massonnet, Lorenzo Farina, Filippo Castiglione, Mario Pezzotti, e Paola Paci. «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». *The Plant Cell* 26, fasc. 12 (29 gennaio 2015): 4617–35. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133710>.

Parada, Francisca, et al. 'Phytohormonal Control over the Grapevine Berry Development'. *Phytohormones - Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*, InTech, 16 Aug. 2017. Crossref, doi:10.5772/intechopen.68453.

Pastore, Chiara, Tommaso Frioni, e Maria P. Diago. «Editorial: Resilience of Grapevine to Climate Change: From Plant Physiology to Adaptation Strategies». *Frontiers in Plant Science* 13 (9 agosto 2022): 994267. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994267>.

Pilati, Stefania, Michele Perazzolli, Andrea Malossini, Alessandro Cestaro, Lorenzo Demattè, Paolo Fontana, Antonio Dal Ri, Roberto Viola, Riccardo Velasco, e Claudio Moser. «Genome-Wide Transcriptional Analysis of Grapevine Berry Ripening Reveals a Set of Genes Similarly Modulated during Three Seasons and the Occurrence of an Oxidative Burst at Véraison». *BMC Genomics* 8, fasc. 1 (dicembre 2007): 428. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-428>.

Ré, Delfina A, Matías Capella, Gustavo Bonaventure, e Raquel L Chan. «Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 evolved Divergently to Fine Tune Processes Associated with Growth and Responses to Water Stress». *BMC Plant Biology* 14, fasc. 1 (dicembre 2014): 150. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-150>.

Robinson, Simon P., e Chris Davies. «Molecular Biology of Grape Berry Ripening». *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, fasc. 2 (luglio 2000): 175–88. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00177.x>.

Serrano, Alejandra, Carmen Espinoza, Grace Armijo, Claudio Inostroza-Blancheteau, Evelyn Poblete, Carlos Meyer-Regueiro, Anibal Arce, Francisca Parada, Claudia Santibáñez, e Patricio Arce-Johnson. «Omics Approaches for Understanding Grapevine Berry Development: Regulatory Networks Associated with Endogenous Processes and Environmental Responses». *Frontiers in Plant Science* 8 (7 settembre 2017): 1486. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01486>.

Theine Jens, Daniela Holtgräwe, Katja Herzog, Florian Schwander, Anna Kicherer, Ludger Hausmann, Prisca Viehöver, Reinhard Töpfer, e Bernd Weisshaar. «Transcriptomic Analysis of Temporal Shifts in Berry Development between Two Grapevine Cultivars of the Pinot Family Reveals Potential Genes Controlling Ripening Time». *BMC Plant Biology* 21, fasc. 1 (7 luglio 2021): 327. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03110-6>.

Valdés, Ana Elisa, Elin Övernäs, Henrik Johansson, Alvaro Rada-Iglesias, e Peter Engström. «The homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class I transcription factors ATHB7 and ATHB12 modulate abscisic acid signalling by regulating protein phosphatase 2C and abscisic acid receptor gene activities». *Plant Molecular Biology* 80, fasc. 4 (1 novembre

2012): 405–18. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9956-4>.

Vincenzi, Simone, Jan Bierma, Samanthi I. Wickramasekara, Andrea Curioni, Diana Gazzola, e Alan T. Bakalinsky. «Characterization of a Grape Class IV Chitinase». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, fasc. 24 (18 giugno 2014): 5660–68. <https://doi.org/10.1021/jf501225g>.

Viret O., Gindro K. “Fungi and Grapevine Mycobiota”. “*Science of Fungi in Grapevine*”. Cham: Springer International Publishing, 2024. 109-195.

Wang, Peipei, Aishui Yu, Xinglong Ji, Qian Mu, Muhammad Salman Haider, Ruonan Wei, Xiangpeng Leng, e Jinggui Fang. «Transcriptome and Metabolite Integrated Analysis Reveals That Exogenous Ethylene Controls Berry Ripening Processes in Grapevine». *Food Research International* 155 (maggio 2022): 111084. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111084>.

Wei, Lingzhu, Yuehua Cao, Jianhui Cheng, Jiang Xiang, Biwei Shen, e Jiang Wu. «Comparative Transcriptome Analyses of a Table Grape ‘Summer Black’ and Its Early-Ripening Mutant ‘Tiangong Moyu’ Identify Candidate Genes Potentially Involved in Berry Development and Ripening». *Journal of Plant Interactions* 15, fasc. 1 (1 gennaio 2020): 213–22. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1760367>.

Wong, D. C. J., R. Lopez Gutierrez, N. Dimopoulos, G. A. Gambetta, e S. D. Castellarin. «Combined Physiological, Transcriptome, and Cis-Regulatory Element Analyses Indicate That Key Aspects of Ripening, Metabolism, and Transcriptional Program in Grapes (*Vitis Vinifera* L.) Are Differentially Modulated Accordingly to Fruit Size». *BMC Genomics* 17, fasc. 1 (dicembre 2016): 416. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2660-z>.

Xiaoya Shi, Shuo Cao, Xu Wang, Siyang Huang, Yue Wang, Zhongjie Liu, Wenwen Liu, Xiangpeng Leng, Yanling Peng, Nan Wang, Yiwen Wang, Zhiyao Ma, Xiaodong Xu, Fan Zhang, Hui Xue, Haixia Zhong, Yi Wang, Kekun Zhang, Amandine Velt, Komlan Avia, Daniela Holtgräwe, Jérôme Grimplet, José Tomás Matus, Doreen Ware, Xinyu Wu, Haibo Wang, Chonghuai Liu, Yuling Fang, Camille Rustenholz, Zongming Cheng, Hua Xiao, Yongfeng Zhou, The complete reference genome for grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetics and breeding, *Horticulture Research*, Volume 10, Issue 5, May 2023, uhad061, <https://doi.org/10.1093/hr/uhad061>

Xu, Lili, Qianyu Yue, Guangqing Xiang, Feng’e Bian, e Yuxin Yao. «Melatonin Promotes Ripening of Grape Berry via Increasing the Levels of ABA, H₂O₂, and Particularly Ethylene». *Horticulture Research* 5, fasc. 1 (dicembre 2018): 41. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0045-y>.

Zenoni, Sara, Alberto Ferrarini, Enrico Giacomelli, Luciano Xumerle, Marianna Fasoli,

Giovanni Malerba, Diana Bellin, Mario Pezzotti, e Massimo Delledonne. «Characterization of Transcriptional Complexity during Berry Development in *Vitis Vinifera* Using RNA-Seq». *Plant Physiology* 152, fasc. 4 (aprile 2010): 1787–95. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149716>.

Zyprian Eva, Iris Ochßner, Florian Schwander, Silvio Šimon, Ludger Hausmann, Martina Bonow-Rex, Paula Moreno-Sanz, et al. «Quantitative Trait Loci Affecting Pathogen Resistance and Ripening of Grapevines». *Molecular Genetics and Genomics* 291, fasc. 4 (agosto 2016): 1573–94. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1200-5>.

