

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti
Risorse naturali e Ambiente - DAFNAE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

Fisiologia dell'induzione a fiore in vite: stato dell'arte e approcci sperimentali

Relatore

Prof. Alessandro Botton

Correlatore

Dott. Francesco Girardi

Laureando

ALBERTO DAL MARTELLO

Matricola n.

1201411

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Indice

Riassunto.....	4
Abstract.....	6
1 Introduzione.....	9
1.1 La vite	9
1.2 La gemma di vite	9
1.2.1 Paradormienza, endodormienza, ecodormienza	9
1.2.2 Organomorfogenesi della gemma.....	12
1.3 Fattori che influenzano la fertilità	17
1.3.1 Luce	18
1.3.2 Temperatura.....	19
1.3.3 Stato Idrico	19
1.3.4 Disponibilità di carboidrati	20
1.4 Il controllo ormonale della fioritura	22
1.5 Il controllo genetico della fioritura.....	24
2 Scopo della tesi	31
3 Materiali e metodi	33
3.1 Materiale vegetale e scelta varietale	33
3.2 Piani sperimentali e campionamenti.....	34
3.3 Estrazione di RNA	37
4 Risultati attesi	39
5 Conclusioni e prospettive future.....	41
6 Bibliografia	42

Riassunto

L'importanza che il fenomeno dell'induzione a fiore riveste nella resa di un vigneto è notevole. La produzione di uve da vino, infatti, risente particolarmente di fluttuazioni annuali nella resa dei raccolti. Ciò si stima possa essere dovuto a cambiamenti riguardanti, in primo luogo, la numerosità delle inflorescenze formate e in secondo luogo nel numero di fiori per infiorescenza. Tra i fattori suscettibili di andare a modificare la produzione di inflorescenze e quindi di bacche ne sono noti diversi. Sicuramente le condizioni agro-meteorologiche sono fondamentali. Fluttuazioni riguardanti l'intensità luminosa e la temperatura sono capaci di ridurre il carico fruttifero in molte specie arboree, vite inclusa. Vi sono poi numerose fisiopatie in grado di causare danni all'apparato fiorale. Lo studio dei meccanismi molecolari che presiedono al complesso fenomeno dell'induzione a fiore sicuramente è da implementare, soprattutto riguardo la vite. Infatti, se molto è stato studiato e compreso per quanto riguarda piante modello come *Arabidopsis thaliana* ancora poco è noto a proposito di *Vitis vinifera*. Il presente studio che si inserisce nel più ampio progetto di una tesi di dottorato, mostra due prove che hanno avuto lo scopo di andare a creare una collezione di campioni di gemme di vite, in particolare gemme ibernanti, che hanno la funzione di assicurare alla pianta la propagazione della specie e al produttore il raccolto per l'anno successivo. Su questi campioni è stato applicato un protocollo di estrazione dell'RNA al fine di poter svolgere analisi trascrittomiche. L'obiettivo di queste analisi sarà quello di comprendere meglio i meccanismi fisiologici e molecolari che stanno dietro al fenomeno della fioritura. Per l'esperimento inoltre è stata scelta la cultivar Merlot in virtù della sua diffusione a livello internazionale e quindi anche della sua rilevanza dal punto di vista economico.

Abstract

The importance that the flower induction phenomenon has in viticulture is notable. The production of wine grapes, in fact, is particularly affected by annual fluctuations in crop yields. This is estimated to be due to changes concerning, firstly, the number of inflorescences formed and secondly in the number of flowers per inflorescence. Among the factors likely to modify the production of inflorescences and therefore of berries, several are known. Certainly agro-meteorological conditions are fundamental. Fluctuations regarding light intensity and temperature can reduce the fruit load in many tree species, including vines. There are also numerous physiopathological agents capable of causing damage to the floral system. The study of the molecular mechanisms that govern the complex phenomenon of flower induction certainly needs to be implemented, especially as regards the vine. In fact, if much has been studied and understood regarding model plants such as *Arabidopsis thaliana*, little is known regarding *Vitis vinifera*. The present study, which is part of the broader project of a doctoral thesis, shows two trials which had the aim of creating a collection of samples of vine buds, in particular latent buds, which have the function of ensuring for the plant the propagation of the species and for the producer the harvest for the following year. An RNA extraction protocol was applied to these samples, in order to carry out transcriptomic analyses. The objective of these analyses will be to better understand the physiological and molecular mechanisms behind the flowering phenomenon. Furthermore, the Merlot cultivar was chosen for the experiment due to its international diffusion and therefore also its relevance from an economic point of view.

1 Introduzione

1.1 La vite

La vite da vino (*Vitis vinifera*) è una delle colture più importanti del mondo. Nella sola Italia sono presenti 636mila ettari di vigneto di cui 590mila atti a vino (dati ISTAT). In uno scenario di cambiamento climatico come quello a cui stiamo assistendo è necessario più che mai studiare quei processi biologici che più di altri sono suscettibili di subire variazioni al modificarsi delle condizioni agrometeorologiche. La fioritura, da cui dipende la fertilità, è senz'altro uno dei fenomeni più interessanti da questo punto vista, dipendendo in modo particolare da luce e temperatura.

1.2 La gemma di vite

La decisione a fiorire è una delle decisioni più importanti che la pianta è chiamata a prendere. Sono molte le sfide che deve sopportare, innanzi tutto devono coordinarsi diversi stimoli ambientali che comunichino ai sistemi interni della pianta che le condizioni esterne sono favorevoli, in secondo luogo la pianta deve disporre di tutte le risorse interne da destinare ai meristemi fiorali in via di sviluppo. La struttura che la vite ha deputato al rinnovo delle sue strutture perenni è la gemma. Le gemme di *Vitis vinifera* sono gemme miste, significa che sia le strutture vegetative, sia le riproduttive si trovano al suo interno, a differenza ad esempio del pesco che porta gemme a legno e gemme a fiore. Lo sviluppo della gemma avviene in due distinte stagioni vegetative (Fig. 1) e l'imposizione di vari stimoli impedisce ad essa di aprirsi prematuramente.

1.2.1 *Paradormienza, endodormienza, ecodormienza*

L'evoluzione della dormienza delle gemme a cui è affidata la riproduzione di molte piante è chiaramente legata alla necessità di far fronte a periodi dell'anno in cui le condizioni di vita sono proibitive per la vita, in particolare l'inverno e il tardo autunno. A questo riguardo è interessante notare come, evolutivamente parlando, la gemma sia apparsa 100-400 milioni di anni prima del seme (Crabbè 1994). Pertanto, quasi tutte le piante superiori hanno sviluppato meccanismi che impongono alle gemme un periodo in cui la crescita è fortemente, se non del tutto, limitata.

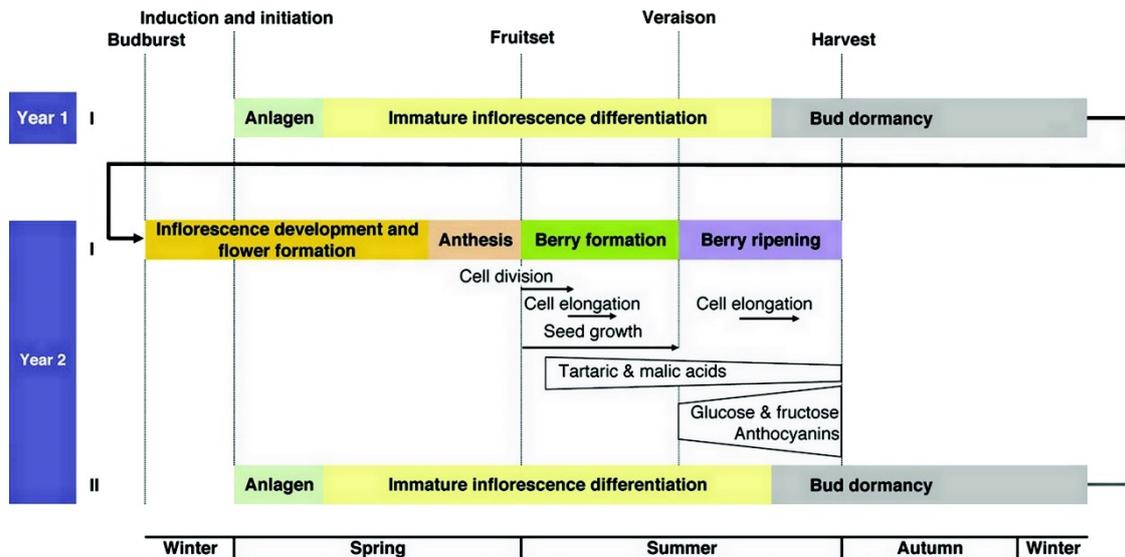


Figura 1: schema dello sviluppo della bacca durante le due stagioni vegetative, (Li Mallet et al., 2015).

Rohde e Bhalerao (2007) suggeriscono quindi una definizione di dormienza: “[definiamo la dormienza] come l’incapacità di avviare la crescita dai meristemi [...] in condizioni favorevoli”. Durante la stagione vegetativa, prima dell'imposizione della dormienza, la gemma subisce un periodo di organogenesi che si estende indicativamente da febbraio ai primi di giugno, la gemma sviluppa quindi due-tre scaglie, sei-dieci primordi fogliari e due-quattro primordi indifferenziati. Questi ultimi daranno origine ai primordi dell'infiorescenza che porterà alla produzione della stagione successiva (Morrison 1991). Dopo la formazione di una-tre infiorescenze, la gemma entra in dormienza. Lang et al (1987) dividono la dormienza in tre fasi distinte chiamate paradormienza, endodormienza ed ecodormienza.

- **Paradormienza:** detta anche inibizione correlata, si riferisce all'inibizione dello sviluppo dei germogli, soprattutto quelli pronti (femminelle), ma non solo, da parte dell'apice meristemico del germoglio che li porta. Numerosi studi hanno dimostrato come l'apice del germoglio sia in grado di esercitare una dominanza apicale nei confronti dei tessuti meristemici portati lungo l'asse del germoglio stesso (Blazkova et al. 1999; Brown et al. 1967). La relativa inibizione può essere rimossa e/o controllata da numerosi fattori, alcuni dei quali sono nelle mani dell'agricoltore. Torregrosa et al. (2012) suggeriscono come la dominanza apicale si instauri su due livelli, il primo vede protagonista il meristema apicale (SAM) del

germoglio principale R, che inibisce l'apertura delle gemme R+1 (*prompt bud*); il secondo livello considera l'inibizione di R+2 (gemma ibernante) da parte di R+1. Si instaura quindi un "gioco di forze" tra i vari apici. Tra i principali segnali che inducono la paradormienza ci sono senza dubbio le auxine. Le quali sono prodotte principalmente da tessuti in rapida crescita come gli apici dei germogli e le foglie giovani (Ljung et al, 2005; 2001). È proprio il trasporto basipeto di questo ormone che viene generalmente accettato come responsabile della paradormienza (Tamas 1987; Cline 1994).

- **Endodormienza:** con l'avanzare della stagione vegetativa, i germogli, verso la fine dell'estate, vanno incontro ad agostamento, trasformandosi da germogli a tralci, tipicamente di colore più scuro giallo-marrone. In questa fase muoiono gli apici vegetativi e le foglie verdi, eliminando di fatto i segnali di dominanza apicale che impedivano l'apertura dei germogli. Con l'avvicinarsi di condizioni ambientali sfavorevoli alla vita, è necessario che nuovi segnali impediscano alla gemma di germogliare. Come suggerisce il nome, questi segnali provengono dalla gemma ibernante stessa. L'endodormienza è indotta principalmente dall'accorciamento del fotoperiodo e dall'abbassamento delle temperature (Horwath et al, 2003; Kühn et al, 2009; Pérez e Vergara, 2011; Grant et al, 2013; Cragin et al, 2017). Si ritiene che nel mantenimento dell'endodormienza agiscano vari segnali ormonali di cui il principale sarebbe l'acido Abscissico (ABA). Rinne e colleghi (2011) hanno evidenziato come un periodo freddo sia necessario per l'uscita dall'endodormienza. Emmerson e Powell già nel 1978 avevano riscontrato che i livelli di ABA diminuivano all'interno delle gemme della vite con l'accumulo delle ore di freddo, studi simili furono effettuati anche sul melo, confermando questa ipotesi (Powell, 1986). La vite necessita di 50-400 ore di freddo (a seconda della cultivar) ad una temperatura inferiore a 7 °C (Pouget, 1963), ad esempio il Merlot, oggetto della presente tesi, richiede almeno sette giorni consecutivi con temperature inferiori a 10 °C (Pouget, 1988).
- **Ecodormienza:** nota anche come post-dormienza o quiescenza. Il fabbisogno di freddo della vite è relativamente basso rispetto ad altre specie come il pesco o il

melo (Lavee & May, 1997; Dookozlian, 1999), è quindi facile comprendere come l'endodormienza venga rapidamente superata esponendo la vite alle fredde temperature invernali potenzialmente letali in arrivo. Per far fronte a questo problema la vite ha evoluto il sistema dell'ecodormienza, ovvero una situazione di blocco o rallentamento della crescita dovuta a condizioni climatiche avverse. Una volta rimosse queste condizioni, la gemma sarà libera di schiudere. La fine della dormienza sarà segnata da un repentino aumento della respirazione e del contenuto di acqua all'interno della gemma, contemporaneamente vengono ripristinate anche le connessioni vascolari con il resto della pianta (Keller 2015, da verificare). Se per la levata dell'endodormienza è necessario soddisfare un certo fabbisogno di freddo, per la fine dell'ecodormienza è invece necessario che la pianta accumuli ore di caldo definite "fabbisogno termico" (Park & Park 2019). Sono stati ideati numerosi modelli per il calcolo delle ore di freddo necessarie per l'uscita dall'endodormienza (Erez et al, 1990; Fishmann et al, 1987; Richardson et al, 1974); anche lo studio di modelli per il calcolo del fabbisogno di calore è stato implementato negli anni (Snyder, 1985; Andreson et al, 1986). L'applicazione di questi modelli permette di prevedere entro certi limiti la data di germogliamento al termine del periodo di ecodormienza (Pouget, 1988).

1.2.2 Organomorfogenesi della gemma

Le gemme sono normalmente portate all'ascella delle foglie. Lo sviluppo della gemma dormiente (o gemma d'inverno) inizia circa 3-4 settimane prima che il germoglio che la porta emerga dalla struttura gemmaria formatasi durante la stagione precedente (Morrison 1991). In corrispondenza di ogni nodo ci sono vari complessi meristemati: il primo darà origine alla gemma pronta, la quale può prendere diversi nomi a seconda degli autori, che produrrà nella stessa stagione della sua origine una gemma anticipata chiamata femminella (o *summer lateral*) che può essere fertile oppure no. Separata da questa struttura ma nello stesso nodo è presente la gemma ibernante composta (gemma d'inverno o gemma latente), (Vasconcelos et al 2009, May 2000). Quest'ultima struttura può essere a sua volta formata da almeno tre meristemi di diversa grandezza, il più grande darà origine alla gemma primaria (gemma di secondo ordine, gemma

svernante, gemma dormiente o gemma latente), la struttura che formerà l'infiorescenza l'anno successivo. Ci sono anche almeno un altro paio di meristemi più piccoli che daranno origine a gemme secondarie e terziarie, gemme di terzo ordine, le quali tendenzialmente non si schiuderanno a meno che la gemma primaria non sia danneggiata per qualsiasi motivo (Lavee and May 1997; May 2000). Queste gemme, a seconda della stagione o della cultivar, possono o non possono portare infiorescenze. Bugnon e Bessis (1968) hanno trovato un modo di classificare questi organi per capire la loro gerarchia (Fig. 2): R0 rappresenta il germoglio primario che porta le gemme, R+1 è la struttura che darà origine alla femminella, R+2 è la gemma latente che normalmente e sotto condizioni normali produrrà il germoglio destinato a portare i grappoli la stagione seguente. R+3 costituisce tutte le altre gemme ed in qualche maniera rappresenta una sorta di piano di emergenza nel caso R+2 per qualsiasi ragione non si schiuda, (Figura 1). Anche se la gemma pronta si sviluppa come un'appendice di R+1 essa dipende da R0 per il suo nutrimento, infatti lo xilema di questa porta direttamente a R0 e non a R+1 (Pratt, 1974). R+2 prima del rilascio del primo primordio florale, sviluppa una o più brattee, sull'asse nel quale si svilupperanno R+3-1, R+3-2, ecc. (Srinivasan & Mullins, 1981). A differenza di R+2, queste ultime classi di gemme svilupperanno principalmente solo primordi fogliari.

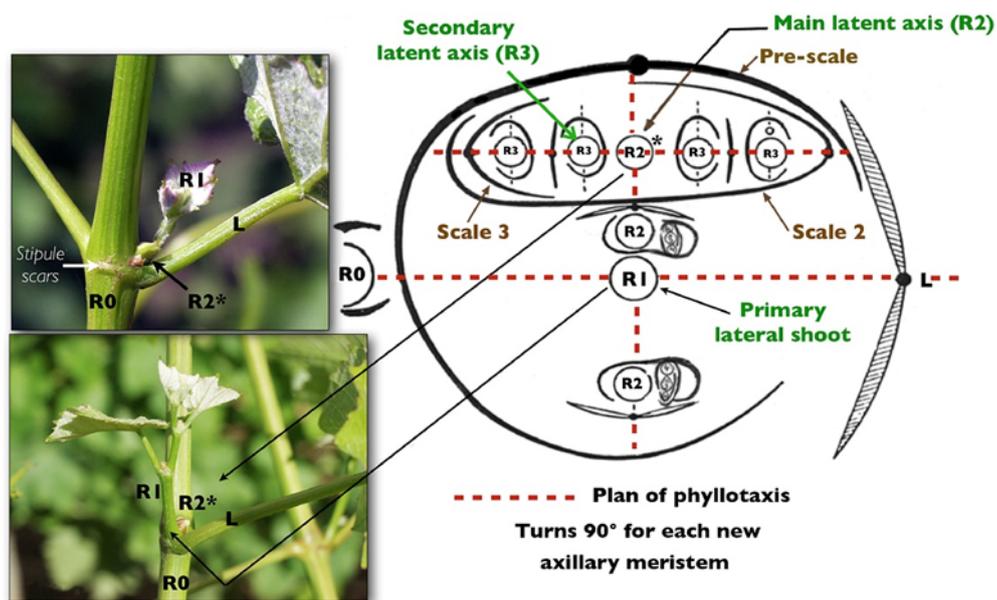


Figura 2: Organizzazione del complesso gemmario portato all'ascella delle foglie in *Vitis vinifera*. Torregrosa et al., 2021

Verrà ora descritto il ciclo di sviluppo della gemma R+2, la gemma ibernante, che darà origine, durante stagione successiva, all'infiorescenza.

Il meristema produce il primo primordio fogliare (PF) intorno a maggio, il quale ha una caratteristica forma appuntita riconoscibile al microscopio. Lo sviluppo di questi primordi è acropeto con fillotassi distica (Srinivasan & Mullins, 1976), ovvero le più giovani sono più piccole rispetto a quelle formatesi in precedenza. Molto presto nello sviluppo del PF, al di sotto di esso, si creano delle squame che però vedono il loro sviluppo arrestarsi prematuramente per diventare strutture sclerificate atte a proteggere il tessuto in formazione. I primi due o tre PF crescono rapidamente, incorporando la struttura che successivamente si formerà, la quale crescerà lentamente per poi fermarsi al momento dell'imposizione dell'ecodormienza attorno a settembre-ottobre.

Il meristema apicale durante la prima stagione darà origine a 6-10 primordi fogliari ed a 1-3 infiorescenze primordiali (IP), (Morrison 1991), dopo la formazione di quest'ultimo la gemma entra, appunto, in dormienza (Pratt, 1971).

Lo sviluppo del germoglio all'interno della gemma vede il ripetersi di uno specifico pattern: N0, N1, N2 (Carbonneau, 1976; Huglin & Schneider, 1998; Gerrath et al, 2001). N0 si riferisce ad un nodo che non porta né primordi fiorali né viticci; i due sono organi omologhi in quanto provengono dalle stesse strutture meristematiche. N1 è un nodo che porta un grappolo o un viticcio, come N2. Questo schema si ripete su tutto l'asse del germoglio. Tuttavia, ci sono delle eccezioni: i nodi prossimali, (formati prima all'interno del germoglio), raramente portano infiorescenze primordiali o viticci, ma dipende dalla cultivar; ci sono varietà dove non sono presenti tracce di grappoli fino al sesto o settimo nodo. Tuttavia, dopo questi nodi sterili, il già citato modello N0-N1-N2 si stabilisce e durerà per tutta la durata del ciclo vegetativo (Fig. 3).

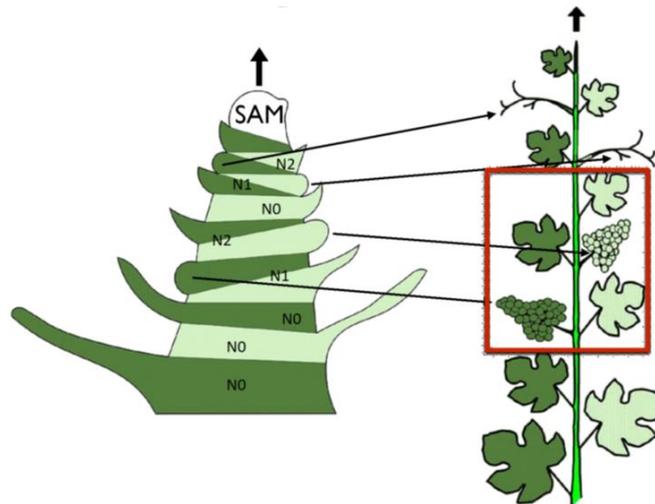


Figura 3: esemplificazione del modello N0-N1-N2 che si ripete lungo l'asse del germoglio, modificato da Carmona et al., 2002.

Già negli anni '30 Barnard (1932) e Barnard & Thomas (1933) divisero il processo di formazione dei fiori in tre fasi distinte (Fig. 4):

1. Formazione dell'*Anlagen*: è una formazione meristemica tondeggiante, facilmente distinguibile dai primordi fogliari, i quali hanno tipicamente una forma più appuntita;
2. Formazione dell'infiorescenza primordiale: l'*Anlagen* subisce diversi eventi di ramificazione per formare la struttura del grappolo;
3. Differenziazione dei fiori: in questa fase si formano tutte le strutture caratteristiche del fiore, petali, sepali, stami e pistilli.

I primi due si verificano durante la prima stagione di sviluppo, l'ultimo avviene nei primi mesi dopo la ripresa vegetativa, quando viene rimossa l'ecodormienza, poco prima e immediatamente dopo il germogliamento. Lo sviluppo dell'*Anlagen* inizia con la formazione di una brattea nella porzione distale dello stesso (Srinivasan & Mullins, 1981; Winkler & Shemsettin, 1937). La fase successiva vede l'*Anlagen* diviso in due parti chiamate "braccia" (*arms*), una prima (braccio interno, in figura *inner arm*) di dimensioni maggiori, vicino all'apice, e una più piccola (*braccio esterno, outer arm*), appena sopra la brattea (Pratt, 1971; Srinivasan & Mullins, 1976). Entrambi i bracci subiranno ulteriori ramificazioni che porteranno alla formazione di un "primordio globulare ramificato"

(Scholefield & Ward, 1975). La classica forma conica del grappolo è data dal fatto che il grado di ramificazione del braccio interno è maggiore verso la porzione prossimale e minore verso quella distale. Una volta terminato questo fenomeno, la gemma tende ad entrare in dormienza.

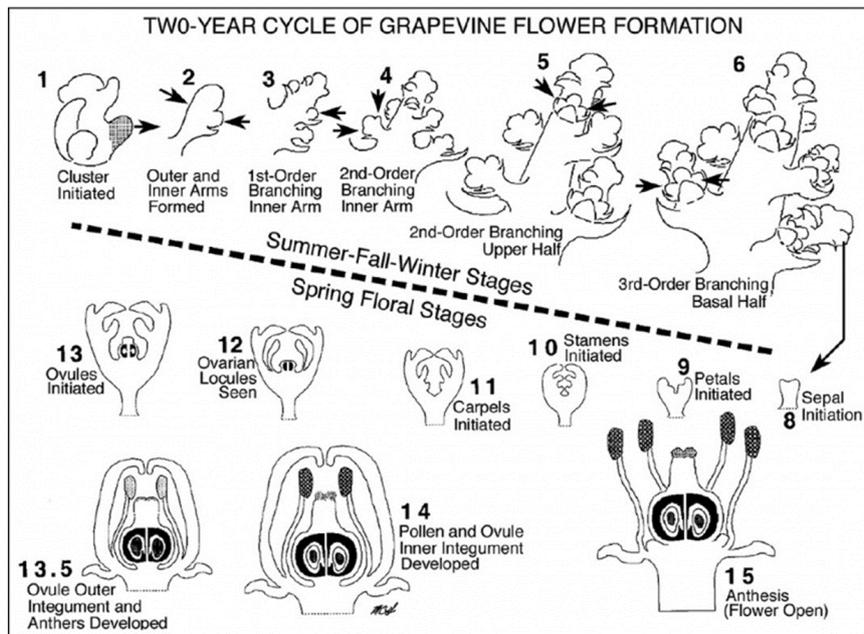


Figura 4: formazione degli organi fiorali durante le due stagioni vegetative.

La formazione dell'infiorescenza vera e propria avviene all'inizio della ripresa della stagione vegetativa (Williams, 2000), l'attività dei meristemi riprende la sua attività circa una settimana prima del germogliamento (May, 2000; Vasconcelos et al, 2009). La ramificazione dei primordi dell'infiorescenza riprende e continua per un paio di settimane dopo il risveglio della dormienza (Bernard e Chaliès, 1987).

L'inizio dei primordi del fiore avviene in tempi relativamente brevi: Tourmeau (1976) riferisce che questo periodo è inferiore a due settimane. Si ritiene generalmente che gli Anlagen che si sviluppano dopo la dormienza invernale non abbiano subito ramificazioni importanti e non diano origine a fiori ma a viticci (Vasconcelos et al, 2009). A questo proposito Cheema e colleghi (1996) hanno evidenziato come il livello di differenziazione dei fiori lungo l'asse del tralcio diminuisce dalla base verso l'apice.

1.3 Fattori che influenzano la fertilità

Vi sono numerosi fattori che possono influire sulla fertilità delle gemme di vite (Fig. 5), in questa sede prenderemo in esame i principali, in relazione anche al cambiamento climatico che sempre più desta preoccupazione negli studiosi di tutto il mondo. Con il termine “fertilità” di solito ci si riferisce ad una misura quantitativa del potenziale di produrre frutti da parte della vite (Sommer, Islam & Clinegeleffer, 2000). Questo valore può essere stimato prima del germogliamento sezionando la gemma sotto il microscopio, contando il numero di grappolini all’interno di ogni gemma, questo valore è a volte indicato come “fertilità potenziale”. Un sistema alternativo per valutare la fertilità cosiddetta “reale” del germoglio consiste nel prelevarne un numero rappresentativo una volta che il fabbisogno di freddo è stato soddisfatto, li si induce poi a germogliare tramite la somministrazione di luce e temperatura ottimali, la fertilità si può valutare andando a contare i grappoli formati. La fertilità generalmente dipende dalle interazioni tra genotipo, ambiente e pratiche culturali (Boss and Thomas, 2000). Un germoglio è considerato fertile quando porta almeno un abbozzo di grappolo (Antcliff & Webster, 1955).

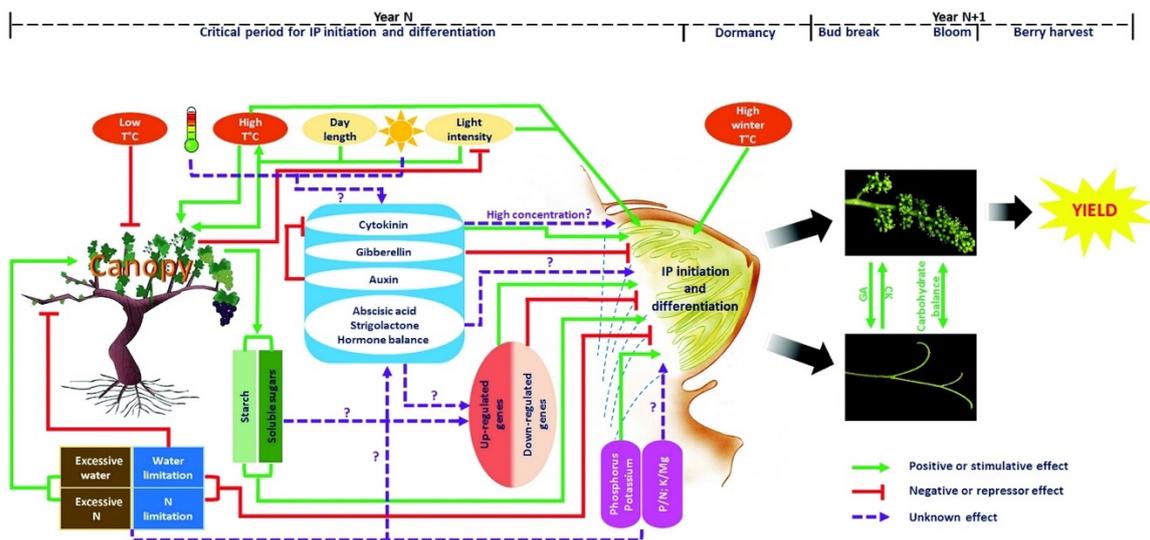


Figura 5: complessa rete di segnali esogeni ed endogeni che sono in grado di influenzare positivamente o negativamente l'induzione a fiore, (Li Mallet et al., 2015).

1.3.1 Luce

La vite è una pianta longigiurna opzionale, che non necessita di giornate lunghe per essere indotta a fiore, come succede per altre specie arboree. Nonostante questo, il ruolo della luce nella formazione fiorale è fondamentale tanto quanto il ruolo della temperatura (Li-Mallet et al, 2016; Meneghetti et al, 2006; Vasconcelos et al, 2009; Srinivasan & Mullins, 1981). L'ipotesi che la luce sia collegata all'intensità della fioritura e quindi alla fertilità, risale da Antcliff & Webster (1955), a cui sono seguiti determinati studi condotti da loro sulla varietà di uva varietà "Sultana". Molti studi a questo proposito in vite hanno mostrato come coprendo le piante dalla luce vi fosse una riduzione della fioritura durante la prima stagione di formazione delle gemme (Baldwin, 1964; Alleweldt & Hofàcker, 1975; Dry, 2000). Vasconcelos et al, (2009) inoltre sostengono come la temperatura agisca sinergicamente con l'intensità luminosa.

La luce è in grado di influenzare la velocità di fotosintesi della pianta attraverso la disponibilità dei carboidrati (Vasconcelos et al, 2009). La distribuzione dei fotosintetati all'interno della pianta segue la teoria del "flusso di massa sotto pressione" ideata da Ernst Munch nel 1930, dove si avvale del concetto di *sink and source*. Durante il loro sviluppo, le gemme sono inizialmente deboli *sink* per i carboidrati poiché devono competere con l'apice dei germogli in fase di crescita attiva (Hale & Weaver, 1962), i meristemi della gemma ricevono i carboidrati di cui hanno bisogno dalle foglie che si trovano dallo stesso lato del germoglio, ed esse esportano gli assimilati sia in direzione basipeta che acropeta. In questo caso, però, è l'apice del germoglio il destinatario della maggior parte dei fotosintetati (Hale & Weaver, 1962). A questo proposito, i germogli che sono posizionati all'interno della chioma risultano meno fertili di quelli che si trovano verso l'esterno e che quindi ricevono più illuminazione (May et al, 1976; Morgan et al, 1985). Per quanto riguarda il periodo più critico per l'induzione dei primordi fiorali, può essere identificato verso la fine della primavera (Srinivasan & Mullins, 1981), infatti esperimenti condotti ombreggiando le gemme in questo periodo hanno mostrato una riduzione marcata della fertilità.

1.3.2 *Temperatura*

È ben noto che le alte temperature sono necessarie per la formazione delle infiorescenze all'interno del germoglio della vite (Alleweldt, 1963; Baldwin, 1964; Buttrose, 1974; Zelleke & Kliewer, 1979; Dunn & Martin, 2000; Petrie & Clinegeleffer, 2005). Uno studio condotto in camera di crescita su Moscato d'Alessandria, valutando la fertilità delle gemme, ha evidenziato come, con un incremento delle temperature da 0°C a circa 35°C, induca un aumento della fertilità per poi decrescere con l'aumento ulteriore della temperatura dell'aria (Buttrose, 1969). Altri studi evidenziano che temperature sopra i 20°C sono sufficienti per avere un effetto induttivo, anche se potrebbero esserci differenze tra le diverse cultivar e le diverse aree geografiche (Buttrose, 1970; Dunn & Martin 2000; Kasimatis et al, 1975; Moncur et al, 1989; Zelleke et Kliewer, 1979). La fertilità delle gemme è strettamente collegata alla temperatura dal momento che la prima foglia del germoglio che la porta raggiunge 1.5 cm di diametro e i primi tre nodi sono visibili. In particolare, sembra esserci un legame positivo tra le temperature medie di metà luglio e il numero medio di infiorescenze per gemma (Alleweldt, 1963), inoltre Baldwin (1964) riporta che la gemma è più suscettibile alle temperature durante le fasi 5-7 dello sviluppo, secondo Eichorn & Lorenz. Una esposizione di sole quattro ore al giorno (o notte) a temperature sotto i 30° C sono sufficienti ad avere una massima fertilità (Srinivasan & Mullins, 1981). Il momento critico dove la temperatura è fondamentale per la fertilità è circa tre settimane prima della formazione dei primordi fiorali nelle gemme latenti (Buttrose, 1969; 1970).

1.3.3 *Stato Idrico*

Hsiao nel suo celebre studio "*Plant Responses to Water Deficits, Water-Use Efficiency, and Drought Resistance*" (1975) ha evidenziato gli effetti che lo stress idrico può avere sulle piante. La disponibilità di acqua influenza la fertilità ad almeno due livelli: direttamente, essendo correlata all'espansione ed accrescimento cellulare ed indirettamente coinvolgendo la produzione di carboidrati (fotosintesi), il sistema ormonale e l'*uptake* di nutrienti, (Lovyes and Kriedemann, 1973; Dry and Lovyes, 1998; Srinivasan and Mullins, 1978; 1979; 1980). Il deficit idrico può anche compromettere il processo di crescita dei germogli e se lo stress è tanto elevato può influenzare la

differenziazione dei primordi dell'infiorescenza (Vaadia and Kasimatis, 1961; Buttrose, 1974). Il periodo durante il quale la pianta è maggiormente sensibile allo stress è senza dubbio l'inizio della prima stagione di sviluppo della gemma, in cui avvengono divisione ed espansione cellulare dei meristemi. Ci sono diversi studi che dimostrano come uno stress idrico anticipato è più inibitorio a livello di fertilità rispetto ad uno ritardato (Matthewes and Anderson, 1989; Myburg, 2003). Oltretutto uno stress di inizio stagione può avere effetti sulle dimensioni delle bacche, e se persiste per un lungo periodo, la fertilità delle gemme è affetta da una diminuzione drastica del numero e dimensioni delle infiorescenze primordiali (Alleweldt and Hofacker, 1975; Buttrose, 1974; Winkler et al, 1974). Uno stress idrico durante il germogliamento può ridurre la crescita vegetativa e può portare oltretutto ad un germogliamento irregolare. (Van Zyl, 1984; Wample, 1997). Hardie e Considine (1976), hanno evidenziato come un leggero stress idrico (da -0.1 a -0.3 Mpa) durante la prima stagione possa portare ad una riduzione del rendimento di circa il 40%. Bisogna sottolineare però che altri studi svolti da Smart et al (1990) hanno evidenziato come uno stress idrico possa addirittura aumentare la fertilità delle gemme, poiché una pianta soggetta a stress idrico ha una chioma ridotta; quindi, l'illuminazione che ricevono le gemme è più elevata; questo è stato anche riportato da May nel 1965. Il deficit idrico può anche compromettere l'equilibrio ormonale: sotto stress idrico una riduzione del contenuto di citochinine è stato osservato a livello della linfa xilematica (Livne and Vaadia, 1972), parallelamente ad un incremento di acido abscissico nelle foglie e negli steli (Düring and Alleweldt, 1973; Loveys and Kriedeman, 1973). L'acqua è quindi senza dubbio un fattore che può influenzare la fertilità delle gemme, Matthews and Anderson (1989) affermano che la disponibilità idrica deve essere in quantità sufficiente ma non eccessiva. L'irrigazione può essere utile solo per garantire la giusta quantità di acqua in annate in cui il clima ed altri fattori non consentono una buona prospettiva per quanto riguarda la fertilità delle piante.

1.3.4 Disponibilità di carboidrati

Sicuramente una buona induzione fiorale ed un buono sviluppo richiedono una giusta quantità di carboidrati (Caspari, 1998). La fisiologia dei carboidrati e lo stato nutrizionale

della pianta, soprattutto durante il processo di induzione fiorale, possono determinare il numero di grappoli durante la prima stagione di sviluppo della gemma (Candolfi, Vasconcelos and Koblet, 1990). Blanke (1990) ha calcolato che ogni fiore di vite necessita, dal momento dell'evocazione fiorale all'antesi, di 2 mg di zuccheri, che corrispondono a 37,6 J di energia. I carboidrati intervengono nelle tre fasi principali dello sviluppo del frutto: inizio dell'infiorescenza nel primo anno, emergenza dei fiori e la meiosi che porta ai gameti all'inizio del secondo anno (Lebon et al, 2008). Durante il ciclo annuale della vite, ci sono diversi organi che possono accumulare, o rilasciare, le riserve di zuccheri ottenute con la fotosintesi. È noto che le piante immagazzinano l'amido negli organi legnosi, durante la dormienza invernale, nella vite l'amido è localizzato prevalentemente nei raggi del parenchima delle radici (Zapata et al, 2004). Durante la primavera, quando la temperatura del suolo raggiunge i 10-12°C, il metabolismo della vite viene ripristinato e l'amido immagazzinato nella stagione precedente viene mobilitato (Huglin, 1986; Bates et al, 2002). È interessante notare che questa mobilitazione delle riserve dura fino all'antesi (Zapata et al, 2003). Durante le prime settimane dopo il germogliamento, l'unica fonte di carbonio ed energia per lo sviluppo dell'infiorescenza è l'amido immagazzinato negli organi legnosi (Winkler and Williams, 1938; Eifert et al, 1960; Bouard, 1966; Mullins et al, 1992; Huglin and Shneider, 1998). Questa riserva di amido assicura l'alimentazione all'infiorescenza ed agli altri organi in via di sviluppo fino alla fioritura. (Yang et al, 1980; Candolfi-Vasconcelos et al, 1994; Caspari et al, 1998). Bennet et al, (2002) hanno mostrato come esiste una correlazione positiva tra le riserve di amido negli organi legnosi all'apertura delle gemme ed il numero di fiori in ciascuna infiorescenza. Durante il resto della stagione tali riserve vengono ripristinate negli organi annuali (Bates et al, 2002) e perenni (Mullins et al, 1992; Zapata et al, 2004); questo processo di rinnovamento delle riserve procede dalla fecondazione fino alle prime fasi di maturazione delle bacche (Candolfi-Vasconcelos et al, 1994; Caspari et al, 1998).

In tutte le piante legnose i meristemi vegetativi e riproduttivi competono per le risorse che provengono dalla fotosintesi o dalla mobilitazione dell'amido (Wardlaw, 1990). Per quanto riguarda la fotosintesi, le foglie non esportano i carboidrati da loro prodotti fino

al raggiungimento di un terzo della loro dimensione finale (Koblet, 1969; Alleweldt et al, 1982; Petrie et al, 2000; Stoev, 1952; Hale and Weaver, 1962). Nella vite questa competizione tra organi può compromettere l'allegagione; infatti, tramite determinate pratiche agronomiche, ad esempio la piegatura del tralcio, si può favorire la fertilità (Coombe, 1962; Koblet, 1966; Smithyman et al, 1998; Vasconcelos and Castagnoli, 2000). È noto che le infiorescenze in via di sviluppo hanno limitate possibilità di attrarre assimilati a causa delle loro piccole dimensioni rispetto alle foglie (Mullins et al, 1992). È fondamentale identificare le possibili fonti di carboidrati che contribuiscono al processo di formazione dei fiori. La prima fonte di carboidrati ovviamente è, durante la prima stagione la foglia, all'inizio della seconda stagione l'unica fonte di carbonio e di energia sono le riserve di amido immagazzinate durante la prima stagione, man mano che la crescita continua la fonte è rappresentata nuovamente dalla fotosintesi (Lebon et al, 2008). Indubbiamente i carboidrati sono fondamentali per il processo riproduttivo della vite, oltretutto perché possono partecipare alla regolazione di numerosi geni, compresi quelli coinvolti nel processo di fioritura (Koch, 1996; Roldan et al, 1999; Ohto et al, 2001; Gibson et al, 2005).

1.4 Il controllo ormonale della fioritura

È ben noto che gli ormoni possano influenzare ogni aspetto della vita di una pianta. La fioritura e la fertilità non sono da meno. Effettivamente i fattori esogeni citati nei paragrafi precedenti agiscono sulla pianta modificando proprio l'equilibrio ormonale (Steward, 1976). Zeevart (1976) ha concluso, dopo i suoi studi, che per la formazione dei fiori sia necessario uno specifico equilibrio ormonale. È stato difficile affrontare lo studio degli ormoni coinvolti nello sviluppo dell'infiorescenza in *Vitis* a causa delle difficoltà riscontrate nel reperire campioni di tessuto dai meristemi coinvolti date le loro piccolissime dimensioni. Nonostante ciò, ad oggi sono note diverse informazioni che sono riportate di seguito.

- **Gibberelline:** le Gibberelline (GAs) e le Citochinine (CKs) sono ormoni essenziali coinvolti durante il processo di fioritura (Li-Mallet et al., 2015). Le GAs sono conosciute per stimolare le piante alla fioritura sotto condizioni non induttive

(Zeevart, 1961). Tuttavia, in vite vi sono diverse prove che evidenziano come le GAs agiscano da inibitori della fioritura (Alleweltdt, 1961). Nonostante ciò, il ruolo delle gibberelline nella formazione dell'*Anlagen* è ben documentato: quest'ultime sono richieste durante la formazione degli assi fiorali e durante la fase successiva: lo stadio a due ramificazioni del meristema florale. Quindi, il ruolo delle GA nel processo dell'induzione a fiore in *Vitis* è duplice a seconda dello stadio di sviluppo del germoglio. Nella fase iniziale le gibberelline sono promotrici della fioritura perché la formazione dell'*Anlagen* richiede GA, successivamente essendo le gibberelline promotrici della crescita vegetativa agiscono come inibitori spingendo il meristema a formare viticci invece di fiori (Vasconcelos et al, 2009). A sostegno di ciò, le piante trattate con Clorquemat, un ritardante della crescita, vengono portate a formare infiorescenze al posto di viticci (Srinivasan and Mullins, 1980). Il Clorquemat è un inibitore della sintesi delle GA (Lang, 1970). Inoltre, nei viticci sono stati individuati livelli di gibberelline più alti rispetto agli altri organi (Monakov, 1976). La *Vitis vinifera* è molto sensibile alle applicazioni esogene di GAs (Srinivasan and Kessler, 1975; Weaver and McCune, 1959), ed un'applicazione di gibberelline determina la trasformazione delle infiorescenze in viticci o strutture simili a viticci (Monakov, 1976; Moore, 1970). Srinivasan e Mullins (1980) hanno scoperto che applicazioni di GA3 o di GA4+GA7, a basse concentrazioni (3 μ mol/L) possono indurre il germogliamento della gemma latente nella stagione in corso ed inibire la formazione di infiorescenze.

- **Citochine:** come per le gibberelline, il ruolo delle citochinine nel controllo della fioritura in *Vitis vinifera* è ben documentato (Mullins, 1992b; Srinivasan and Mullins, 1978; 1979; 1980a; 1981a; 1981b). Questi autori hanno indotto lo sviluppo dell'infiorescenza al posto di viticci con un trattamento di CK. È interessante notare che la conversione da viticcio ad infiorescenza avviene nei meristemi ma può avvenire anche in viticci giovani che mostrano una morfologia tipica (Mullins et al, 1992). L'applicazione simultanea di Clorquemat e CK nei viticci può portare ad una prolifica formazione di fiori (Srinivasan and Mullins,

mediata da geni dell'identità dell'organo florale: in questo modo il meristema specifica i vari tessuti che costituiscono il fiore (Krizek e Fletcher, 2005).

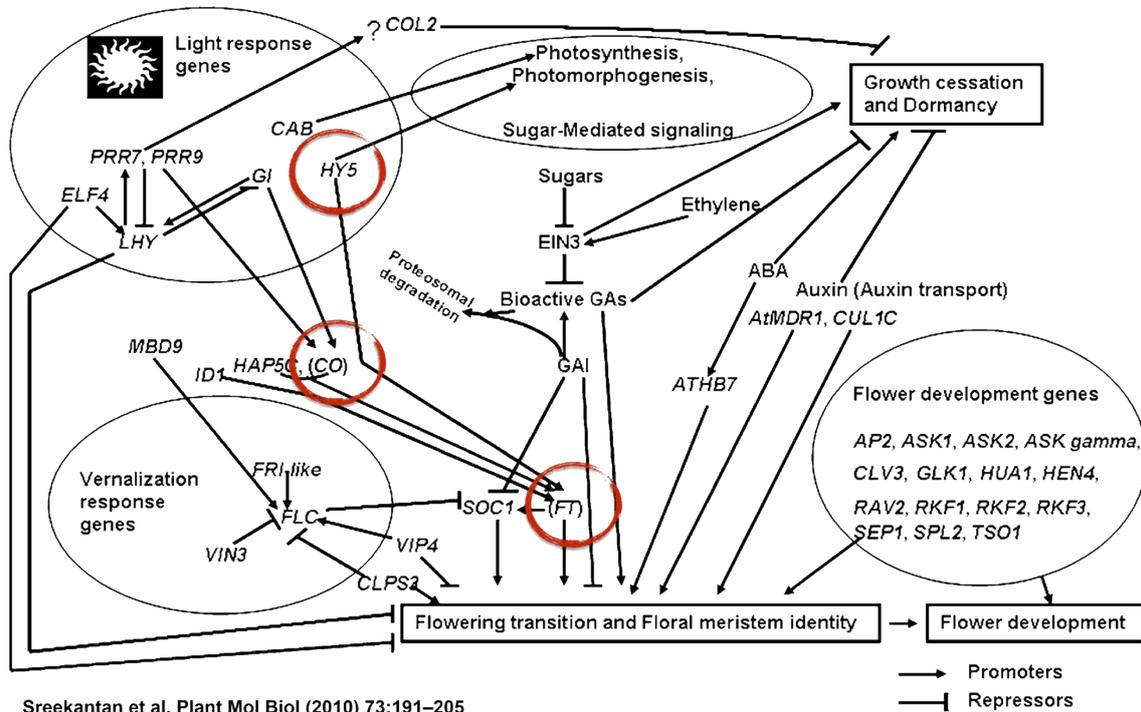


Figura 7: rappresentazione schematica della complessa rete di segnali molecolari che si instaura durante i processi di induzione florale e sviluppo dell'Anlagen in *Vitis vinifera*, (Sreekantan et al., 2010).

La Figura 7 mostra la complessa rete di segnali molecolari che la pianta deve coordinare per poter andare a fiore. Si noti il ruolo centrale di *FT* (*Flowering Locus T*, il cosiddetto florigeno) e di *CO* (*CONSTANS*). Sono stati caratterizzati due omologhi del gene *CO* di *Arabidopsis*: *VvCO* e *VvCOL* (*CONSTANS-like*) (Almada et al., 2009). Entrambi i geni mostrano una peculiare espressione nel tempo con un picco all'alba. Questo è in accordo con i modelli già noti di *Arabidopsis*, dove l'espressione di *AtCO* è regolata dai geni dell'orologio circadiano (Greenham et McClung, 2015). Il gene *CONSTANS* (*CO*) codifica per un fattore di trascrizione (TF) del tipo *zinc-finger*. Questo TF sembra essere importante per la regolazione della fioritura indotta dalla lunghezza del giorno. Il fatto che questo gene sia sotto il controllo dell'orologio circadiano determina un'oscillazione dei suoi livelli di espressione durante il giorno. In condizioni induttive la fioritura *CO* è in grado di andare a riprogrammare la trascrizione favorendo la produzione del gene *FT*, altro fondamentale promotore florale. Almada et al., 2009, hanno identificato come la

maggior produzione di *VvCO* e *VvCOL* avvenga all'interno delle foglie, ciò non sorprende in quanto le foglie più di ogni altro organo sono suscettibili di avvertire variazioni del fotoperiodo e/o dell'intensità luminosa. Una volta che i geni dell'orologio si sono sincronizzati e *CO* è libero di svolgere i suoi scopi si ha la produzione di *FT* a valle di *CO* (Samach et al, 2000), ciò avviene sempre all'interno delle foglie e più precisamente nelle cellule compagne del floema. *FT* prodotto su stimolo di *CO* viene quindi caricato nel floema dalle cellule compagne attraverso dei meccanismi di trasporto non ancora chiariti (Turck et al, 2008), da qui viene traslocato fino al SAM attraverso i plasmodesmi. È lecito ipotizzare la presenza di altre molecole che possono fungere da carrier per *FT*, ma finora non sono state identificate.

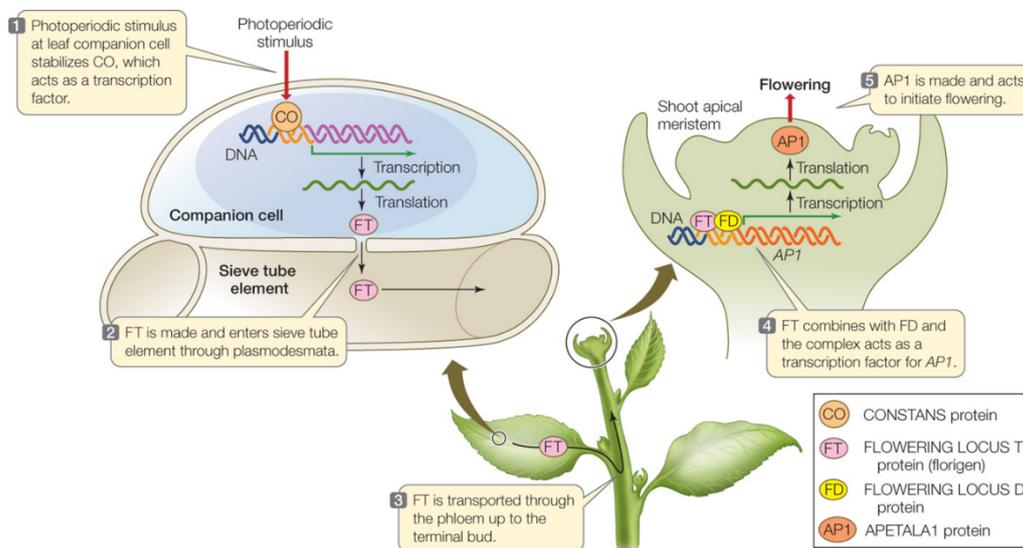


Figura 8: interazione tra FT e FD durante il processo di induzione a fiore nell'apice meristematico (SAM).

La proteina FT, tuttavia, non possiede all'interno della sua struttura domini conosciuti per legare il DNA; pertanto, essa dovrà essere in grado di interagire con altre proteine per originare una qualche risposta fisiologica. Questa proteina è stata riconosciuta essere un fattore di trascrizione di tipo bZIP. Una volta giunto all'interno del SAM, FT in effetti interagisce con la proteina FD (*Flowering Locus D*). L'mRNA di FD è stato trovato in grandi quantità proprio nel SAM suggerendo che questo sia il sito principale per la sua produzione. FD è in grado di formare con FT un eterodimero capace di interagire con i geni determinanti l'identità fiorale come AP1 e FRUITFUL (FUL). FD quindi, in presenza

di FT, è stato dimostrato essere in grado di attivare i geni di identità florale del meristema, (Fig. 8), (Wigge et al, 2005).

Una volta che il complesso formato da FT ed FD è in grado di agire, esso, a livello del meristema, coordina la trascrizione di altri geni, alcuni dei quali sono stati identificati in *Arabidopsis* sebbene molti progressi debbano ancora essere fatti per quanto riguarda la *Vitis vinifera*. I principali sono i seguenti: AtTFL1: è un repressore della risposta alla fioritura, agisce agonisticamente a LEAFY e contribuisce a mantenere l'identità del meristema, AtLEAFY (abbreviato LFY) è coinvolto nel passaggio dal meristema vegetativo alla modalità riproduttiva, mentre AtAP1 è coinvolto nello sviluppo dei meristemi floreali, infine AtFUL agisce in modo ridondante con AP1 nella specificazione del meristema florale ed è coinvolto anche nel normale sviluppo del frutto. In particolare, LEAFY è un gene che fa sì che i meristemi si sviluppino in fiori invece che in foglie con germogli associati, è coinvolto nell'identità del meristema floreale, codifica un fattore di trascrizione specifico della pianta e si trova in tutte le piante terrestri. Quando il gene è sovraespresso, la pianta è meno sensibile ai segnali ambientali e fiorisce prima.

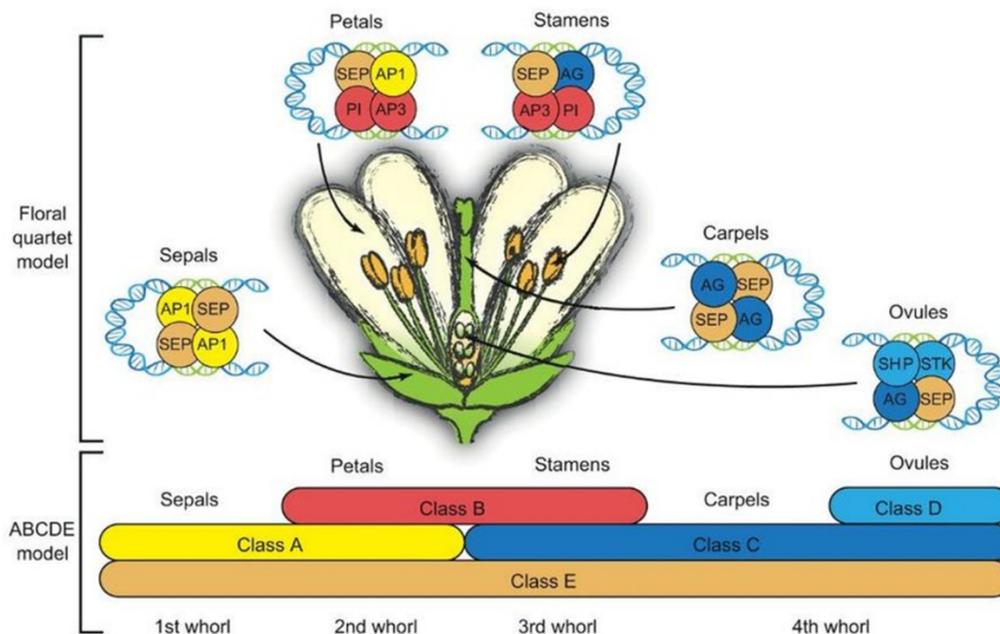


Figura 9: modello ABCDE in *Arabidopsis thaliana*, Couto and Amorim, 2019.

Per quanto riguarda i geni che esprimono l'identità dei vari organi floreali comunemente si fa riferimento al modello ABCDE mostrato nella figura 9. Si tratta di un modello ben

studiato in piante modello, sfortunatamente anche in questo caso meno conosciuto è quanto accade in *Vitis vinifera*.

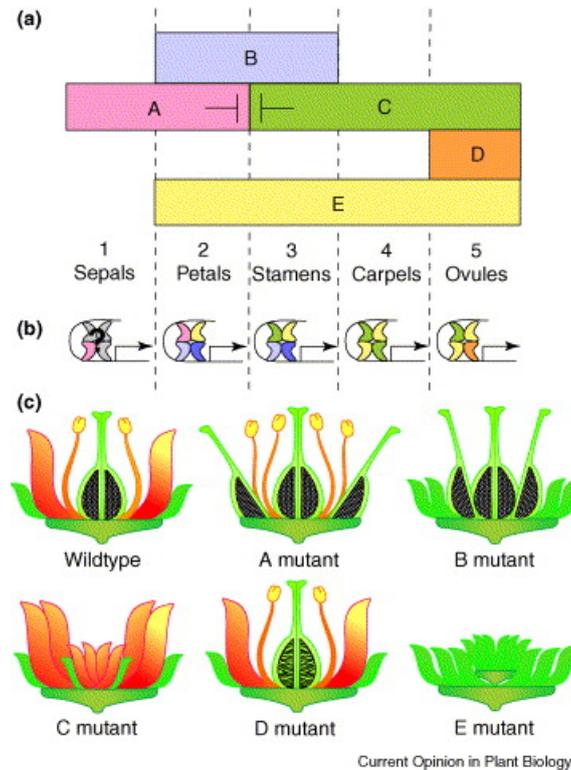


Figura 10: effetto di mutazioni knockout sul fenotipo florale. Wildtype indica un fiore senza mutazioni, il mutante A, risulta privo di sepali e petali, il mutante B è privo di petali e stami, il C è privo di stami, carpelli e ovuli, il D invece manca degli ovuli, mentre un mutante E, risulta privo di ogni struttura tranne che dei sepali, (Ferrario et al., 2004).

Sono stati identificati almeno diciotto geni ABCDE rappresentativi della vite, i quali codificano per fattori di trascrizione che a loro volta regolano l'espressione di altri geni a valle che esplicitano appunto l'identità degli organi corrispondenti ai vari verticilli: sepali, petali, stami, carpelli e ovuli. Questo sistema funziona grazie alla formazione di tetrameri in grado di legarsi al DNA, agendo da fattori di trascrizione. Come si può notare in figura 9 i sepali sono specificati da due prodotti genici AP1 (APETALA1) e SEP (SEPALLATA), se uno dei due prodotti genici dovesse venire a mancare per qualsiasi motivo si manifesterà un fenotipo privo sepali. I petali invece sono espressi da un tetramero formato da ben quattro proteine diverse codificate da altrettanti geni: troviamo ancora SEP e AP1, ai quali si aggiungono AP3 (APETALA3) e PI (PISTILLATA), se un gene di classe B (AP3 e PI) dovesse venire a mancare si avranno soltanto sepali, se

dovessero mancare i geni di classe A si avranno solo stami, e così via, la figura 10 presenta l'effetto delle mutazioni a perdita di funzione e le loro relative conseguenze.

2 Scopo della tesi

Sono stati condotti due esperimenti in parallelo su due vigneti a poca distanza l'uno dall'altro. La prima prova, esplorativa, ha avuto lo scopo di collezionare campioni di gemme, in tempi differenti, in quantità sufficienti per poter estrarre l'RNA e condurre analisi di RNAseq (analisi trascrittomiche), ormonali e metabolomiche. Un secondo esperimento è stato eseguito con lo scopo di verificare l'effetto della defoliazione sulle gemme portate all'ascella delle stesse foglie, sull'induzione a fiore. Si è potuto quindi elaborare un protocollo sperimentale per il campionamento di gemme e di conseguenza è stato possibile formare una cospicua collezione di campioni biologici in due situazioni differenti. Essendo gli esperimenti condotti in pieno campo i dati che da essi saranno ricavati è probabile rispecchieranno la reale situazione di campo rispetto ad esperimenti condotti in vaso in condizioni più controllate.

3 Materiali e metodi

3.1 Materiale vegetale e scelta varietale

Nel 2023 sono stati individuati due vigneti differenti (*Vitis vinifera* cv Merlot) ubicati a poca distanza l'uno dall'altro; uno a Due Carrare (PD) e l'altro a Battaglia Terme (PD) alle pendici dei Colli Euganei. Le coordinate geografiche dei due siti sono: Due Carrare 45.30051727410473, 11.796391892541742; Battaglia Terme 45.29067592071133, 11.790036578242113 (Fig. 11).

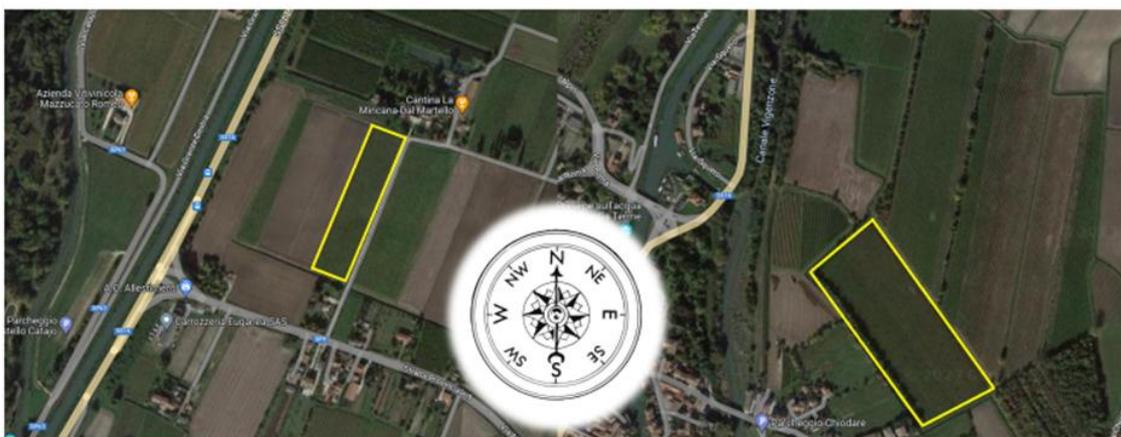


Figura 11: Foto da satellite dei due siti dove sono state svolte le prove, a destra il sito A, Cantine Dal Martello, a sinistra il sito B, Cantine Salvan Vigne dal Pigozzo.

Per facilitare l'esposizione, si parlerà della prima azienda come azienda A, e della seconda come azienda B. Analogamente verranno identificati gli esperimenti A e B.

L'azienda A è situata ai piedi dei Colli Euganei, Cantine Dal Martello. Qui, la messa a dimora del vigneto campionato è stata nel 2000 e si trova in direzione Nord-Sud. Per quanto riguarda l'esperimento B, il campionamento è stato effettuato presso la Cantina Salvan-Vigne del Pigozzo, a Battaglia Terme (PD) a 9m s.l.m., dove la messa a dimora del vigneto studiato è stata nel 1997 ed è posizionato in direzione Est-Ovest. Entrambe le aziende selezionate si posizionano al confine Est della DOC dei Colli Euganei. Le altre denominazioni di origine di cui fanno parte sono: DOC Prosecco, DOC Corti Benedettine e DOC Bagnoli.

La scelta delle aziende si è basata sul fatto che questi territori sono particolarmente vocati per la coltivazione della vite e più in particolare proprio per la cv. Merlot. La zona su cui sorgono le colture interessate presenta un suolo di medio impasto, calcareo che riesce a dare le peculiarità di morbidezza e mineralità a questo vino.

I trattamenti fitosanitari sono stati quelli previsti dal piano aziendale. Non erano previsti piani di concimazione. In entrambe le aziende non sono state effettuate lavorazioni sull'interfila

La cultivar selezionata per entrambe le prove è stata la varietà "Merlot", vitigno internazionale particolarmente diffuso nella zona dei Colli Euganei. Entrambi i vigneti selezionati sono innestati su Berl × Rip 161-49 ed allevati a cordone speronato con sesti d'impianto 1,8 × 0,81 m. In nessuno dei due vigneti è presente irrigazione a goccia.

La cultivar Merlot, così come altre varietà francesi, vennero importate in Veneto già a partire dal 1968-69. Lo scopo era quello di valutare se queste resistessero meglio alle malattie o fossero qualitativamente più performanti rispetto alle coltivazioni locali. Ad oggi, il Merlot costituisce il vitigno più diffuso dei Colli Euganei (nel 2014 rappresenta un quinto della superficie vitata) e viene utilizzato sia in purezza che, come componente fondamentale del Colli Euganei Rosso DOC, (Guy, 2015). Il Merlot presenta alcune caratteristiche che lo rendono una buona scelta per gli esperimenti svolti. La fioritura di questa cultivar ha la peculiarità di essere precoce, partendo dalla terza decade di maggio; questo permette di avere a disposizione un periodo di tempo maggiore per la raccolta dei campioni. È inoltre una varietà che si adatta bene ai cambiamenti ambientali che possono caratterizzare le diverse annate; ciò permette di ottenere fioriture costanti anche in condizioni non ottimali. Trattandosi inoltre di una coltivazione internazionale, fa sì che i risultati ottenuti dallo studio non siano limitati al territorio italiano, ma possano risultare di interesse anche per altri autori.

3.2 Piani sperimentali e campionamenti

Intorno a fine maggio è stato condotto un sopralluogo in entrambi i siti per selezionare i germogli da prelevare nei vari *time point*. Sono state usate delle fascette di plastica numerate per evidenziare tutti i germogli da prelevare, la scelta è stata effettuata

privilegiando i germogli che mostravano ai primi di maggio uno sviluppo più uniforme, mentre per le piante considerate sono state scartate quelle che presentavano vegetazione scarsa o tracce di malattie.

- Esperimento A: sono state considerate una sessantina di piante, per ciascuna sono stati scelti due germogli da prelevare, per un totale di circa 120 germogli. Si è considerato il prelievo di venti germogli a campionamento e sei *time point* di campionamento per entrambi gli esperimenti. I campionamenti sono stati effettuati a partire dal 16/06, un secondo campionamento è stato fatto una decina di giorni dopo il 26/06, il terzo e il quarto sono stati fatti rispettivamente il 3/07 e il 10/07. Gli ultimi campionamenti verranno effettuati in settembre prima dell'entrata in dormienza.
- Esperimento B: in questo caso sono state considerate circa il doppio delle piante. Una metà è stata tenuta come controllo non defoliato, l'altra metà, appena raggiunti gli stadi di sviluppo 16-17 secondo Eichhorn e Lorenz (10-12 foglie separate), è stata defoliata asportando le prime cinque foglie, a partire da quelle prossimali, e le foglie corrispondenti ai nodi 9-10-11. La scelta di questo schema è giustificata dal fatto che il Merlot è una cultivar solitamente mantenuta attraverso forme di allevamento a potatura corta. Le foglie sono state rimosse il 9/06. Il primo campionamento è stato fatto il 21 giugno, il secondo il 27/06, il terzo e il quarto rispettivamente il 3/07 e il 12/07. Anche in questo caso è previsto un campionamento a settembre in corrispondenza dell'imposizione della dormienza.



Figura 12: a destra: asportazione della gemma mediante bisturi, prima di localizzarla in azoto liquido. A sinistra: esempio di germoglio da campionare, si notino i circoletti neri che indicano le gemme da campionare alle ascelle delle foglie. Si possono vedere anche degli abbozzi di femminelle che all'atto del campionamento in laboratorio sono stati scartati.

Per quanto riguarda i campionamenti la procedura seguita è risultata la stessa per entrambi le prove. I germogli prelevati sono stati posti in acqua per evitare disidratazione e subito portati presso il Laboratorio di Biologia Molecolare delle Specie Arboree. Qui dopo aver preso delle fotografie (Fig. 13) per valutare lo stato della vegetazione, sono state asportate, mediante bisturi sterili (Fig. 12), le gemme corrispondenti alla corona e ai nodi 1°-2°-3°-4° e 10° (Fig. 10). Queste sono state poste immediatamente in azoto liquido al fine di evitare fenomeni ossidativi. In questo modo, in contenitori separati sono state collezionate gemme corrispondenti esclusivamente alla gemma di corona, al primo nodo, al secondo e così via. Sarà possibile quindi studiare l'effetto che la posizione della gemma ha sulla fertilità.



Figura 13: esempio di due germogli campionati durante l'esperimento B il 3/07.

Ogni campione ottenuto è stato poi stoccato a -80°C in attesa di ulteriori analisi.

3.3 Estrazione di RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata tramite il kit della Qiagen: RNeasy® Plant Mini. L'estrazione è avvenuta a partire da 40mg di campione macinato, per quanto riguarda il protocollo seguito sono state fatte delle modifiche rispetto a quello suggerito dai produttori. In particolare sono stati aggiunti al buffer di estrazione 0,022g di PVP (Polivinil Pirrolidone) e 5µl di Ca(OH)₂ per ogni campione. Il primo composto è necessario per allontanare meglio le varie proteine che potrebbero inquinare il campione, mentre l'idrossido di calcio serve per favorire la precipitazione dei carboidrati, che si è visto rappresentano una grossa difficoltà alla qualità dell'estratto finale. La DNAsi è stata fatta in colonna secondo le istruzioni del produttore.

La quantità di RNA totale ottenuto è stata determinata usando Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Nanodrop Products, Wilmington, DE, USA). La qualità della preparazione è stata valutata mediante comparazione delle letture spettrofotometriche a 230, 260 e 280nm ed analisi elettroforetica, su gel di agarosio all'1%, per verificare l'assenza di degradazione, (Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edit.).

4 Risultati attesi

In generale possiamo dire che il risultato più rimarchevole è stato senz'altro la collezione di un elevato numero di campioni di gemme che saranno necessari per poter portare avanti ulteriori analisi. Attualmente vi sono pochi studi che si sono occupati di far luce sull'influenza che la posizione della gemma lungo il germoglio ha sulla fertilità (Vasconcelos et al., 2009). Attraverso il presente lavoro sarà possibile indagare differenze di espressione a livello trascrittomico tra i vari campioni al fine di poter prevedere la fertilità delle singole gemme. Sarà inoltre possibile studiare in dettaglio i geni deputati al controllo florale e la loro espressione nel tempo, oggi poco si sa su cosa succede in *Vitis* all'interno dei meristemi fiorali a livello molecolare, il presente studio si propone di far luce su questi aspetti.

L'esperimento B ha permesso di raccogliere altri campioni ma in una situazione che possiamo definire di stress per la pianta, cioè la defoliazione. Dalla letteratura sappiamo che lo sviluppo dell'*uncommitted primordia* di *Vitis vinifera* cv Merlot comincia circa sei settimane dopo il germogliamento (Carolus, 1970), la defoliazione è avvenuta proprio durante questo periodo al fine di poter studiare l'influenza che ha la foglia in condizioni di normalità. Confrontando i trascrittomi della tesi defoliata con quella di controllo sarà possibile anche fare luce sul ruolo che hanno le foglie nell'induzione a fiore. Ulteriori studi effettuati da Carmona et al., (2007) su Tempranillo hanno evidenziato come intorno a maggio VvFT sia scarsamente presente, è lecito ipotizzare quindi che FT entri in gioco in un periodo successivo a maggio e che quindi influenzi la fioritura verso i primi di giugno.

5 Conclusioni e prospettive future

In generale si può concludere che con questo lavoro di tesi è stato possibile ottenere i seguenti risultati:

- È stato messo a punto uno schema sperimentale per lo studio delle gemme in funzione della loro posizione lungo il germoglio;
- Sono stati ottenuti campioni di gemme in quantità sufficiente da poter effettuare diversi esperimenti a livello trascrittomico e metabolomico;
- Sono stati ottenuti gli RNA purificati di gemme sottoposte a defoliazione con la possibilità l'effetto che questo fenomeno ha sulla fertilità delle stesse anche considerando il ruolo di spicco che hanno le foglie nella percezione dei segnali luminosi che tanto sono in grado di influenzare la fioritura, tramite l'espressione di CO e FT.

Sono in programma altre prove del genere da svolgersi in Australia tra il 2023 e il 2024. Tra i campioni biologici raccolti verranno selezionati quelli di maggior interesse che saranno sottoposti a RNAseq. Attraverso i dati ottenuti tramite il sequenziamento del trascrittoma sarà possibile analizzare eventuali differenze nell'espressione dei geni coinvolti nella fioritura e nella fertilità, studiando l'effetto che la posizione della gemma lungo il germoglio ha sulle stesse. Per quanto riguarda l'esperimento B ci aspettiamo che l'asportazione delle foglie causi un calo più o meno importante di fertilità all'interno delle gemme coinvolte. Interessante sarà quantificare questo calo mediante analisi fenologiche già in programma per la primavera 2024.

In conclusione, possiamo dire che sono state poste le basi per una serie di ulteriori prove che saranno utili per studiare la genetica della fioritura in vite e comprendere meglio i fattori che influenzano la fertilità, la qualità e quantità di uva prodotta.

6 Bibliografia

- Alleweldt, G. (1961). Untersuchungen über die Kausalität zwischen Gibberellinbehandlung und Austriebshemmung bei Reben. *Vitis*, 2(26), 6-82.
- Alleweldt, G., & Hofacker, W. (1975). Influence of environmental factors on bud burst, flowering, fertility and shoot growth of vines. *Vitis*, 14(1), 03-1.
- Alleweldt, G., & Morrison, R. I. (1963). Die Umweltabhängigkeit des vegetativen Wachstums, der Wachstumsruhe und der Blütenbildung von Reben (*Vitis Species*). *Vitis*, 1.
- Almada, R., Cabrera, N., Casaretto, J. A., Ruiz-Lara, S., & González Villanueva, E. (2009). *VvCO* and *VvCOL1*, two *CONSTANS* homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *Plant cell reports*, 28, 1193-1203.
- Antcliff, A. J., & Webster, W. J. (1955). Studies on the sultana vine. I. Fruit bud distribution and bud burst with reference to forecasting potential crop. *Australian Journal of Agricultural Research*, 6(4), 565-588.
- Baldwin, J. G. (1964). The relation between weather and fruitfulness of the Sultana vine. *Australian Journal of Agricultural Research*, 15(6), 920-928.
- Balint, G. (2012). Impact of different irrigation strategies on grapes and wine quality of four grapevine cultivars (*Vitis sp.*) in cool climate conditions. An investigation into the relationships among ABA, water status, grape cultivar and wine quality.
- Barnard, B. J. (2015). *Aurelius and I* (Vol. 22). Andrews UK Limited.
- Barnard, C., & Thomas, J. E. (1933). Fruit bud studies. II. The Sultana. Differentiation and development of the fruit buds.
- Bates, T. R., Dunst, R. M., & Joy, P. (2002). Seasonal dry matter, starch, and nutrient distribution in 'Concord' grapevine roots. *HortScience*, 37(2), 313-316.

- Bennett, J. S. (2002). Relationships between carbohydrate supply and reserves and the reproductive growth of grapevines (*Vitis vinifera* L.), (Doctoral dissertation, Lincoln University).
- Bennett, T., Liang, Y., Seale, M., Ward, S., Müller, D., & Leyser, O. (2016). Strigolactone regulates shoot development through a core signalling pathway. *Biology Open*, 5(12), 1806-1820.
- Beveridge, C. A., Symons, G. M., Murfet, I. C., Ross, J. J., & Rameau, C. (1997). The rms1 mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal (s). *Plant Physiology*, 115(3), 1251.
- Blanke, M. M. (1990). Carbon economy of the grape inflorescence. 5. Energy requirement of the flower bud of grape. *Viticulture Enology Science*, 45, 33-35.
- Blažková, A., Sotta, B., Tranvan, H., Maldiney, R., Bonnet, M., Einhorn, J., ... & Miginiac, E. (1997). Auxin metabolism and rooting in young and mature clones of *Sequoia sempervirens*. *Physiologia plantarum*, 99(1), 73-80.
- Boss, P. K., & Thomas, M. R. (2000). Tendrils, inflorescences and fruitfulness: a molecular perspective. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 168-174.
- Buttrose, M. S. (1968). Some effects of light intensity and temperature on dry weight and shoot growth of grapevine. *Annals of Botany*, 32(4), 753-765.
- Buttrose, M. S. (1969). Fruitfulness in grapevines: Effects of light intensity and temperature. *Botanical gazette*, 130(3), 166-173.
- Buttrose, M. S. (1970). Fruitfulness in grapevines: Development of leaf primordia in buds in relation to bud fruitfulness. *Botanical gazette*, 131(1), 78-83.
- Candolfi, M. P., Jermini, M., Carrera, E., & Candolfi-Vasconcelos, M. C. (1993). Grapevine leaf gas exchange, plant growth, yield, fruit quality and carbohydrate reserves influenced by the grape leafhopper, *Empoasca vitis*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 69(3), 289-296.

- Candolfi-Vasconcelos, M. C., Candolfi, M. P., & Kohlet, W. (1994). Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta*, 192, 567-573.
- Carbonneau, A. (1976). Analyse de la croissance des feuilles du sarment de vigne: estimation de sa surface foliaire par échantillonnage. *Connaissance vigne vin*, 10(2), 141-159.
- Carmona, M. J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J. M., & Thomas, M. R. (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of experimental botany*, 59(10), 2579-2596.
- Carolus-Barré, L. (1970). Le prince héritier Louis (1244-1260) et l'intérim du pouvoir royal, de la mort de Blanche de Castille (novembre 1252) au retour de Saint Louis en France (juillet 1254). *Comptes rendus des séances de l'Académie des Inscriptions et Belles-Lettres*, 114(4), 588-596.
- Caspari, H. W., Lang, A., & Alspach, P. (1998). Effects of girdling and leaf removal on fruit set and vegetative growth in grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(4), 359-366.
- Cline, M. G. (1994). The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiologia plantarum*, 90(1), 230-237.
- Collins, C., & Rawnsley, B. (2008). Effect of gibberellic acid and paclobutrazol on the incidence of primary bud necrosis in cv. Shiraz (*Vitis vinifera* L.). *American journal of oenology and viticulture*, 59(1), 83-87.
- Coombe, B. G. (1962). The effect of removing leaves, flowers and shoot tips on fruit-set in *Vitis vinifera* L. *Journal of Horticultural Science*, 37(1), 1-15.
- Cragin, J., Serpe, M., Keller, M., & Shellie, K. (2017). Dormancy and cold hardiness transitions in winegrape cultivars Chardonnay and Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(2), 195-202.

- Dong He, Kathy Mathiason, Anne Fennell, (2012). Auxin and cytokinin related gene expression during active shoot growth and latent bud paradormancy in *Vitis riparia* grapevine, *Journal of Plant Physiology*, Volume 169, Issue 6, Pages 643-648
- Dry, P. R. (2000). Canopy management for fruitfulness. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 109-115.
- Dry, P. R., & Loveys, B. R. (1998). Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian journal of grape and wine research*, 4(3), 140-148.
- Dunn, G. M., & Martin, S. R. (2000). Do temperature conditions at budburst affect flower number in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon?. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 116-124.
- Eifert, J., Panczel, M., & Eifert, A. (1961). Änderung des Stärke-und Zuckergehaltes der Rebe während der Ruheperiode. *Vitis*, 2, 257-265.
- Eltom, M., Winefield, C. S., & Trought, M. C. (2014). Effect of pruning system, cane size and season on inflorescence primordia initiation and inflorescence architecture of *Vitis vinifera* L. Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(3), 459-464.
- Emmerson, J. G., & Powell, L. E. (1978). Endogenous Abscisic Acid in Relation to Rest and Bud Burst in Three *Vitis* Species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103(5), 677-680.
- Erez, A., Fishman, S., Gat, Z., & Couvillon, G. A. (1987, September). Evaluation of winter climate for breaking bud rest using the dynamic model. In *International Workshop on Apple Culture in the Tropics and Subtropics* 232 (pp. 76-89).
- Gerrath, J. M., & Posluszny, U. (2007). Shoot architecture in the Vitaceae. *Botany*, 85(8), 691-700.
- Gerrath, J. M., Posluszny, U., & Dengler, N. G. (2001). Primary vascular patterns in the Vitaceae. *International Journal of Plant Sciences*, 162(4), 729-745.

- Gibson, S. I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current opinion in plant biology*, 8(1), 93-102.
- Greenham, K., & McClung, C. R. (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics*, 16(10), 598-610.
- Grimes, D. W., & Williams, L. E. (1990). Irrigation effects on plant water relations and productivity of Thompson Seedless grapevines. *Crop science*, 30(2), 255-260.
- Guy, P. (2015). *I Colli Euganei. Storie e percorsi tra le colline di Venezia*.
- Hale, C., & Weaver, R. (1962). The effect of developmental stage on direction of translocation of photosynthate in *Vitis vinifera*. *Hilgardia*, 33(3), 89-131.
- Hardie, W. J., & Considine, J. A. (1976). Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(2), 55-61.
- Holzappel, B. P., Smith, J. P., Field, S. K., & Hardie, W. J. (2010). Dynamics of Carbohydrate Reserves in Cultivated Grapevines. *Horticultural reviews*, 37, 143.
- Hsiao, T. C., & Acevedo, E. (1975). Plant responses to water deficits, water-use efficiency, and drought resistance. *Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology*, 1, 59-84.
- Huglin, P., & Schneider, C. (1998). *Biologie et écologie de la vigne*.
- Hutchison, C. E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M. W., ... & Kieber, J. J. (2006). The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 18(11), 3073-3087.
- Jones, J. E., Menary, R. C., & Wilson, S. J. (2009). Continued development of *V. vinifera* inflorescence primordia in winter dormant buds. *Vitis*, 48(3), 103-105.
- Kasimatis, A. N., Lider, L. A., & Kliewer, W. M. (1975). Influence of trellising on growth and yield of 'Thompson Seedless' vines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26(3), 125-129.

- Kaur, S., Cheema, S. S., Chhabra, B. R., & Talwar, K. K. (2002). Chemical induction of physiological changes during adventitious root formation and bud break in grapevine cuttings. *Plant Growth Regulation*, 37, 63-68.
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 509-540.
- Koundouras, S., Van Leeuwen, C., Seguin, G., & Glories, Y. (1999). Influence of water status on vine vegetative growth, berry ripening and wine characteristics in mediterranean zone (example of Nemea, Greece, variety Saint-George, 1997). *OENO One*, 33(4), 149-160.
- Krizek, B. A., & Fletcher, J. C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics*, 6(9), 688-698.
- Lacroix, C. R., & Posluszny, U. (1989). Phyllotactic patterns in some members of the Vitaceae. *Botanical Gazette*, 150(3), 303-313.
- Lang, A. (1970). Gibberellins: structure and metabolism. *Annual review of plant physiology*, 21(1), 537-570.
- Lang, G. A., Early, J. D., Martin, G. C., & Darnell, R. L. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, 22(3), 371-377.
- Lebon, G., Brun, O., Magné, C., & Clément, C. (2005). Photosynthesis of the grapevine (*Vitis vinifera*) inflorescence. *Tree Physiology*, 25(5), 633-639.
- Lebon, G., Wojnarowicz, G., Holzapfel, B., Fontaine, F., Vaillant-Gaveau, N., & Clément, C. (2008). Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of experimental botany*, 59(10), 2565-2578.
- Li-Mallet, A., Rabot, A., & Geny, L. (2016). Factors controlling inflorescence primordia formation of grapevine: their role in latent bud fruitfulness? A review. *Botany*, 94(3), 147-163.

- Li-Mallet, A., Rabot, A., & Geny, L. (2016, June). Is expression pattern of *VvL1L*, *VvMFT1* and *VvTFL1A* linked to IAA/ABA balance in grapevine fruitful buds?. In X International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology 1188 (pp. 149-156).
- Livne, A., & Vaadia, Y. (1972). Water deficits and hormone relations. Water deficits and plant growth, 3, 255-275.
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., & Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. The Plant Cell, 17(4), 1090-1104.
- Loveys, B. R., & CSIRO, P. K. (1973). Rapid changes in abscisic acid-like inhibitors following alterations in vine leaf water potential. Physiologia plantarum, 28(3), 476-479.
- Loveys, B. R., & Kriedemann, P. E. (1974). Internal control of stomatal physiology and photosynthesis. I. Stomatal regulation and associated changes in endogenous levels of abscisic and phaseic acids. Functional Plant Biology, 1(3), 407-415.
- Mahilum, J. J. B. (2014). Effects of Sink-Source Manipulation of Grapevine Plants on the Activity of Carbohydrate Enzymes in leaves.
- Matthews, M. A., & Anderson, M. M. (1989). Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficits. American Journal of Enology and Viticulture, 40(1), 52-60.
- May, P., Clingeleffer, P. R., & Brien, C. J. (1976). Sultana (*Vitis vinifera* L.) canes and their exposure to light. Vitis, 14, 278-288.
- Meneghetti, S., Calò, A., & Gardiman, M. (2006). Flower biology of grapevine. A review.
- Monankov MK (1976). The role of gibberellins in the morphogenesis of *Vitis vinifera* tendrils. Bot Zh (Leningrad), 61: 69~77
- Moncur, M. W., Rattigan, K., Mackenzie, D. H., & Mc Intyre, G. N. (1989). Base temperatures for budbreak and leaf appearance of grapevines. American Journal of Enology and Viticulture, 40(1), 21-26.

- Monteiro, A. I., Malheiro, A. C., & Bacelar, E. A. (2021). Morphology, physiology and analysis techniques of grapevine bud fruitfulness: A review. *Agriculture*, 11(2), 127.
- Morgan, D. C., Stanley, C. J., & Warrington, I. J. (1985). The effects of simulated daylight and shade-light on vegetative and reproductive growth in kiwifruit and grapevine. *Journal of horticultural science*, 60(4), 473-484.
- Morrison, J. C. (1991). Bud development in *Vitis vinifera* L. *Botanical gazette*, 152(3), 304-315.
- Motomura, Y. (1993). 14C-Assimilate partitioning in grapevine shoots: effects of shoot pinching, girdling of shoot, and leaf-halving on assimilates partitioning from leaves into clusters. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(1), 1-7.
- Mudiyanselage, S. A. (2016). Interactive response of temperature and light on vegetative and reproductive growth of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) under field and controlled environment conditions.
- Müller, D., & Leyser, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of botany*, 107(7), 1203-1212.
- Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., Brand, M., Eeden, F. J. V., Nüsslein-Volhard, C. (1996). Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes. *Development*, 123(1), 81-93.
- Mullins, M. G., Bouquet, A., & Williams, L. E. (1992). *Biology of the grapevine*. Cambridge University Press.
- Myburgh, P. A. (2003). Responses of *Vitis vinifera* L. cv. Sultanina to water deficits during various pre-and post-harvest phases under semi-arid conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(1), 25-33.
- Nitsch, J. P., & Nitsch, M. C. (1965). Présence de phytokinines et autres substances de croissance dans la sève d'*Acer saccharum* et de *Vitis vinifera*. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 112(1-2), 11-18.

- Ohto, M. A., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., & Nakamura, K. (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 127(1), 252-261.
- Okamoto, G., Kuwamura, T., & Hirano, K. (2004). Effects of water deficit stress on leaf and berry ABA and berry ripening in Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera*). *VITIS-GEILWEILERHOF-*, 43(1), 15-18.
- Park, Y., & Park, H. S. (2019). Heat unit model for classifying the environmentally controlled period during ecodormancy. *Scientia Horticulturae*, 256, 108536.
- Pedroso, V., Brites, J., Dolgner, E., Lopes, C. M., & Castro, R. (1996). Influence de la retaille de la vigne après une gelée sur le comportement agronomique du cépage 'Jaen'. *Compte Rendu 9èmes Journées GESCO, Univ. Horticulture & Food Industries*.
- Pérez, F. J., Vergara, R., & Or, E. (2009). On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regulation*, 59, 145-152.
- Petrie, P. R., & Clingeleffer, P. R. (2005). Effects of temperature and light (before and after budburst) on inflorescence morphology and flower number of Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(1), 59-65.
- Petrie, P. R., Trought, M. T., & Howell, G. S. (2000). Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *VITIS-GEILWEILERHOF-*, 39(1), 31-36.
- Pfisterer, J. (2016). Establishing a method to investigate the impact of root-galling grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch)) on *Vitis vinifera* L.
- Pinkerton, J. N., Vasconcelos, M. C., Sampaio, T. L., & Shaffer, R. G. (2005). Reaction of grape rootstocks to ring nematode *Mesocriconema xenoplax*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(4), 377-385.

- Pouget, R. (1963). Physiological studies on the vegetative rest period in vine (*V. vinifera* L.): bud dormancy and the mechanism of its breaking. *Physiological studies on the vegetative rest period in vine (V. vinifera L.): bud dormancy and the mechanism of its breaking.*
- Powell, L. E., Swartz, H. J., Pasternak, G., & Maybee, C. G. (1986). Time of flowering in spring: its regulation in temperate zone woody plants. *Biologia plantarum*, 28, 81-84.
- Pratt, C. (1971). Reproductive anatomy in cultivated grapes-a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22(2), 92-109.
- Pratt, C. (1974). Vegetative anatomy of cultivated grapes--a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(3), 131-150.
- Prusinkiewicz, P., Crawford, S., Smith, R. S., Ljung, K., Bennett, T., Ongaro, V., & Leyser, O. (2009). Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17431-17436.
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., ... & Rohde, A. (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *The Plant Cell*, 19(8), 2370-2390.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., & Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, 288(5471), 1613-1616.
- Scholefield, P. B., & Ward, R. C. (1975). Scanning electron microscopy of the developmental stages of the Sultana inflorescence. *Vitis*, 14, 14-19.
- Serra, I., Strever, A., Myburgh, P. A., & Deloire, A. (2014). The interaction between rootstocks and cultivars (*Vitis vinifera* L.) to enhance drought tolerance in grapevine. *Australian Journal of grape and wine Research*, 20(1), 1-14.
- Silva, T. D. M. D. (2019). Grapevine response to cold study of starch metabolism in woody tissues (Doctoral dissertation).

- Skene, K. G. M. (1967). Gibberellin-like substances in root exudate of *Vitis vinifera*. *Planta*, 74, 250-262.
- Skene, K. G. M., & Kerridge, G. H. (1967). Effect of root temperature on cytokinin activity in root exudate of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology*, 42(8), 1131-1139.
- Smart, R. E., Dick, J. K., Gravett, I. M., & Fisher, B. M. (1990). Canopy management to improve grape yield and wine quality-principles and practices. *South african journal of Enology and Viticulture*, 11(1), 3-17.
- Smart, R. E., Turkington, C. R., & Evans, J. C. (1974). Grapevine response to furrow and trickle irrigation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(2), 62-66.
- Smithyman, R. P., Howell, G. S., & Miller, D. P. (1998). The use of competition for carbohydrates among vegetative and reproductive sinks to reduce fruit set and botrytis bunch rot in Seyval blanc grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 163-170.
- Sommer, K. J., ISLAM, M. T., & CLINGELEFFER, P. R. (2000). Light and temperature effects on shoot fruitfulness in *Vitis vinifera* L. cv. Sultana: Influence of trellis type and grafting. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 99-108.
- SRINIVASAN, C., & Mullins, M. G. (1976). Reproductive anatomy of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): Origin and development of the anlage and its derivatives. *Annals of Botany*, 40(5), 1079-1084.
- Srinivasan, C., & Mullins, M. G. (1980). Effects of temperature and growth regulators on formation of anlagen, tendrils and inflorescences in *Vitis vinifera* L. *Annals of Botany*, 45(4), 439-446.
- Srinivasan, C., & Mullins, M. G. (1980). High-frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. *Scientia Horticulturae*, 13(3), 245-252.
- Srinivasan, C., & Mullins, M. G. (1981). Physiology of flowering in the grapevine—a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32(1), 47-63.

- Swanepoel, J. J., De Villiers, F. S., & Pouget, R. (1990). Predicting the date of bud burst in grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 11(1), 46-49.
- Torregrosa, L., Carbonneau, A., & Kelner, J. J. (2021). The shoot system architecture of *Vitis vinifera* ssp. *Sativa*. *Scientia Horticulturae*, 288, 110404.
- Tourmeau, J. (1976). Différenciation des ébauches florales chez la vigne (Doctoral dissertation).
- Turck, F., Fornara, F., & Coupland, G. (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 573-594.
- Vaadia, Y., & Kasimatis, A. N. (1961). Vineyard irrigation trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, 12(2), 88-98.
- Van der Schoot, C., & Rinne, P. L. (2011). Dormancy cycling at the shoot apical meristem: transitioning between self-organization and self-arrest. *Plant Science*, 180(1), 120-131.
- Van Zyl, J. L. (1984). Response of Colombar grapevines to irrigation as regards quality aspects and growth. *S. Afr. J. Enol. Vitic*, 5(1), 19-28.
- Vasconcelos, M. C., & Castagnoli, S. (2000). Leaf canopy structure and vine performance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4), 390-396.
- Vasconcelos, M. C., Greven, M., Winefield, C. S., Trought, M. C., & Raw, V. (2009). The flowering process of *Vitis vinifera*: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(4), 411-434.
- Velappan, Y. (2020). Seasonal and oxidative physiologies of plant quiescence and dormancy.
- Wample, R. L. (1997). Influence of pre-and post-treatment storage on rooting of hot-water-treated cuttings of Cabernet Sauvignon. *American journal of enology and viticulture*, 48(2), 131-136.

- Wardlaw, I. F. (1990). Tansley Review No. 27 The control of carbon partitioning in plants. *New phytologist*, 116(3), 341-381.
- Weaver, R., & McCune, S. (1959). Effect of gibberellin on seedless *Vitis vinifera*. *Hilgardia*, 29(6), 247-275.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309(5737), 1056-1059.
- Winkler, A. J., & Williams, W. O. (1938). Carbohydrates metabolism of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology*, 20, 412-432.
- Winkler, A., & Shemsettin, E. (1937). Fruit-bud and flower formation in the Sultanina grape. *Hilgardia*, 10(15), 589-611.
- Zapata, C., Audran, J. C., & Magné, C. (2003). Grapevine culture in trenches. 2. Reproductive characteristics and interactions with vegetative growth. *OENO One*, 37(2), 85-90.
- Zapata, C., Deléens, E., Chaillou, S., & Magné, C. (2004). Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of plant physiology*, 161(9), 1031-1040.
- Zeevaart, J. A. (1976). Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology*, 27(1), 321-348.
- Zelleke, A., & Kliewer, W. M. (1979). Influence of root temperature and rootstock on budbreak, shoot growth, and fruit composition of Cabernet Sauvignon grapevines grown under controlled conditions. *American journal of enology and viticulture*, 30(4), 312-317.