

Alma Mater Studiorum Università di Bologna

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

Tesi di Laurea in

Viticoltura

**Influenza del deficit idrico sul metabolismo degli antociani
nella varietà Sangiovese**

Tesi di laurea di:
Roberto D'Ambrosio

Relatore
Prof. ssa Ilaria Filippetti

Correlatori
Dott.ssa Pastore Chiara
Dott. Valentini Gabriele

Anno Accademico 2018/2019

Sessione unica

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. CAMBIAMENTO CLIMATICO, FISIOLOGIA DELLA VITE E MATURAZIONE DELL'UVA	3
1.2. STRESS IDRICO	5
1.2.1. RUOLO DELL'ABA NELLA RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO	9
1.2.2. CULTIVAR ISOIDRICHE E ANISOIDRICHE	12
1.3. ADATTAMENTO DELLA VITICOLTURA AL CAMBIAMENTO CLIMATICO E ALLO STRESS IDRICO: RUOLO DELLE FORME DI ALLEVAMENTO	14
1.4. SINTESI E ACCUMULO DEGLI ANTOCIANI NELLE BACCHE: EFFETTO DI STRESS TERMICI E IDRICI	18
1.5. SCOPO DELLA TESI	23
2. MATERIALE E METODI	24
2.1. MATERIALE VEGETALE	24
2.2. ANALISI FISIOLOGICHE E DEI COMPONENTI DELLA PRODUZIONE ALLA VENDEMMIA	25
2.2.1. MONITORAGGIO DELLO STATO IDRICO DELLE PIANTE E DELLA TEMPERATURA DEGLI ACINI	25
2.2.2. MISURA DELL'AREA FOGLIARE E COMPONENTI DELLA PRODUZIONE ALLA VENDEMMIA	26
2.3. ANALISI DELLA MATURITA' TECNOLOGICA	27
2.4. ANALISI DEGLI ANTOCIANI TOTALI TRAMITE HPLC	27
2.5. ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA	28
2.5.1. ESTRAZIONE DI RNA	28
2.5.2. RETROTRASCRIZIONE E PCR DI CONTROLLO DEL CDNA	29
2.5.3. ANALISI REAL TIME PCR	30
2.6. ANALISI STATISTICA DEI DATI	30
3. RISULTATI	31
3.1. EFFETTI DELLO STRESS IDRICO SULLA FISIOLOGIA DELLA PIANTA, LA MATURAZIONE E I PARAMETRI VEGETO PRODUTTIVI ALLA VENDEMMIA	31

3.2. EFFETTI DELLO STRESS IDRICO SULLA MATURAZIONE TECNOLOGICA E SULL'ACCUMULO DI ANTOCIANI	35
3.3. EFFETTI DELLO STRESS IDRICO SULL'ESPRESSIONE GENICA DI ALCUNI GENI CHIAVE DELLA BIOSINTESI DEGLI ANTOCIANI.	39
4. DISCUSSIONE	42
5. CONCLUSIONI	50
6. BIBLIOGRAFIA	51

1. INTRODUZIONE

La vite è una delle prime specie frutticole addomesticata dall'uomo. Attualmente, l'intero comparto vitivinicolo è uno dei settori più importanti nell'intero sistema agroindustriale, poiché la coltivazione della vite interessa un'area di circa 7,6 milioni di ettari a livello mondiale.

In Europa le superfici impiantate a vigneto coprono un'area di 3,3 milioni di ettari e i primi tre paesi leader nella coltivazione sono Spagna, Francia e Italia. Analizzando la produzione di vino, il primo paese produttore di vino in Europa e nel mondo nel 2017 è stato l'Italia, con 42,5 milioni di ettolitri, seguito da Francia, Spagna e Germania (OIV, 2018). L'Emilia-Romagna, dove sono riconosciuti 19 vini D.O.C. e 2 vini D.O.C.G., è una delle aree italiane più vocata alla viticoltura essendo la 4° regione per superficie investita a vite e la 3° per produzione di vino (Teslić, et al., 2018). La grande variabilità genetica che esiste in *Vitis vinifera* ha fino ad ora permesso la sua coltivazione in diverse aree del mondo ed alcuni territori si sono affermati per la vocazionalità alla coltivazione di determinate cultivar (Jones, et al., 2005), anche grazie allo sviluppo di particolari tecniche colturali. Al fine di superare i limiti imposti dalle condizioni climatiche e ambientali, i viticoltori hanno infatti da sempre cercato di servirsi di varie tecniche agronomiche, in modo da poter coltivare la vite nei diversi ambienti. Per tale motivo in diverse aree di coltivazione, la stessa varietà di vite è in grado di produrre uve con delle peculiarità qualitative distintive e per tale motivo si è cercato di associare la tipicità di alcuni vini al concetto di "terroir", che rappresenta l'interazione tra gli elementi ambientali e le pratiche viticole che nell'insieme contribuiscono all'ottenimento di un vino con caratteristiche uniche e non ottenibili altrove.

Nonostante ciò, la velocità dei cambiamenti climatici in atto oggi è senza precedenti e richiede che vengano apportate modifiche alla viticoltura tradizionale. Tra i fattori climatici che più influenzano la coltivazione della vite vi è senz'altro la temperatura. La viticoltura viene infatti da sempre praticata in aree in cui la temperatura media varia tra 12 e 22°C

durante la stagione vegetativa e ciò fa sì che le condizioni ideali alla coltivazione della vite si siano fino ad ora trovate oltre che nel bacino del mediterraneo anche nelle regioni dell'Est dell'Asia, in molte località del Nord America, Sud dell'Argentina, Sud Africa e Australia (Jones, 2012). A livello termico numerosi sono stati gli indici usati per poter definire gli areali adatti alla coltivazione delle diverse cultivar: sommatorie termiche, gradi giorno, media delle temperature durante la stagione vegetativa, ma anche indici più complessi come l'indice di Winkler e di Huglin. Analizzando i dati storici delle date di raccolta e delle rese produttive in Europa si nota che nel corso del tempo si sono alternati periodi con temperature stagionali favorevoli alla coltivazione della vite con periodi caratterizzati da condizioni ambientali avverse, le quali hanno determinato nel corso degli anni, oltre ad una variazione del periodo di raccolta, anche un continuo spostamento dell'areale di coltivazione, fino al mar Baltico e Sud dell'Inghilterra durante il 900 – 1300. I veloci mutamenti climatici in atto sicuramente influenzeranno ancora gli areali di coltivazione, rendendo le regioni del Sud Europa sempre meno favorevoli all'ottenimento di vini di qualità, mentre un graduale miglioramento delle condizioni ambientali nelle regioni del Nord Europa determinerà una migrazione della coltivazione verso queste aree (Jones, et al., 2005). Probabilmente, ciò comporterà che aree vocate alla coltivazione di certe varietà di vite oggi, saranno in futuro destinate alla coltivazione di altre, magari con pratiche colturali diverse (White, et al., 2009). Un esempio degli effetti del cambiamento climatico si sta già avendo con il Pinot Nero, solitamente coltivato in ambienti freddi con temperature medie durante la stagione vegetativa tra i 14 – 16°C. L'aumento di circa 2°C negli ambienti tipici della coltivazione di questa varietà determinerà molto probabilmente una modifica delle caratteristiche sensoriali che oggi rendono questo vino apprezzato (Jones, 2014). In uno studio effettuato nella regione Emilia-Romagna, Teslić, et al., 2018, hanno esaminato in scala regionale le possibili ripercussioni sulla viticoltura nei prossimi decenni. In questa ricerca, i valori climatici futuri sono stati acquisiti da due scenari futuri dall'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change): il primo scenario prevede che fino al 2100 continueranno ad aumentare le emissioni di gas serra mentre per il secondo scenario, definito stabile, non vi sarà alcun aumento delle emissioni. I dati climatici ottenuti sono quindi stati usati, tramite un indice bioclimatico, per valutare se l'Emilia Romagna sarà ancora una zona vocata alla viticoltura alla fine di questo secolo. Dai

risultati ottenuti si nota un lieve aumento delle temperature medie riferite al periodo di crescita vegetativa entro il 2040, utilizzando entrambi gli scenari climatici e in prossimità del 2100 l'aumento delle temperature ipotizzate potrebbe rendere difficile la coltivazione della vite in questa regione. Esaminando, inoltre, le precipitazioni medie durante la stagione vegetativa, che nella regione Emilia Romagna erano solitamente tra 400 e 550 mm (periodo 1961 – 1990), è emersa una maggiore incidenza di periodi siccitosi tra il 1985 e il 2015 rispetto al periodo di riferimento (1961 – 1990). Le previsioni future indicano perciò una probabile diminuzione delle precipitazioni e della disponibilità idrica entro la fine del secolo in molte aree d'interesse viticolo. Inoltre, alcuni autori suggeriscono che i periodi di stress idrico saranno più concentrati nei mesi estivi con delle conseguenze quali/quantitative sulla composizione della bacca (Teslić, et al., 2018). Comprendere meglio come la fisiologia della vite e la maturazione della bacca reagiscono a questi scenari climatici odierni e futuri risulta necessario per riuscire ad ottimizzare la gestione del vigneto e la scelta delle varietà che più sono predisposte ad ambienti con alte temperature e scarsa disponibilità di acqua, anche in zone, come la regione Emilia-Romagna, che fino ad ora avevano climi e ambienti ottimali per la coltivazione della vite.

1.1. CAMBIAMENTO CLIMATICO, FISILOGIA DELLA VITE E MATURAZIONE DELL'UVA

Le condizioni ambientali condizionano fortemente la crescita e lo sviluppo della vite. Tra i diversi parametri ambientali come radiazione solare, temperature estreme, vento e precipitazioni, quelli che in maggiore misura influenzano la qualità finale delle uve sono la lunghezza della stagione vegetativa e le temperature.

Analizzando i dati relativi alle temperature medie durante la stagione vegetativa nel periodo 1950 – 1999 per le principali aree viticole dell'emisfero Nord, si ha un trend positivo con un aumento di 1.26° C (Jones, et al., 2005).

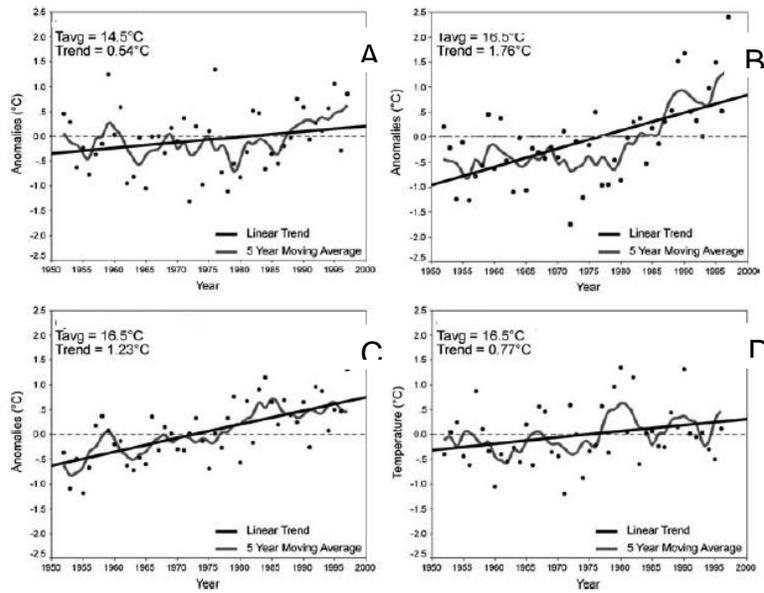


Fig. 1. Osservazione delle anomalie della temperatura media durante la stagione vegetativa nel periodo 1950-1999 per la regione di: Champagne (A); Bordeaux (B); Northern California (C); Hunter Valley (D). Tav è la media delle temperature della stagione vegetativa (Aprile – Ottobre per l'emisfero Nord e Ottobre – Aprile per l'emisfero Sud) (Jones, et al., 2005).

Diversi studi hanno dimostrato che gli incrementi termici che si stanno verificando causano un anticipo delle fasi fenologiche principali, con una conseguente riduzione della lunghezza del ciclo vegetativo. L'anticipo delle fasi del ciclo vegetativo nelle diverse aree vocate alla viticoltura risulta essere tra i 10 e 30 giorni, comportando delle implicazioni sui parametri di qualità delle uve, come un aumento del grado alcolico e un crollo dell'acidità, oltre che a comportare effetti sui composti che determinano il colore e l'aroma del vino (Orduña, 2010). Inoltre, spesso si sta verificando una maggiore incidenza all'esposizione ad eventi climatici avversi nelle fasi finali della maturazione, che può compromettere così ulteriormente la qualità delle uve (Marco Moriondo, 2007).

La minor durata delle diverse fasi fenologiche e il raggiungimento anticipato della maturità tecnologica, spesso non permette un adeguato accumulo dei composti fenolici e aromatici (Teslić, et al., 2018), causando in particolare nelle uve a bacca rossa, un disaccoppiamento tra la maturità tecnologica e fenolica.

1.2. STRESS IDRICO

Lo stress idrico nelle piante si verifica quando il tasso di traspirazione supera la capacità di assorbimento d'acqua. Le implicazioni della diminuzione del contenuto idrico sono diverse: aumento della concentrazione dei soluti, cambiamento nel volume cellulare e nella forma delle membrane, perdita di turgore e denaturazione delle proteine. L'abilità della pianta di rispondere ad una situazione di deficit idrico dipende dai meccanismi di difesa a disposizione, determinando la sua capacità di sopravvivenza (Bray, 1997). Il processo di perdita di vapor d'acqua attraverso gli stomi avviene per diffusione, controllato da un gradiente di concentrazione. I fattori principali che controllano questo processo sono due: in primo luogo la differenza di concentrazione del vapore acqueo tra l'aria all'interno dello stoma e l'aria esterna, quindi l'ostacolo alla diffusione dovuto alla resistenza della rima stomatica e dello strato di aria a contatto con la superficie fogliare (Taiz & Zeiger, 2009). Il movimento degli stomi regola gli scambi gassosi, influenzando sia la concentrazione di CO₂ nei siti di carbossilazione che i tassi di traspirazione. A sua volta, una variazione nella quantità di acqua traspirata modifica la temperatura e il potenziale idrico delle foglie (Farquhar & Sharkey, 1982).

L'obiettivo dell'attività stomatica è quello di limitare la perdita di acqua pur permettendo l'assimilazione della CO₂ (Tombesi, et al., 2016). In ogni caso, la chiusura degli stomi determina una riduzione della diffusione della CO₂ all'interno della foglia, compromettendo così la resa fotosintetica (Chaves, et al., 2002). L'andamento giornaliero del potenziale idrico della pianta si modifica in funzione della quantità di energia necessaria per il passaggio dell'acqua dallo stato liquido a gassoso nel complesso sistema suolo-pianta-atmosfera. L'aumento della radiazione solare e della temperatura durante il giorno determina un aumento del gradiente di pressione di vapore (VPD) tra la camera stomatica e l'atmosfera. In generale, nel corso della mattinata il potenziale idrico diminuisce rapidamente fino a mezzogiorno, quando si ha una fase di stabilità, per poi continuare a diminuire nel corso del pomeriggio. Il tasso di diminuzione del potenziale idrico è influenzato da molti fattori, in modo particolare dalle condizioni ambientali. In suoli caratterizzati da deficit idrico, il potenziale idrico diminuisce maggiormente rispetto a situazioni con normale disponibilità idrica. Ugualmente, la quantità di energia a

disposizione, che può variare a causa dell'ombreggiamento, determina una minore rapidità nella diminuzione del potenziale idrico per le foglie che ricevono meno radiazione rispetto alle foglie più illuminate. Di conseguenza, l'effetto della traspirazione sulla modulazione della temperatura varia in funzione della capacità traspirativa della pianta. Smart, 1974 ha stimato che la temperatura nelle foglie di vite in condizioni di stress è di 7°C in più rispetto a piante ben irrigate. Questo aumento termico si verificava anche per le bacche, dove si sono registrate temperature più alte di 11°C nei grappoli di piante non irrigate rispetto a quelle con adeguato apporto idrico. In quest'ultimo caso, la temperatura maggiore degli acini può anche essere attribuita ad un minor ombreggiamento da parte dei tralci, in quanto lo stress idrico provoca una ridotta crescita vegetativa (Smart, 1974). In generale, le piante ben irrigate mostrano una ottima turgidità delle foglie e dei viticci. In situazioni di carenza idrica i primi sintomi sono visibili sui viticci, che manifestano un generale appassimento, un cambiamento di colore verso il marrone fino alla caduta. Successivamente sono colpite le giovani foglie e, infine, quelle più mature. I fenomeni di appassimento sono dovuti alla mancanza d'acqua a livello cellulare che causa un richiamo d'acqua dal citoplasma verso lo spazio intercellulare, e determina una riduzione del volume della cellula.

La limitata disponibilità idrica, prima dell'invaiaatura, causa nella bacca un raggrinzimento dell'epicarpo poiché in questa fase la bacca può traspirare intensamente e inoltre si può verificare una riduzione del suo volume anche a causa del richiamo di acqua verso i germogli. Durante la divisione e l'espansione cellulare oltre alla riduzione della grandezza, si hanno anche cambiamenti nel metabolismo e composizione finale dell'acino. Al contrario, una diminuzione della disponibilità idrica nella fase successiva a quella dell'invaiaatura non determina la deformazione del pericarpo. Tale comportamento indica che nonostante il flusso xilematico non sia interamente compromesso durante l'invaiaatura, la bacca è meno sensibile durante la maturazione alla carenza idrica poiché nelle ultime fasi di maturazione viene stimolato il flusso floematico verso la bacca. In ogni caso, se lo stress idrico persiste si avranno deformazioni degli acini, causati da un'eccessiva traspirazione e da un efflusso tramite lo xilema che è superiore dell'influsso floematico. I sintomi da stress idrico possono essere valutati in termini di turgore della foglia e di potenziale idrico. Riportando la vite a condizioni idriche normali si ha un

ripristino del potenziale idrico e della conduttività idraulica che permette una ripresa del turgore delle foglie e delle bacche nella fase di pre-invaiatura. La chiusura degli stomi è un'immediata risposta fisiologica della vite ad una situazione di stress idrico (Bondada & Shutthanandan, 2012). Le piante per essere più efficienti possibili hanno una stretta connessione tra la conduttanza stomatica, caratteristiche dell'ambiente e l'attività metabolica della pianta (Farquhar & Sharkey, 1982). La chiusura degli stomi dipende da un meccanismo attivo o passivo, necessario alla pianta per superare condizioni di deficit idrico o di alta richiesta traspirativa. Il primo meccanismo si basa su segnali chimico – ormonali, come ad esempio la concentrazione di CO₂ o la luce, in grado di regolare l'attività della rima stomatica. Il meccanismo passivo fu descritto già da Francis Darwin (Darwin, 1988), ed è riferito alla regolazione della chiusura o apertura degli stomi dovuta al turgore delle cellule di guardia e mediata dal potenziale idrico fogliare (Tombesi, et al., 2016). Quando la quantità di acqua diventa insufficiente, la chiusura degli stomi consente di avere un potenziale idrico dello xilema meno negativo, evitando così la formazione di bolle d'aria all'interno dei vasi, fenomeno definito cavitazione, ossia l'occupazione da parte dei gas di porzioni di vasi xilematici, portando alla formazione di embolismi. La cavitazione dello xilema interrompe la colonna d'acqua arrestando il suo trasporto verso le foglie. Questo fenomeno si verifica in due casi: se l'acqua nello xilema è sottoposta a forte tensione, aumentando la possibilità di assorbire aria attraverso i pori della parete xilematica; oppure, quando le temperature troppo basse congelano i vasi xilematici e la bassa solubilità dei gas nel ghiaccio causa la formazione di bolle. Le piante hanno diversi modi per eliminare gli embolismi. In generale, quando di notte la traspirazione diminuisce e il potenziale idrico ritorna verso valori più positivi, i gas tornano nella soluzione xilematica (Taiz & Zeiger, 2009). In uno studio condotto su due varietà di vite allevate in vaso, Montepulciano e Sangiovese, è stato indotto uno stress idrico a partire dall'inizio di luglio fino alla completa caduta delle foglie, in modo da poter valutare come variano alcuni parametri fisiologici in funzione dello stress tra due diverse varietà. Come viene mostrato in Fig. 2 è stato possibile distinguere tre fasi mettendo in relazione i giorni seguenti l'induzione dello stress idrico con parametri fisiologici o ormonali quali conduttanza stomatica (g_s), assimilazione netta e concentrazione di acido abscissico.

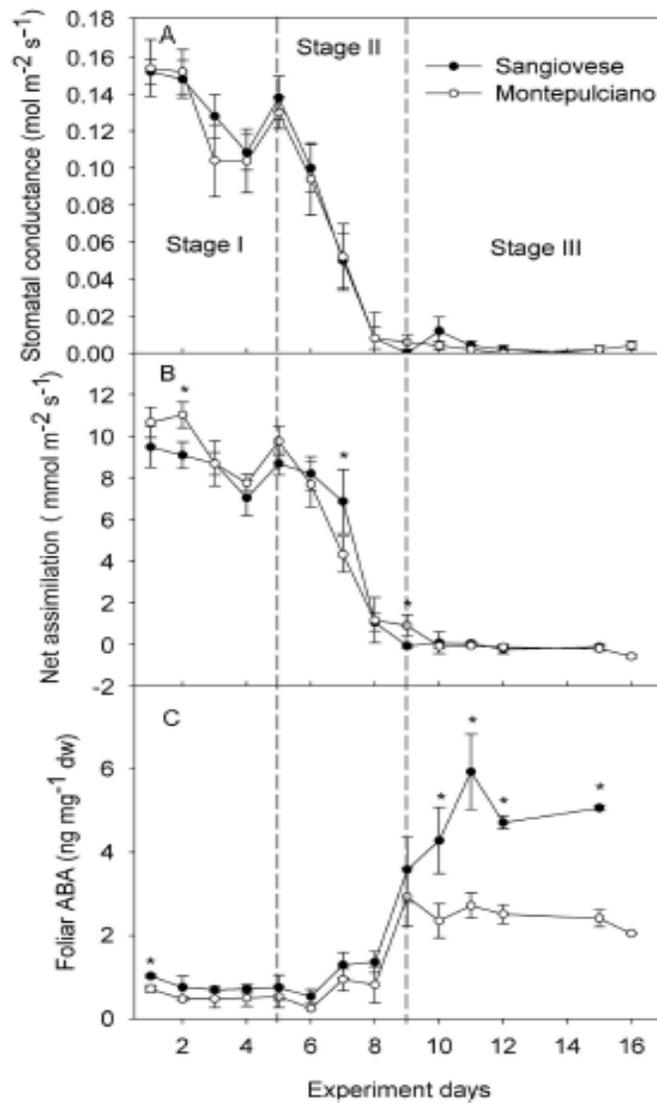


Fig. 2. Variazione della conduttanza stomatica (A); assimilazione netta (B); contenuto di ABA nella foglia (C) misurati a mezzogiorno, in relazione ai giorni seguenti l'induzione dello stress idrico nelle cv Sangiovese e Montepulciano (Tombesi, et al., 2015).

Nella prima fase, dove ancora non si ha una limitazione della disponibilità idrica, la pianta è risultata essere ancora capace di estrarre acqua dal suolo, per cui il parametro g_s non risulta influenzato. I cambiamenti del potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}) in queste condizioni, sono condizionati principalmente dalla resistenza idraulica della pianta e dalla domanda evaporativa dell'aria. Nella seconda fase, quando il contenuto idrico del suolo raggiunge un valore critico $< 0.1 \text{ m}^3$ di acqua per m^3 di suolo, il potenziale idrico dello

stem diminuisce notevolmente in modo da permettere alla pianta di assorbire acqua. Risulta, quindi, una parziale diminuzione della conduttanza stomatica. Infine, nell'ultima fase si ha una maggiore diminuzione del potenziale idrico, generando alti valori di pressioni all'interno dello xilema, con l'aumento del rischio di formazione di embolismi. La pianta risponde a queste condizioni chiudendo gli stomi, evitando che la pressione dello xilema diminuisca molto, ma compromettendo il flusso di acqua. L'andamento della conduttanza stomatica risulta diminuire meno al mattino rispetto al pomeriggio. Questo perché al mattino il bilancio idrico della pianta gode del rifornimento di acqua avvenuto durante la notte (Tombesi, et al., 2015).

1.2.1. RUOLO DELL'ABA NELLA RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO

Il primo step nell'attivazione del meccanismo di risposta della pianta ad un qualsiasi stress è il riconoscimento dello stress stesso da parte della pianta. La perdita d'acqua innesca una serie di segnali che portano ad una risposta biochimica, in cui la principale molecola segnale risulta essere l'acido abscissico (ABA) (Bray, 1997). Uno studio condotto da Kriedeman et al., 1972 ha indagato l'attività dell'ABA come responsabile della chiusura stomatica su diverse specie di piante, dimostrando una notevole velocità di risposta stomatica all'applicazione esogena dell'ormone e una limitata quantità necessaria per avere una riduzione della traspirazione. Analogamente, è stato dimostrato l'aumento della quantità di questo ormone nelle foglie della vite in seguito ad un periodo di stress idrico (Loveys & Kriedemann, 1974). L'azione dell'ABA nel regolare la chiusura stomatica avviene attraverso la depolarizzazione delle membrane delle cellule di guardia, che consente un efflusso degli ioni verso l'esterno e una conseguente perdita di turgore cellulare (Tombesi, et al., 2015). Da tempo è stato accertato che la sintesi di ABA, in funzione delle condizioni idriche del suolo, avviene a livello radicale, per poi essere trasportato fino alle foglie tramite il sistema vascolare, dove esercita la sua azione sugli stomi. Non è ben chiaro se il segnale che determina una risposta stomatica è proveniente unicamente dalle radici o se anche a livello dei tessuti fogliari è possibile la

biosintesi dell'ormone, in funzione ad esempio del potenziale idrico della foglia (Speir, et al., 2013). L'ABA viene sintetizzato nella pianta in due modi, tramite il composto farnesil pirofosfato, oppure attraverso i carotenoidi, principale via di sintesi. La produzione di quest'ultimi avviene nel plastidio. Il primo step nella sintesi dell'ABA è la conversione della zeaxantina in violaxantina attraverso due epossidazioni. A catalizzare queste reazioni è l'enzima zeaxantina epossidasi (ZEP). Successivamente si ha una scissione ossidativa delle xantofille in 9-cis violaxantina e 9-cis-neoxantina, per produrre xantoxine. Questa reazione è catalizzata dall'enzima 9-cis-epossicarotenoide diossigenasi (NCED).

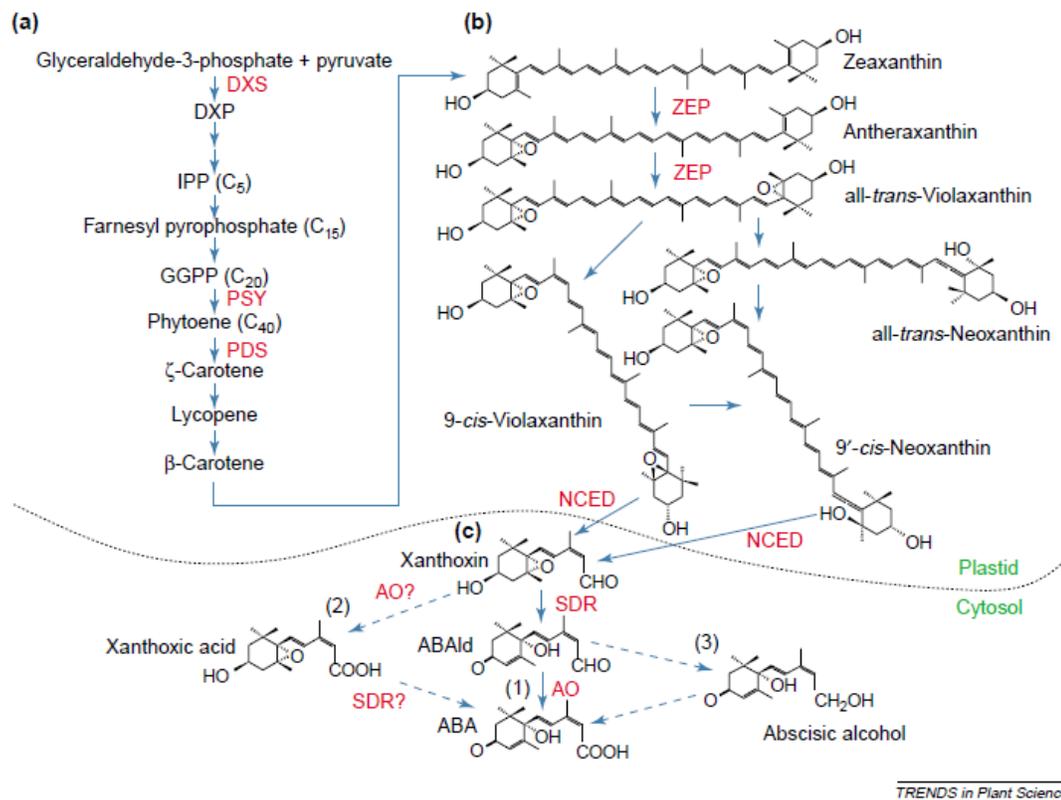


Fig. 3. Percorso biosintetico dell'acido abscissico nelle piante (Seo & Koshiba, 2002).

La conversione delle xantoxine in ABA avviene nel citosol cellulare. Per quest'ultimo passaggio sono state proposte tre vie differenti, attraverso la produzione dell'aldeide abscissica, acido xantossina o alcool abscissico. Studi effettuati su altre specie, come

pomodoro e tabacco, hanno permesso di dimostrare che in situazioni di carenza idrica la sintesi di ABA non è correlata con l'aumento del gene ZEP nelle foglie, ma lo è nelle radici, dove l'espressione del gene ZEP sembra quindi essere fondamentale per regolare la produzione. Al contrario, in pomodoro un'abbondante espressione di LeNCED1 è legata alla produzione di ABA nelle foglie, lasciando presumere il ruolo chiave di tale gene a livello fogliare, nella biosintesi dell'ABA (Seo & Koshiba, 2002).

In vite è stata valutata l'espressione genica coinvolta nella sintesi di ABA in relazione allo stress idrico. Nel genoma della cultivar Shiraz sono stati individuati due geni per la sintesi dell'enzima NCED (VvNCED1 e VvNCED2) ed un singolo gene Zep. In condizioni di stress idrico, a livello fogliare, c'è una riduzione dell'espressione del gene Zep. È stato mostrato che, in questi tessuti, la sua trascrizione non è limitata ad un aumento della concentrazione dell'ormone, al contrario, l'incremento di ABA è legato ad una maggiore presenza di mRNA di VvNCED1 nelle foglie (Soar, et al., 2004).

In viti sottoposte a stress idrico, la conduttanza stomatica delle foglie è inversamente proporzionale alla concentrazione di ABA nella linfa, rilevata a livello del nodo fogliare. Questa relazione non c'è nelle foglie più giovani, probabilmente per una loro non completa attività, in quanto gli stomi non rispondono agli stessi stimoli come avviene invece nelle foglie adulte. Il gradiente di concentrazione di ABA nella linfa e nelle foglie, ha un andamento basipeto, quindi la concentrazione risulta essere maggiore nella parte apicale del tralcio. La differenza di gradiente è plausibilmente dovuta ad una differenza nella conduttività idraulica del nodo fogliare a diversi livelli del tralcio. Il maggiore flusso di linfa nei nodi apicali potrebbe in parte determinare la maggiore concentrazione in questa parte del tralcio, rispetto alla basale, piuttosto che ad una differenza nella traspirazione. Questo lascia pensare che i tessuti apicali sono i principali responsabili della sintesi. Però l'asportazione dell'apice non conferma questa ipotesi, in quanto non si ha un drastico calo della concentrazione a livello basale; tenendo conto anche dei tempi di degradazione che sono nell'ordine di ore. L'importanza del movimento acropeto dell'ABA attraverso il flusso floematico viene escluso, dal momento che operando un'incisione anulare sul tralcio, nell'internodo tra la terza e la quarta foglia, si ha un rapido accumulo dell'ormone nella zona al di sopra dell'incisione. I dati dello studio lasciano intendere che ad influenzare la concentrazione dell'ABA, almeno in parte, ci siano

meccanismi che regolano la sintesi non solo a livello radicale, ma anche più prossimi al sito di azione a livello fogliare (Soar, et al., 2004).

1.2.2. CULTIVAR ISOIDRICHE E ANISOIDRICHE

In vite è stato osservato come cultivar diverse abbiano un differente comportamento nell'apertura o chiusura degli stomi durante periodi di carenza idrica. Per tale ragione le cultivar di vite possono essere definite a comportamento isoidrico o anisoidrico (Tombesi, et al., 2016) rispettivamente, quando in condizioni di stress idrico, sono in grado di mantenere il potenziale idrico fogliare intorno a valori non troppo negativi, riducendo la traspirazione (isoidriche) oppure se, continuando a traspirare, tollerano valori di potenziale idrico molto negativi (anisoidriche) (Charrier, et al., 2018). Montepulciano e Sangiovese sono considerate rispettivamente cultivar isoidriche e anisoidriche e si distinguono, oltre che per caratteristiche biochimiche e morfo-strutturali, anche per il loro comportamento fisiologico in situazioni normali o di stress. In condizioni idriche normali, infatti, il Montepulciano ha un tasso di traspirazione e di assimilazione di CO₂ maggiore del Sangiovese (Tombesi, et al., 2016), ma in condizioni di limitata disponibilità idrica, si ha una diminuzione più veloce di conduttanza stomatica, in funzione dell'aumento del Ψ_{stem} . Infatti, mentre per Montepulciano si registra una drastica diminuzione della conduttanza stomatica (gs) già a partire da valori di Ψ_{stem} inferiori a -0.7 MPa, questo non accade per il Sangiovese, poiché la diminuzione di gs si ha ad un valore di Ψ_{stem} inferiore a -1.0 MPa. La completa chiusura stomatica ad un valore di potenziale più negativo, permette al Sangiovese di avere un tasso di assimilazione netto più alto rispetto al Montepulciano in condizioni di stress, permettendo il mantenimento in Sangiovese di una buona attività metabolica e di un buon livello di Water Use Efficiency (WUE), soprattutto nelle foglie giovani (Tombesi, et al., 2015). Inoltre, in Sangiovese è stata rilevata una capacità della pianta di modificare l'inclinazione delle foglie in modo da ridurre la radiazione diretta e di conseguenza l'eccessivo riscaldamento fogliare e differenze morfo-strutturali delle foglie stesse, che permettono di avere un'efficienza

diversa in situazioni di stress. Il Sangiovese è caratterizzato, infatti, da una bassa assorbanza delle foglie, dovuta ad una minore presenza di clorofilla e carotenoidi, e da una maggiore trasmittanza, grazie al ridotto spessore della foglia. In tal modo, la pianta è in grado di dissipare una maggiore quantità di luce e fuggire ai fenomeni di fotoinibizione cronica. Si è inoltre osservato che tali fenomeni in Sangiovese sono spesso a carico delle sole foglie basali che, se esposte a stress termico e radiativo, vanno incontro a necrosi e abscissione. Nonostante questo meccanismo, non si hanno grandi diminuzioni nell'organizzazione del carbonio né nell'accumulo di carboidrati di riserva. Al contrario, in Montepulciano, non si ha una differenza nell'efficienza fotosintetica delle foglie lungo il germoglio in condizioni di stress. In Montepulciano, infatti, quando le foglie sono esposte a stress multipli estivi, indipendentemente dalla loro età, chiudono gli stomi riducendo la conduttanza stomatica e la fotosintesi netta (P_n) in modo da risparmiare acqua (Paliotti, et al., 2009). La diversa capacità di traspirare tra le varietà pone l'interrogativo se a indurre una diversa risposta stomatica è solo il livello di ABA, quindi dei meccanismi di regolazione attivi, oppure se possano avere un ruolo importante anche meccanismi di regolazione passivi.

La presenza di meccanismi attivi che regolano il movimento degli stomi è considerata un'evoluzione rispetto ai meccanismi di chiusura stomatica passivi. In alcuni phyla meno evoluti, come nelle felci, non è presente alcun meccanismo attivo di chiusura stomatica, mentre in alcune gimnosperme c'è un effetto additivo tra meccanismi attivi e passivi. Poiché nelle angiosperme è stata evidenziata una buona correlazione tra livello di ABA e chiusura stomatica, bisognerebbe considerare l'effetto passivo dovuto al potenziale idrico e quello chimico mediato da sistemi chimici ormonali, non separatamente, ma come complementari e sinergici nella risposta stomatica in seguito a stress idrico (Tombesi, et al., 2015; Tombesi, et al., 2016). A questo scopo, piante di Montepulciano e Sangiovese sono state sottoposte ad un periodo di stress idrico ed è stata determinata la concentrazione di ABA nelle foglie. Durante la prova il valore di ABA è restato al di sotto di 2 ng mg^{-1} , fino a quando non si è avuta la completa chiusura degli stomi. Dopo la chiusura degli stomi si verificava un aumento della concentrazione di ABA del 566% e 418% rispetto alla concentrazione fogliare misurata nei giorni precedenti alla completa chiusura stomatica, in Sangiovese e Montepulciano, rispettivamente. Il fatto che il

Montepulciano mantenga un livello più basso di ABA rispetto a Sangiovese, evidenzia una differente sensibilità per le diverse cultivar nella risposta di apertura degli stomi per effetto dell'ABA. Tuttavia, questi dati potrebbero mettere in discussione il ruolo dell'acido abscissico, nel primo periodo di stress idrico, come induttore della chiusura stomatica anche se non si escludono dei meccanismi molto localizzati che permettono un aumento della sua concentrazione a livello delle cellule di guardia, ma che presentano limiti nella loro misurazione. Viene comunque evidenziato come il livello dell'acido abscissico nelle foglie risulti legato all'aumento del potenziale idrico della foglia (Ψ_{leaf}), suggerendo che il potenziale idrico stesso possa agire da segnale nel regolare la sintesi di ABA. Una volta che si ristabiliscono condizioni idriche non limitanti per la conduttanza stomatica, l'acido abscissico sembra impedire la riapertura stomatica e tale fenomeno potrebbe rappresentare un meccanismo fisiologico che la pianta attua quando si trova in ambienti esposti a ripetuti rischi di siccità. In questo modo sarebbe infatti possibile una più veloce reidratazione dei vasi conduttori e il recupero di una pressione meno negativa nello xilema, in modo da recuperare l'eventuale formazione di embolismi (Tombesi, et al., 2015).

1.3. ADATTAMENTO DELLA VITICOLTURA AL CAMBIAMENTO CLIMATICO E ALLO STRESS IDRICO: RUOLO DELLE FORME DI ALLEVAMENTO

Oltre a considerare i meccanismi intrinseci della pianta, anche il sistema di allevamento agisce sulla regolazione della conduttanza stomatica e sul bilancio idrico in vite (Novello, et al., 1992). Ad influenzare maggiormente l'uso dell'acqua, in condizioni non limitanti di disponibilità idrica, è la quantità di luce intercettata (Williams & Ayars, 2005). I diversi sistemi di allevamento consentono una diversa disposizione spaziale della superficie fogliare, e questo incide oltre che sulla capacità della pianta di intercettare più o meno radiazione luminosa, anche sul microclima all'interno della chioma.

I sistemi di allevamento applicati in viticoltura sono classificati tenendo conto di diverse caratteristiche: la posizione spaziale della chioma, il metodo di potatura e la presenza di cordoni permanenti.

A seconda di tali parametri è possibile distinguere:

1. Forme in volume (alberello);
2. Sistemi in parete a tralcio rinnovato (Guyot) o a cordone permanente (cordone speronato e sylvoz-casarsa);
3. Sistemi a tetto (tendone e pergola)
4. Sistemi a germogli liberi (cordone libero e doppia cortina o GDC) (Pliotti, et al., 2018).

Per mettere in relazione la densità dell'area fogliare della chioma in viti allevate con diversi sistemi di allevamento e la capacità di intercettazione luminosa della chioma, Gladstone & Dokoozlian (2003) hanno confrontato sistemi con germogli liberi , come cordone libero o single curtain (SC) e doppia cortina o double curtain (DB), con sistemi che prevedono un sistema di fili metallici che indirizzano i germogli in verticale, come Vertically shoot positioned (VSP), Smart – Dyson (SD), Smart – Henry (SH) e Lyre (LYR) mostrati in Fig 4.

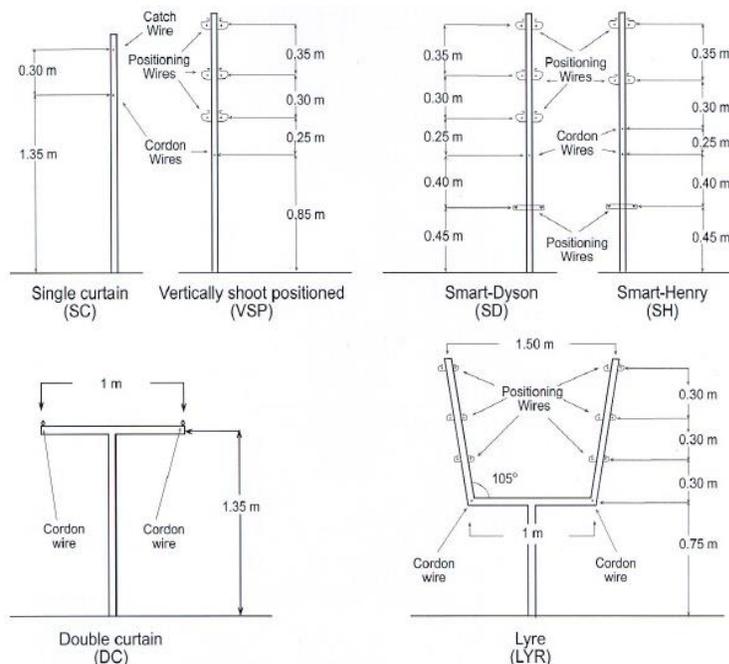


Fig. 4. Configurazione dei diversi sistemi di allevamento (Gladstone & Dokoozlian, 2003).

Da queste prove è emerso che nei sistemi di allevamento prevedono il posizionamento dei germogli uviferi verso l'alto all'interno di fili di contenimento, si ha una più bassa superficie e volume della chioma, rispetto ai sistemi che consentono una libera crescita dei germogli. Nei sistemi con uno sdoppiamento della parete vegetativa, sia indirizzando la crescita dei tralci (lira) che lasciati crescere liberamente (double curtain), c'è un aumento della superficie e del volume fogliare. Il rapporto tra la superficie di area fogliare e il volume è minore nelle forme libere rispetto ai sistemi a parete, indicando, per questi ultimi, una più grande area fogliare rispetto al volume in cui si distribuiscono. Inoltre, la densità dell'area fogliare nei sistemi con parete sdoppiata è minore rispetto alle forme in parete. Anche lo schema di distribuzione della densità fogliare è diverso tra le forme di allevamento. In generale si ha una maggiore densità nei sistemi in cui i tralci sono indirizzati a crescere all'interno di un sistema di fili, poiché il volume a disposizione è minore e si ha una maggiore concentrazione di foglie. In modo opposto, quando i tralci non sono condizionati nella loro disposizione, si ha un maggior volume a disposizione per la loro crescita, quindi la densità fogliare diminuisce. Nel sistema a doppia cortina si hanno valori di densità di area fogliare di $6 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ rispetto ai $12 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ nelle forme a spalliera o lira. In conclusione le forme a parete presentano una maggiore incidenza di radiazione nella area di fruttificazione, mantenendo un'alta densità della chioma ma con una minore stratificazione di foglie. Nei sistemi con una parete vegetativa sdoppiata si ha un migliore microclima, maggiore radiazione all'interno della chioma con minore densità di foglie ma maggiore strato fogliare, in quanto i germogli crescendo coprono la zona adiacente a quella di fruttificazione.

La diversa distribuzione spaziale dei germogli tra i vari sistemi di allevamento determina un differente tasso di fotoni utilizzati per la fotosintesi (PPF) che arrivano all'interno della chioma. Per mantenere un valore efficiente di radiazione, nella zona di fruttificazione, è necessario gestire attentamente la densità di foglie tenendo conto delle caratteristiche della forma di allevamento (Gladstone & Dokoozlian, 2003).

La stretta correlazione tra le condizioni ambientali e la forma di allevamento ha effetti sulle caratteristiche qualitative e quantitative della produzione finale. Quindi per la scelta della più idonea forma di allevamento da adottare, è necessario considerare in primo luogo i parametri climatici. Modificando anche solo una delle caratteristiche nella

disposizione geometrica della chioma, si hanno delle variazioni in termini di bilancio idrico della pianta. Si è osservato che variando la superficie fogliare in una forma di allevamento in parete, tramite l'aumento in altezza del filare da 1,35 m a 1,70 m, si incrementa la quantità di luce intercettata dalla pianta. Di conseguenza il potenziale idrico delle foglie, misurato a mezzogiorno, risulta più negativo nelle piante che ricevono una maggiore radiazione rispetto alle forme di allevamento più basse (Reynolds & Heuvel, 2009). In una prova condotta da Reynolds et al., 1995, sono stati valutati diversi parametri microclimatici in due forme di allevamento diverse: il sistema Geneva Double Curtain (GDC) ed una forma a parete. Con il sistema di allevamento a parete la temperatura dei grappoli è maggiore rispetto al sistema GDC, solo nella prima parte della giornata, per poi eguagliarsi nel corso del giorno. Lo stesso andamento si ha misurando direttamente la temperatura delle foglie. Il tasso di flusso fotonico (PFR) all'interno della chioma è maggiore nel GDC, grazie ad una migliore penetrazione della luce in questa forma di allevamento. Anche il tasso traspirativo e la resistenza stomatica risultano influenzati dal sistema di allevamento, in questa prova il sistema di allevamento in parete ha un tasso traspirativo maggiore rispetto al GDC, di conseguenza il potenziale idrico per quest'ultima forma di allevamento è meno negativo. (Reynolds, et al., 1995).

In una prova condotta in vaso utilizzando la cultivar Sangiovese, presso l'Università di Bologna, è stata valutata l'efficienza dell'uso dell'acqua e della luce confrontando due sistemi di allevamento: una forma di allevamento chiusa (con potatura a Guyot) con una forma aperta ("V"). I risultati ottenuti sono analoghi a quanto riportato prima in termini di ricezione della luce. La forma chiusa ha riscontrato un'intercettazione luminosa maggiore nella prima parte della giornata, fino a mezzogiorno, rispetto alla forma aperta che ha invece il massimo dell'intercettazione nel periodo più caldo della giornata. Il diverso andamento dell'intercettazione durante il giorno tra i due sistemi di allevamento quindi comporta un diverso tasso traspirativo e richiesta d'acqua. Nel periodo più caldo della stagione la richiesta traspirativa di queste piante è stata tra i 2 e i 5 L per pianta al giorno. Tenendo conto della stessa superficie fogliare tra le viti, la chioma chiusa ha mostrato, nel corso della stagione, una richiesta d'acqua maggiore. Analizzando l'andamento della traspirazione durante il corso della giornata si sono evidenziate delle differenze tra le due forme: una maggiore intercettazione luminosa nella forma chiusa durante le prime ore

della giornata ha comportato un più alto tasso traspirativo rispetto alla forma aperta. Nelle ore centrali della giornata è stata registrata invece una diminuzione della traspirazione per entrambe le forme, anche se in modo più marcato nella chioma chiusa. Infine, solo per quest'ultima si è avuta una ripresa della traspirazione durante la prima parte del pomeriggio (Valentini, et al., 2019). La diversa capacità della chioma di intercettare la radiazione solare influenza la temperatura delle bacche e delle foglie, per cui risulta non facile considerare separatamente l'effetto della temperatura e della luce, nello studio di una forma di allevamento. Un diverso livello di temperature che si osserva tra i sistemi di allevamento influisce anche sulla quantità delle uve alla raccolta, e sulla loro composizione.

Le forme di allevamento con una conformazione aperta della chioma, ad esempio con una struttura a "U" o "V", consentono un'ottimale esposizione alla luce dei grappoli e un livello termico non eccessivo che permette di avere un valore più alto di °Brix. La temperatura influenza fortemente la composizione delle bacche, in particolare il loro profilo aromatico. In climi freddi, l'utilizzo di sistemi di allevamento che permettono una migliore esposizione dei frutti alla luce ha generalmente un effetto positivo. Al contrario, nei climi caldi un'eccessiva esposizione dei grappoli alla radiazione può pregiudicare la loro qualità finale. Nelle uve rosse, le bacche ben esposti alla radiazione luminosa, hanno un contenuto antocianico e fenolico più alto rispetto a quelle ombreggiate (Reynolds & Heuvel, 2009) a patto che l'esposizione alla luce non comporti un eccessivo aumento della temperatura (Movahed, et al., 2016). Quindi, la sintesi degli antociani è direttamente influenzata sia dall'esposizione alla luce che dalla temperatura.

1.4. SINTESI E ACCUMULO DEGLI ANTOCIANI NELLE BACCHE: EFFETTO DI STRESS TERMICI E IDRICI

Le piante sintetizzano una grande varietà di flavonoidi che sono in grado di espletare diverse funzioni biologiche. In *Vitis vinifera* i principali flavonoidi presenti sono antociani,

proantocianidine e flavonoli. La loro presenza determina la qualità, il colore e i benefici salutistici del vino (Bogs, et al., 2006).

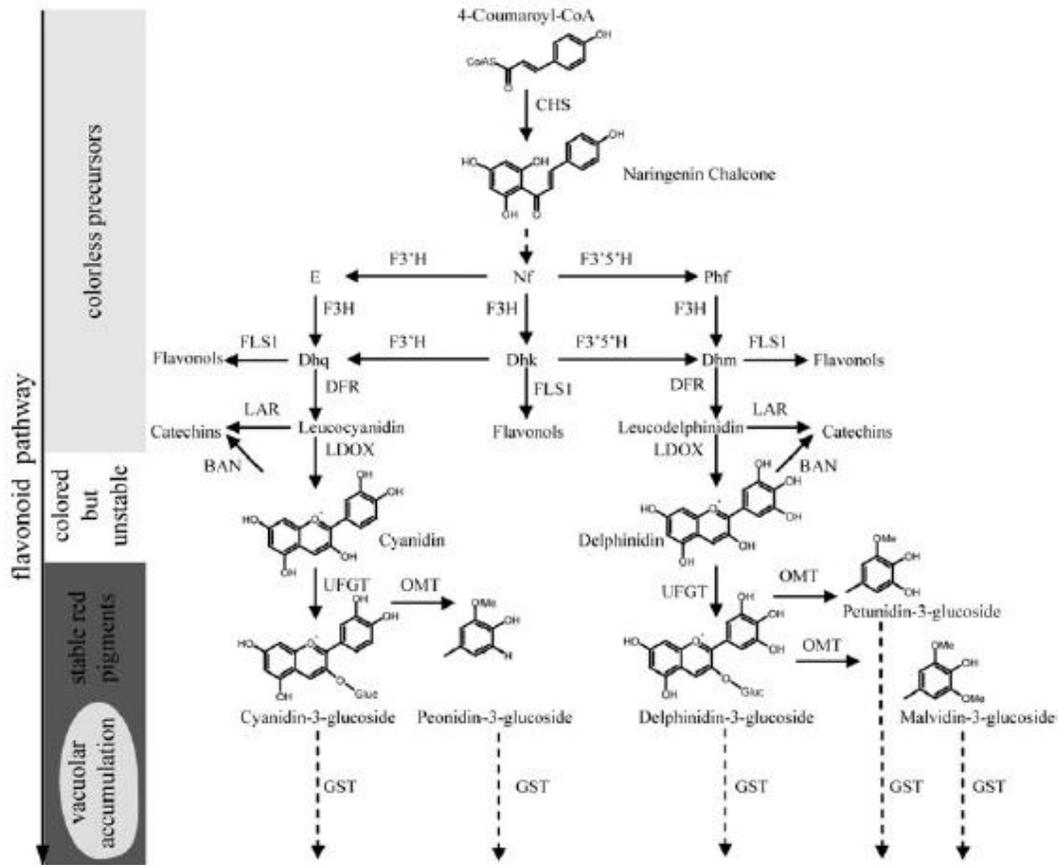


Fig. 5. Principali fasi nel percorso biosintetico dei flavonoidi che porta alla sintesi degli antociani (Castellarin, et al., 2007).

In Fig 5 viene illustrato il percorso biosintetico degli antociani che inizia in fase di invaiatura e prosegue durante il corso della maturazione. Nelle prime fasi della via biosintetica degli antociani si formano composti intermedi, che possono agire come substrati per la produzione di molti altri metaboliti secondari in vite. La fenilalanina ammonio liasi (PAL) è l'enzima che agisce per primo nella sintesi degli antociani, catalizzando la sintesi di acido cinnamico dalla fenilalanina. Successivamente l'acido cinnamico è trasformato in acido p-cumarico. In seguito, con l'aggiunta del Coenzima-A si ha la produzione di trans-4-cumaroil-CoA. Il primo flavonoide prodotto è il calcone,

grazie all'enzima calcione sintasi (CHS) e tramite la condensazione con tre molecole di malonil-CoA. Il calcione è poi trasformato in flavoni dall'enzima calcione isomerasi (CHI). Da qui inizia un percorso biosintetico parallelo che porta alla formazione di cianidina o delphinidina. Gli enzimi flavonoid- 3'-idrossilasi (F3'H) e flavonoid- 3,5 idrossilasi (F3'5'H) sono responsabili di reazioni di idrossilazione e di-idrossilazione. Da qui la via biosintetica si dirama in due percorsi paralleli: dall'enzima F3'H si ottiene cianidina con spettro cromatico nel rosso, invece dall'attività di F35H si avrà la delphinidina, composto con spettro cromatico nel blu. L'enzima di-idroflavonol- 4-reduttasi (DFR) catalizza la reazione di conversione che determina la formazione delle proantocianidine. La riduzione nella posizione 4 dell'anello C produce leucocianidine e leucodelphinidine. L'enzima che interviene nel passaggio successivo è la leucoantocianidina diossigenasi (LDOX), producendo un composto incolore (2-Flaven-3,4-diolo). Quest'ultimo viene convertito in antocianidine: cianidina e delphinidina. Le antocianidine vengono stabilizzate tramite l'aggiunta di un residuo glucosidico in posizione 3 dell'anello C. Questa reazione è catalizzata dall'enzima flavonoid-3-O-glucosiltransferasi (UFGT). In nessuna specie di *Vitis vinifera* si ha la produzione di 3,5 diglucoside. Le antocianine andranno incontro a successive modificazioni: metilazioni e acilazioni. I derivati di cianidina e delphinidina si distinguono per il numero di gruppi sostituenti in di-sostituiti e tri-sostituiti rispettivamente. L'aggiunta di un gruppo metile in posizione 3 nella cianidina porta alla sintesi di peonidina. La metilazione interessa anche la delphinidina, questa avviene sia in posizione 3 che in posizione 3 e 5, producendo petunidina e malvidina rispettivamente. Le antocianine sono sintetizzate nel citosol, ma data la loro presunta tossicità nel citoplasma, vengono trasferite nel vacuolo (Angelakis, 2009). Una ridotta sintesi di antociani in piante mutanti è stata attribuita ad un cambiamento nell'attività di geni strutturali. I fattori di trascrizione che agiscono nella regolazione dei geni strutturali sono appartenenti alle famiglie MYB, bHLH e WD40. I fattori di trascrizione MYB risultano specifici nella regolazione dei flavonoidi, mentre, i bHLH mostrano una ridondanza nella loro azione. La capacità di *VvMybA1* di regolare la via biosintetica degli antociani è stata dimostrata sottoponendo delle piante a trattamenti ormonali e con l'ombreggiamento. Monitorando la quantità di mRNA dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella sintesi e del fattore di trascrizione *VvMybA1*, si è avuta una minore trascrizione di MYB nel trattamento con

ombreggiamento dei grappoli, ma si è osservata anche una minore trascrizione di UFGT e di tutti gli altri geni coinvolti nella sintesi. Per cui è possibile ipotizzare che *VvMybA1* sia responsabile della regolazione non solo di UFGT, ma anche di altri geni coinvolti nella sintesi degli antociani (Jeong, et al., 2004). La concentrazione di antociani è molto diversa nelle diverse cultivar e ciò è dovuto non solo alla componente genetica, ma anche alle condizioni climatiche nel corso della stagione e alla gestione del vigneto. L'esposizione dei grappoli alla radiazione luminosa gioca un ruolo importante nella determinazione della concentrazione finale degli antociani. Monitorando la concentrazione di antociani nella bacca, si sono rilevate infatti differenze tra bacche la cui maturazione era avvenuta in condizioni di buona esposizione luminosa e quelle maturate in ombra, dove la concentrazione risultava in generale più bassa durante le prime fasi di accumulo, mentre le differenze tendevano ad appiarsi con il procedere della maturazione. Questi risultati dimostrano che la luce è un fattore limitante durante le prime fasi di maturazione per l'accumulo di antociani in vite. A parità di condizioni luminose, l'accumulo di antociani può differenziarsi anche per l'azione della temperatura (Haselgrove, et al., 2000). Per studiare la relazione tra temperatura e metabolismo degli antociani vengono utilizzate strutture in cui è possibile controllare i parametri climatici come camere di crescita, fitotroni e serre. Si è visto che con temperature giornaliere di 15°C si ha un aumento della colorazione in diverse varietà come: Pinot Noir e Tokay, mentre con temperature superiori a 35°C si registra una diminuzione o completa inibizione nella sintesi di antociani (Spayd, et al., 2002). Piante di Sangiovese poste a due regimi termici diversi dalle fasi precedenti l'invasatura fino alla raccolta hanno evidenziato un andamento diverso nell'accumulo di antociani. Le piante sottoposte ad alti regimi termici (media di 22.2°C) che determinano alte temperature nelle bacche (superiori ai 40°C), hanno un contenuto di antociani molto più basso rispetto alle piante sottoposte a temperature più basse (media 20.3°C), già a 20 giorni dopo l'invasatura (Movahed, et al., 2016).

In pieno campo è possibile condizionare il microclima attorno al grappolo agendo su diversi fattori. L'orientamento del filare deciso in fase di impianto del vigneto gioca un ruolo principale in questo senso, poiché in un filare con orientamento Nord-Sud, i grappoli esposti ad Est avranno temperatura più alta prima di mezzogiorno, mentre nel pomeriggio sarà la parte esposta ad Ovest ad avere una temperatura massima, dove si registra il

maggior numero di ore con temperature comprese tra 35 e 40°C. Valutando la concentrazione degli antociani nella buccia di bacche esposte a Est o a Ovest, si è avuto il valore più alto per le bacche raccolte nella parte Est, un livello intermedio per le bacche ombreggiate e il livello più basso nella sezione del vigneto esposta a Ovest. Il basso contenuto antocianico in questa parte della chioma è dovuto alle alte temperature che causano un'inibizione della loro sintesi o un aumento della loro degradazione (Spayd, et al., 2002). Risultati simili sono stati ottenuti anche in uno studio condotto su Cabernet Sauvignon, dove l'incremento degli antociani nella buccia dell'acino si ha fino a quando, nel lato esposto a Sud, più caldo, la PAR raggiungeva un valore compreso tra 51 e 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, mentre nella parte Nord, più fresca, l'accumulo di antociani continuava anche con valori più alti di PAR (Bergqvist, et al., 2001).

Una gestione della chioma che permetta una buona penetrazione della luce necessaria per la sintesi degli antociani, ma allo stesso tempo consenta la protezione delle bacche da un eccessivo calore, risulta la condizione migliore per assicurare un buon livello di antociani (Haselgrove, et al., 2000).

La concentrazione degli antociani è condizionata oltre che da fattori termici e luminosi, anche dalla disponibilità idrica. In particolare, la presenza di stress idrici, pare avere un'azione positiva sull'accumulo degli antociani. Questo effetto può essere dovuto per una riduzione nella crescita della bacca; una maggiore evaporazione di acqua dalla bacca risultando in una concentrazione dei soluti; modifica nell'espressione dei geni chiave della via biosintetica degli antociani (Geròs, et al., 2016).

In una prova con la varietà Tempranillo, (Santesteban, et al., 2001) è stato valutato l'effetto di due regimi di irrigazione sui parametri di qualità delle uve e in particolare sull'accumulo di antociani nella bacca. Sono state confrontate tra loro piante che hanno subito un solo stress idrico nella fase di completo sviluppo della bacca con piante che hanno ricevuto un ulteriore stress, di minore intensità, dopo l'inizio dell'invaiaitura. Il contenuto di antociani (espresso in mg L^{-1}) è risultato maggiore nelle piante che hanno subito una riduzione dell'irrigazione rispetto al controllo. Lo stress idrico ha un effetto sulla riduzione della taglia della bacca determinando un aumento della concentrazione dei polifenoli. Infatti se questo parametro viene espresso come singola bacca ($\mu\text{g bacca}^{-1}$), il valore più alto si ha solo nelle piante che hanno subito un secondo stress idrico dopo

l'invasatura. Poiché non ci sono differenze nella dimensione delle bacche tra i due regimi di stress, la diminuzione della disponibilità idrica in fasi avanzate del ciclo colturale ha sicuramente un effetto sulla biosintesi degli antociani che non può essere imputata alla grandezza dell'acino (Santesteban, et al., 2011).

Attraverso studi molecolari condotti sulla varietà Merlot, è stato ipotizzato che lo stress idrico possa indurre una modificazione del metabolismo secondario, rimodulando l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi degli antociani, i quali risultano attivamente stimolati da condizioni di stress. Monitorando l'espressione dei geni coinvolti nella via biosintetica è stato infatti evidenziato un aumento dell'espressione di CHS, LDOX, DFR e del fattore di trascrizione *VvMybA1* dalla fase di invasatura nelle bacche sottoposte a stress idrico (Castellarin, et al., 2007).

1.5. SCOPO DELLA TESI

Nell'attuale contesto di cambiamento climatico numerosi studi sono stati condotti per individuare gli effetti di stress multipli dovuti all'incremento delle temperature diurne e notturne e allo scarso apporto idrico sulla fisiologia della vite e sulla maturazione dell'uva. La comparsa di frequenti estati calde e siccitose anche in Emilia-Romagna, rende ormai necessaria la conoscenza approfondita degli effetti che tali condizioni climatiche possano avere sulla viticoltura di questa regione e sulle varietà in essa più coltivate, come il Sangiovese. Per tale ragione, l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare come l'imposizione di uno stress idrico attraverso la riduzione dell'irrigazione (apporti idrici pari al 50 % rispetto alle piante di controllo) per 12 giorni intorno all'invasatura in Sangiovese, possa condizionare la fisiologia e la maturazione dell'acino attraverso un approccio multidisciplinare in cui sono state integrate analisi di tipo fisiologico, biochimico e molecolare, focalizzando in particolare l'attenzione sulla biosintesi degli antociani.

2. MATERIALI E METODI

2.1. MATERIALE VEGETALE

Lo studio è stato condotto durante la stagione 2018 presso l'azienda agraria dell'Università di Bologna situata a Cadriano (Bologna), utilizzando 8 piante di 8 anni in vaso di *Vitis vinifera* precedentemente uniformate per numero di germogli e di grappoli (circa 11 per pianta), appartenenti alla varietà Sangiovese innestate su SO4. Le piante sono state allevate in vasi di 30 L, orientate lungo l'asse Nord-Sud, disposte ad una distanza di 1 m lungo la fila.

Le piante sono state allevate a cordone speronato bilaterale impalcato ad un'altezza di 90 cm, mantenendo circa 20 gemme per pianta e successivamente uniformate in modo da mantenere 11 grappoli per pianta. La chioma è stata gestita secondo una conformazione a "V", con il posizionamento dei germogli su fili superiori opportunamente posizionati in modo da permettere l'apertura della chioma, tramite uno sdoppiamento dei germogli uviferi a rappresentare una forma di allevamento "aperta". Durante l'intero corso della stagione sono stati registrati i parametri microclimatici (temperatura massima, media, minima e valori di umidità relativa) mediante una stazione meteorologica situata nei pressi del campo sperimentale.

Ad inizio invaiatura le 8 piante in prova sono state suddivise in due tesi, di 4 piante ciascuna: nelle piante controllo (C), non trattate, sono stati forniti 4 L di acqua al giorno, mediante tre turni di adacquamento giornalieri di 20 minuti ciascuno, tramite l'uso di due gocciolatori (2L all'ora) per pianta, nelle ore di minore traspirazione; nelle piante sottoposte a stress idrico (WS), l'apporto irriguo è stato ridotto del 50% (2L di acqua al giorno) nel periodo dal 30\07 al 10\08. Successivamente nelle piante della tesi WS è stato ristabilito lo stesso regime idrico delle piante C fino alla raccolta.

2.2. ANALISI FISILOGICHE E DEI COMPONENTI DELLA PRODUZIONE ALLA VENDEMMIA

2.2.1. MONITORAGGIO DELLO STATO IDRICO DELLE PIANTE E DELLA TEMPERATURA DEGLI ACINI

Il monitoraggio dell'uso dell'acqua è stato condotto su 4 piante per tesi durante l'intera fase vegetativa, misurando le perdite di acqua (E) tramite l'utilizzo di bilance mod. LAUMAS (ABC bilance, Campogalliano, IT), posizionate sotto ogni vaso. La portata massima di ogni bilancia è di 60 Kg con una sensibilità di 20 g. La variazione di massa del vaso è stata registrata ogni 10 minuti grazie ad un datalogger CR1000 (Campbell Scientific, Inc., USA). Su ogni vaso è stato posto un film plastico, opportunamente legato al tronco e ricoperto con carta riflettente, in modo da evitare le perdite di acqua dal terreno. Questo sistema ha permesso di calcolare la perdita di acqua, avvenuta per la sola traspirazione delle foglie, come differenza di massa tra il valore più alto coincidente con la fine di un turno di irrigazione, aspettando che avvenisse un opportuno sgrondo dell'acqua in eccesso, e il valore minore registrato prima dell'inizio del turno di adacquamento successivo.

Il potenziale idrico del germoglio (Ψ_{stem}) è stato misurato a mezzogiorno, utilizzando una foglia basale e due foglie apicali per pianta, con l'ausilio della camera di Scholander (Soilmoisture Equip. Corp., Santa Barbara, CA, USA). Le foglie, prima della misurazione, sono state condizionate per 1 ora racchiudendole all'interno di un foglio di alluminio e tenute in ombra. La misurazione del potenziale idrico del germoglio è stata fatta in diversi momenti durante la maturazione corrispondenti rispettivamente a 48 ore (01/08), 96 ore (03/08), 12 giorni (10/08) dall'imposizione dello stress idrico. Un ultimo rilievo è stato infine effettuato a 20 giorni dal ristabilimento del normale apporto irriguo (30/08).

Inoltre, sono state rilevate le temperature dei grappoli per le piante di entrambe le tesi, nei giorni 01/08 e 10/08, mediante un termometro a infrarossi IR-20 (dr. Meter, CHN).



Fig. 6. Foto della stazione sperimentale in cui è stata condotta la prova (A); (B); (C); (D).

2.2.2. MISURA DELL'AREA FOGLIARE E COMPONENTI DELLA PRODUZIONE ALLA VENDEMMIA

Alla vendemmia (14/09) ciascuna pianta appartenente alle tesi C e WS è stata vendemmiata separatamente e valutando numero di grappoli, produzione (numero e kg per pianta) e peso medio dei grappoli.

Le piante sono state poi completamente defogliate e le singole foglie scannerizzate per valutare l'area fogliare per pianta utilizzando un fogliarimetro da tavolo mod. LI-3000A (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

2.3. ANALISI DELLA MATURITA' TECNOLOGICA

Durante la maturazione, in corrispondenza dei rilievi fisiologici e alla vendemmia (14/09) sono stati campionati 30 acini da ciascuna delle 8 piante in prova per monitorare la maturità tecnologica. Gli acini sono stati raccolti, ammostati e il mosto ottenuto sottoposto ad analisi dei solidi solubili (°Brix) mediante l'utilizzo di un rifrattometro (mod. Maselli R50), e alla valutazione del pH e acidità totale (grammi/L di acido tartarico) con l'utilizzo di un titolatore mod. Crison Compact Tritator (Crison Instruments, Barcellona, ES).

2.4. ANALISI DEGLI ANTOCIANI TOTALI TRAMITE HPLC

Per l'analisi della concentrazione antocianica e dell'espressione genica sono stati campionati 20 acini per pianta dalle 4 piante C e WS durante la maturazione, in corrispondenza dei campionamenti per le analisi fisiologiche e di maturità tecnologica e alla vendemmia. Gli acini sono stati tagliati con delle forbicine e i 4 campioni appartenenti allo stesso trattamento sono stati riuniti in un pool unico. Ogni pool di campioni è stato poi suddiviso in 3 sub-campioni e ciascuno è stato immediatamente congelato in azoto liquido. Gli acini campionati sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi, quando dagli acini ancora congelati sono state prelevate le bucce che sono state poi macinate in mortai preraffreddati, mantenendole congelate grazie all'uso di azoto liquido. Il processo di estrazione degli antociani è stato condotto secondo il protocollo di Mattivi et al. (2006), che prevede l'estrazione in metanolo al 100% a temperatura ambiente e al buio per 24 ore in modo da favorire al massimo il passaggio degli antociani in soluzione. Successivamente la soluzione è stata filtrata e sottoposta a separazione tramite uno strumento HPLC Waters 1525 (Waters, Milford, MA, USA) provvisto di rilevatori a diodi (DAD), attraverso una colonna a fase inversa Phenomenex C18 (Castel Maggiore, 18 Bologna, Italia). Le antocianine, rilevate a una lunghezza d'onda di 520 nm, sono state quantificate come equivalenti di malvidina-3-glucoside (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e il contenuto di antociani totali è stato espresso in mg per g di buccia.

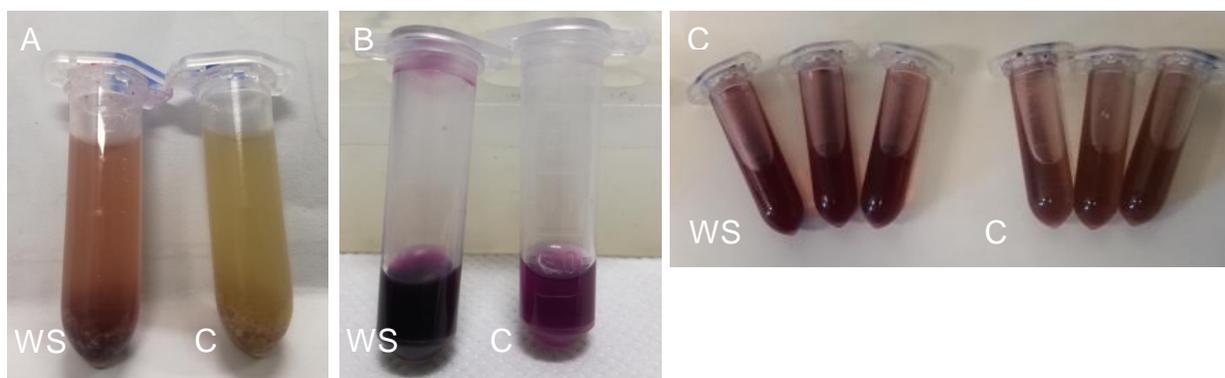


Fig. 7. Differenza nell'estrazione degli antociani tra i campioni C e WS in data 03/08 (A); 10/08 (B); 30/08 (C).

2.5. ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA

L'espressione genica è stata valutata sugli acini campionati come precedentemente descritto durante la maturazione in 4 diverse date corrispondenti a 48 ore (01/08), 96 ore (03/08), 12 giorni (10/08) dall'imposizione dello stress idrico e a 20 giorni dal ristabilimento del normale apporto irriguo (30/08).

Successivamente, le fasi principali dell'analisi dell'espressione genica possono essere riassunte nel modo seguente:

- Estrazione di RNA dagli acini con valutazione quali/quantitativa dell'estratto
- Retrotrascrizione di RNA in cDNA
- Real-time PCR quantitativa

2.5.1. ESTRAZIONE DI RNA

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita seguendo le istruzioni fornite dal protocollo Kit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

Gli acini conservati a -80°C sono stati sbucciati e macinati manualmente in mortai, mantenendo una bassa temperatura, al fine di prevenire la degradazione dell'RNA, con l'utilizzo di azoto liquido. La polvere ottenuta è stata posta in eppendorf da 2 mL pesando circa 400 mg di ogni campione.

Ad ogni campione sono stati quindi aggiunti 850 μL di soluzione di lisi. I campioni sono stati quindi posti in bagnetto riscaldato a 56°C per 10 minuti e successivamente centrifugati alla massima velocità per 5 minuti per permettere la separazione del materiale cellulare in seguito all'azione della soluzione di lisi. Nelle fasi successive si ha la vera e propria estrazione dell'RNA in cui sono stati utilizzati prima dei filtri che permettono il passaggio anche degli acidi nucleici, quindi l'utilizzo di colonne di Binding e l'aggiunta di Binding solution, che invece intrappolano l'RNA al filtro per permettere diversi passaggi di pulizia.

L'ultimo step prevede l'aggiunta di Elution Buffer che permette il passaggio dell'RNA dal filtro sul fondo della provetta.

La valutazione dell'RNA estratto viene fatta con uno spettrofotometro (Nanodrop ND-1000, Themoscientific, Wilmington, Delaware, USA). Questo strumento, oltre a determinare la concentrazione in $\text{ng}/\mu\text{L}$, permette di valutare tramite l'assorbanza (ABS) dei campioni di RNA nello spettro dell'UV la sua purezza e l'eventuale contaminazione di residui fenolici o di carboidrati. Vengono presi in considerazione i rapporti di assorbanza nelle lunghezze d'onda $260/230$ e $260/280$ e ritenuti ottimali valori ≥ 1.80 .

2.5.2. RETROTRASCRIZIONE E PCR DI CONTROLLO DEL cDNA

Per eliminare l'eventuale presenza di contaminazione da DNA nei campioni, i campioni sono stati sottoposti a trattamento con DNasi RQ1 (Promega, Madison, USA). Per la retrotrascrizione si è quindi utilizzato l'enzima Improm-II (Promega, Madison, USA). L'esito positivo della retrotrascrizione è stato valutato attraverso PCR con i primer del gene costitutivo actina e successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio.

2.5.3. ANALISI REAL TIME PCR

Il cDNA ottenuto è stato diluito 1:20 e ad esso è stata aggiunta la master mix, composta dai diversi reagenti necessari per l'amplificazione. Nella master mix è presente SYBR GREEN (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), un fluoroforo capace di intercalarsi al doppio filamento di cDNA. Caratteristica principale di questa molecola è l'assorbimento di radiazione luminosa nello spettro del blu ed emissione di luce nella lunghezza d'onda del verde. La sua attività di emissione luminosa viene sfruttata per quantifica i frammenti di cDNA presenti. Le analisi sono state condotte utilizzando lo strumento ABI PRIMIS StepOnePlus (AppliedBiosystem, Foster City, CA, USA). Ogni campione di cDNA è stato analizzato per 4 geni della via biosintetica degli antociani più due geni costitutivi, actina e ubiquitina necessari per avere una quantificazione relativa dell'espressione dei geni studiati. I 4 geni coinvolti nel percorso biosintetico degli antociani analizzati sono UFGT (glucosio UDP: flavonoide 3-O-glucosiltransferasi); LDOX (leucoantocianidina diossigenasi); DFR (diidroflavonolo reductasi) e MYBA1. Tutti i primers per i geni analizzati sono stati selezionati in letteratura: la sequenza dei primer del gene per l'actina sono riportati in Pastore et al., (2011), quelli per l'ubiquitina in Bogs et al., (2005), DFR, LDOX e UFGT in Goto-Yamamoto et al., (2002), MYBA1 in Jeong et al., (2004). L'analisi dei dati di espressione genica è stata effettuata calcolando l'espressione media normalizzata (MNE), come riportato da Simon et al. (2003).

2.6. ANALISI STATISTICA DEI DATI

I parametri agronomici e i dati biochimici e molecolari sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) con il software statistico SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA), utilizzando tre repliche biologiche per ogni trattamento.

3. RISULTATI

3.1. EFFETTI DELLO STRESS IDRICO SULLA FISIOLOGIA DELLA PIANTA, LA MATURAZIONE E I PARAMETRI VEGETO PRODUTTIVI ALLA VENDEMMIA.

I valori di temperatura massima, minima e media dell'aria forniti dalla stazione meteorologica posizionata in prossimità del campo sperimentale, dal periodo di inizio dello stress idrico (30/07/2018) fino alla raccolta (14/09/2018), sono riportati in Fig.8.

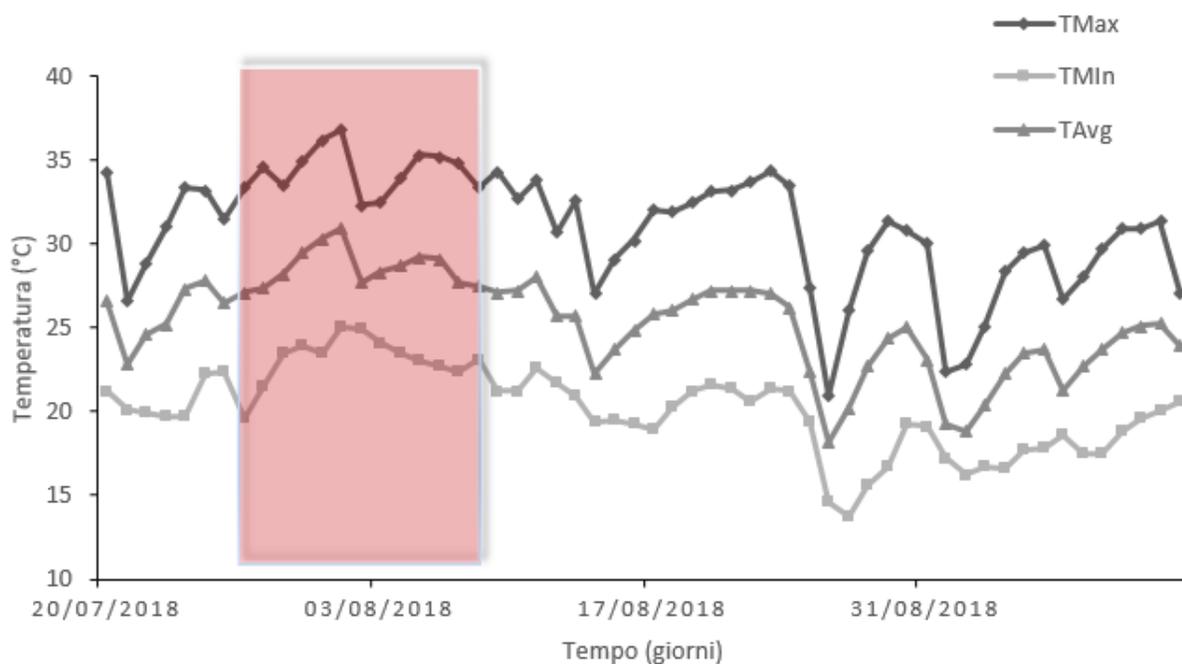


Fig. 8. Andamento delle temperature massime, minime e medie nella fase di maturazione.

L'andamento termico durante il periodo in cui è stato imposto lo stress indica temperature medie pari a circa 28°, mentre la temperatura massima ha raggiunto il valore di 36 °C e le temperature minime non sono scese al di sotto dei 21°C.

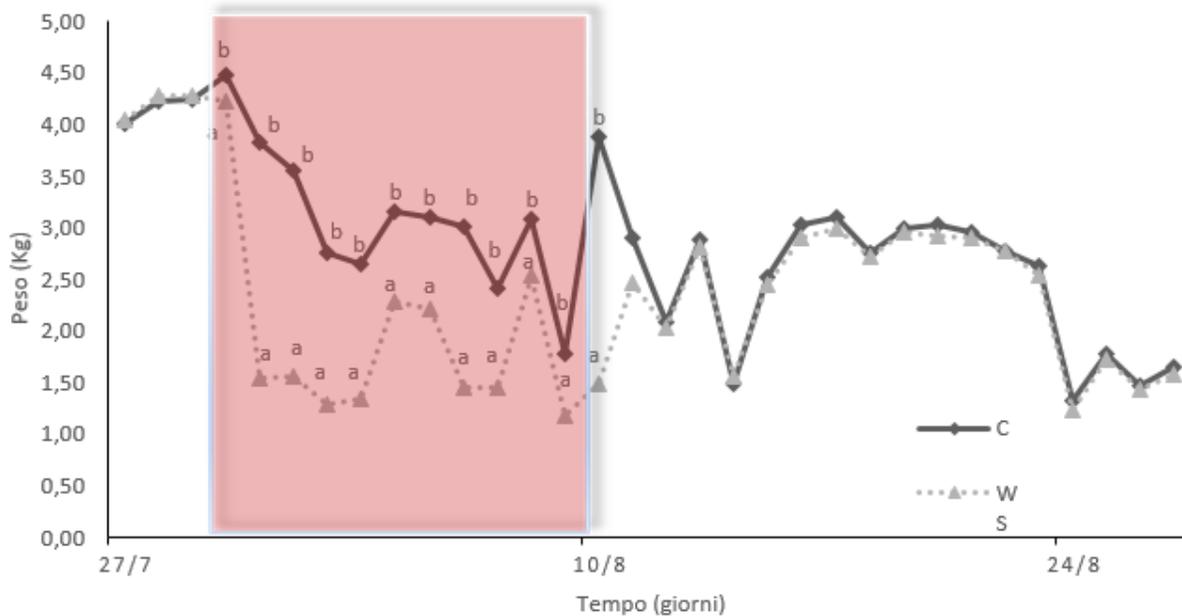


Fig. 9. Andamento della traspirazione espresso in Kg di acqua in piante C e WS. In corrispondenza di ogni data le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

In Fig. 9 sono riportati i valori della traspirazione delle piante C e WS durante la fase di maturazione, forniti dalle bilance poste al di sotto dei vasi ed espressi in peso. All'inizio del periodo di stress idrico si registra una diminuzione sostanziale della traspirazione nelle piante WS rispetto alle piante C, e questa differenza si mantiene per l'intero periodo del trattamento. Dalla fine del periodo di stress idrico (10/08/2018) i valori di traspirazione risultano simili in entrambi i trattamenti fino alla raccolta. Durante il periodo del trattamento si osserva una generale diminuzione della traspirazione anche nelle piante C, in concomitanza con l'aumento delle temperature dell'aria osservato in questa fase.

	C	WS
01/08	34,1 ± 0,55 a	37,1 ± 0,55 a
10/08	30,5 ± 1,05 b	34,7 ± 0,85 b

Tab. 1. Temperature del grappolo espresse in gradi centigradi ($^{\circ}\text{C}$) in piante C e WS. Per colonna, lettere diverse se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

La diminuzione della traspirazione delle piante WS durante l'imposizione dello stress idrico determina, una temperatura maggiore dei grappoli, rispetto ai rilievi effettuati sulle piante C.

In tabella 1 sono riportate le temperature misurate sul grappolo alle ore 12:00 in due rilevamenti effettuati in corrispondenza del primo e del 10 Agosto .

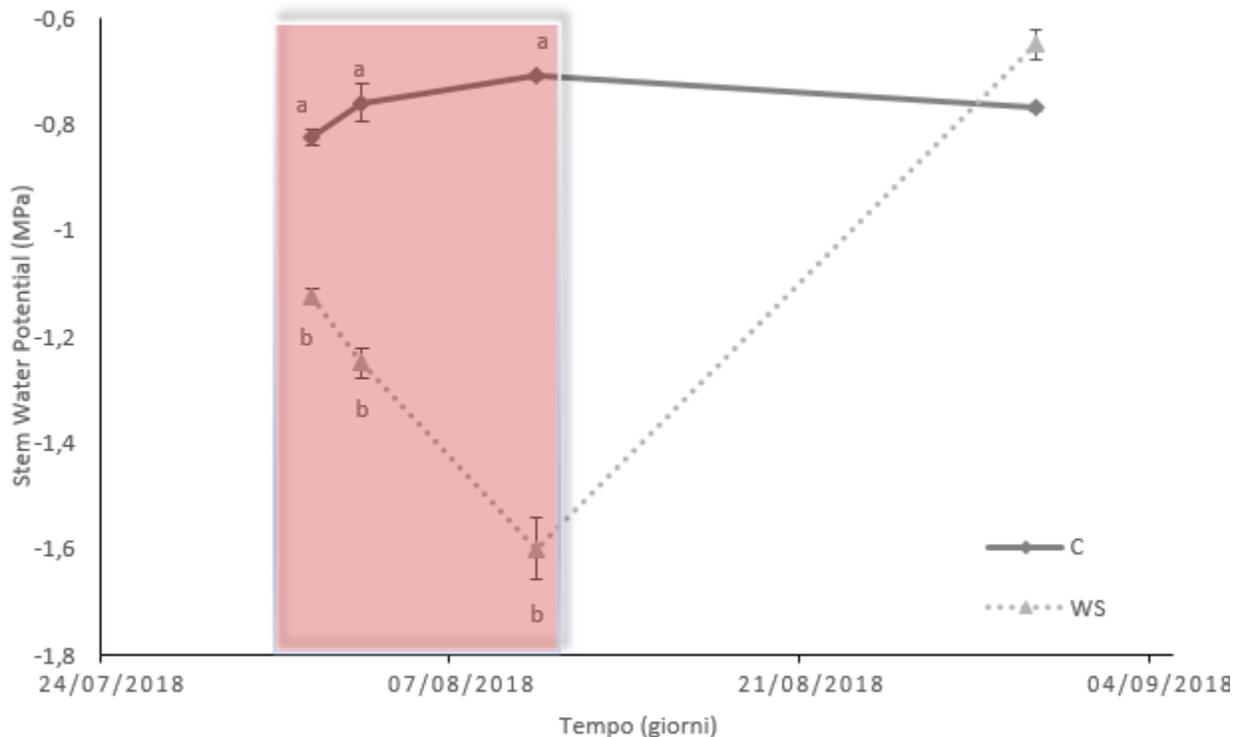


Fig. 10. Andamento del potenziale idrico del fusto espresso in MPa in piante C e WS. In corrispondenza di ogni data le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

In Fig. 10 sono riportati i valori di potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}) rilevati dopo l'induzione dello stress. Come si può osservare le piante WS hanno ridotto il proprio potenziale idrico in conseguenza della riduzione della disponibilità idrica. Tale diminuzione continua durante il periodo di stress, raggiungendo il valore minimo di -1,6 MPa nell'ultimo rilievo prima del re-watering. La ripresa della traspirazione dopo il ripristino delle condizioni idriche normali in WS viene confermato anche dal recupero del Ψ_{stem} , raggiungendo valori simili alle piante C nel rilevamento fatto il 30/08/2018.

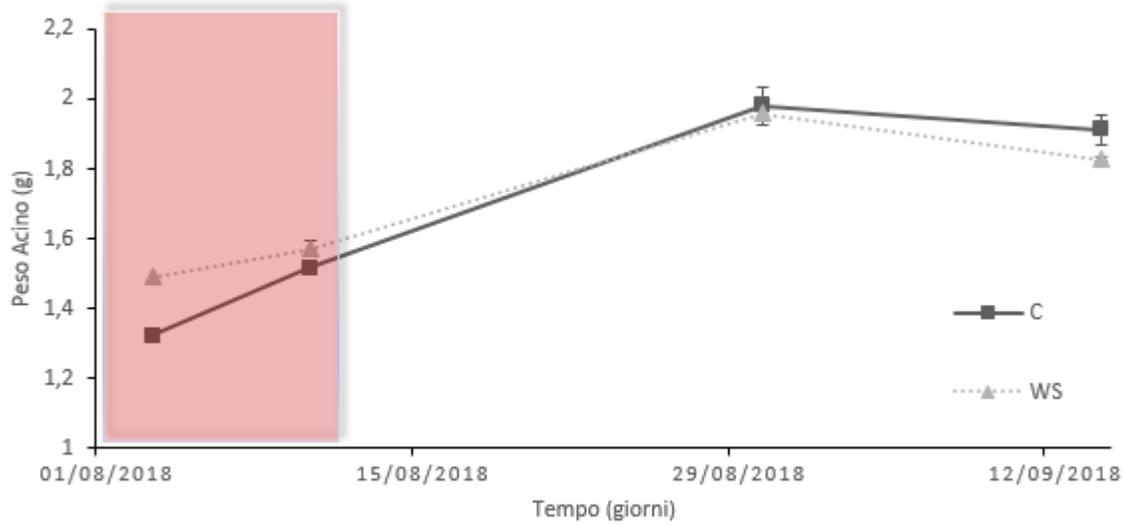


Fig. 11. Andamento nel peso dell'acino espresso in g in piante C e WS. Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Nella Fig. 11 è riportato il peso degli acini espresso in grammi in 4 campionamenti effettuati durante la fase di maturazione. Non sono state individuate differenze statisticamente significative tra le tesi in fase di raccolta, anche se le piante WS hanno mostrato un peso dell'acino leggermente inferiore rispetto alle piante C.

	AREA FOGLIARE (cm ²)	GRAPPOLI (n)	PRODUZIONE (Kg)	PESO MEDIO GRAPPOLO (g)	NUMERO DI ACINI PER GRAPPOLO
C	17259,73	12	1,047	87,9	44
WS	19159,765	11	0,815	78,8	43
Significatività	ns	ns	***	ns	ns

Tab. 2 Valori di area fogliare (cm²); grappoli (n), produzione (Kg) e peso medio del grappolo (g) in piante C e WS. Gli asterischi, se presenti, indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***).

Nella Tab. 2 sono riportati i dati vegeto-produttivi misurati alla raccolta in piante C e WS dai quali emerge che, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le due tesi per quanto riguarda l'area fogliare, il numero di grappoli (uniformato precedentemente) e il peso medio dei grappoli. La produzione per pianta è invece risultata maggiore nelle piante C e questo dato, che potrebbe sembrare in contraddizione vista la sostanziale uniformità dei parametri che concorrono a determinare la produzione stessa (numero e peso medio degli acini e numero dei grappoli), è probabilmente dovuto ad una maggiore percentuale di acini fortemente disidratati presenti nei grappoli delle piante stressate, come testimoniato dalla tendenziale riduzione del peso medio del grappolo registrato nelle piante WS rispetto a C.

3.2. EFFETTI DELLO STRESS IDRICO SULLA MATURAZIONE TECNOLOGICA E SULL'ACCUMULO DI ANTOCIANI

Gli andamenti di solidi solubili ($^{\circ}$ Brix), acidità titolabile (g L^{-1}) e pH durante la fase di maturazione, sono riportati rispettivamente alle figure 12, 13 e 14. Nel corso del periodo analizzato non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le due tesi in nessuno dei parametri considerati, eccetto per un incremento di pH rilevato in WS rispetto a C dopo il re-watering. Lievi differenze, seppur non statisticamente significative, si sono avute anche in termini di solidi solubili, con valori tendenzialmente più alti nelle bacche di piante WS rispetto alle piante C.

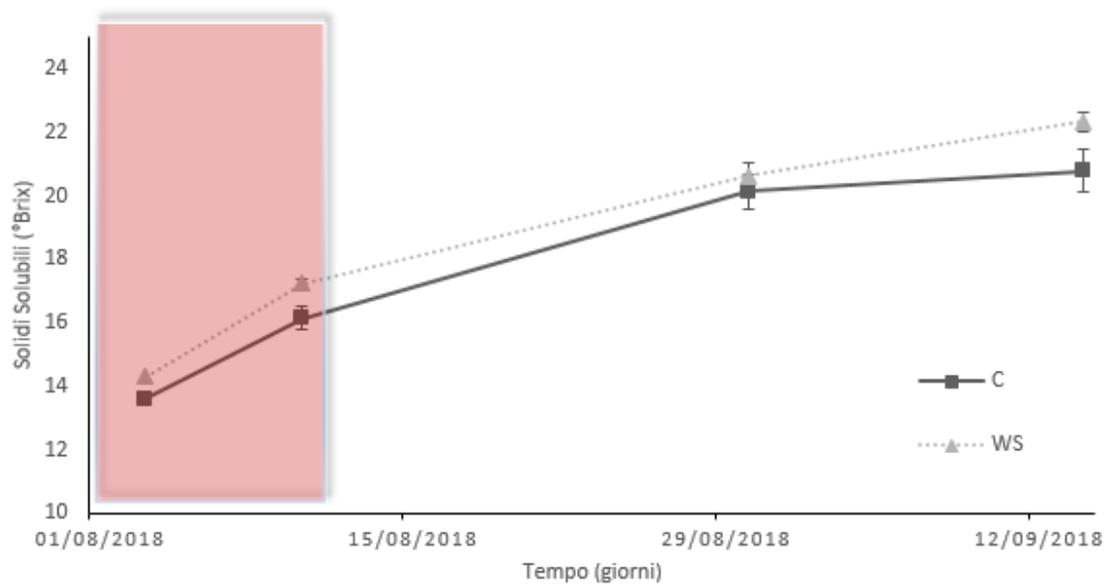


Fig. 12. Andamento dei solidi solubili espressi in °Brix in piante C e WS. Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

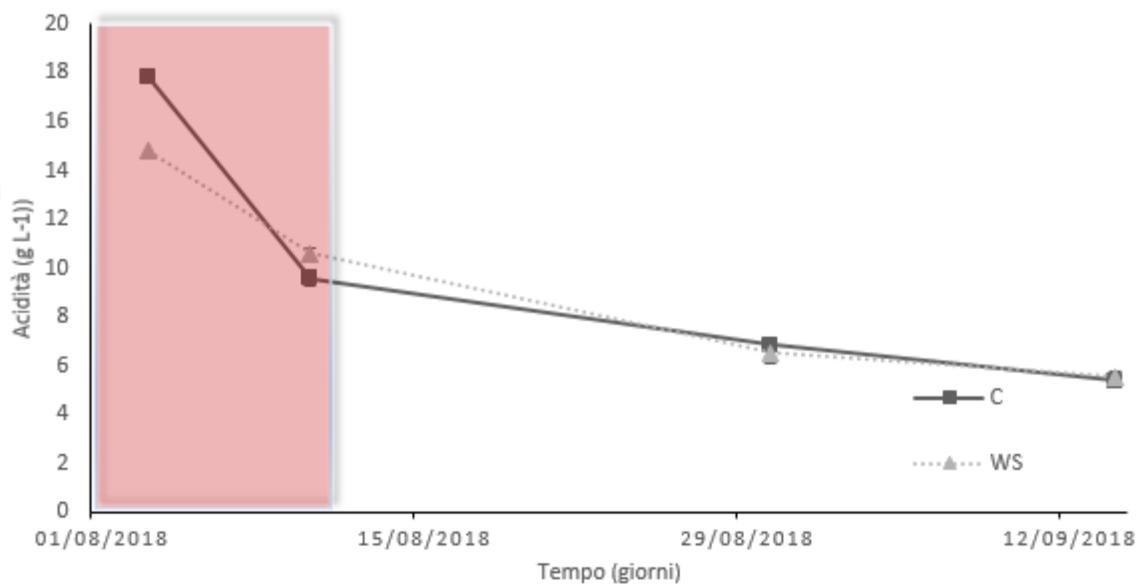


Fig. 13. Andamento dell'acidità espresso in $g L^{-1}$ in piante C e WS. Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

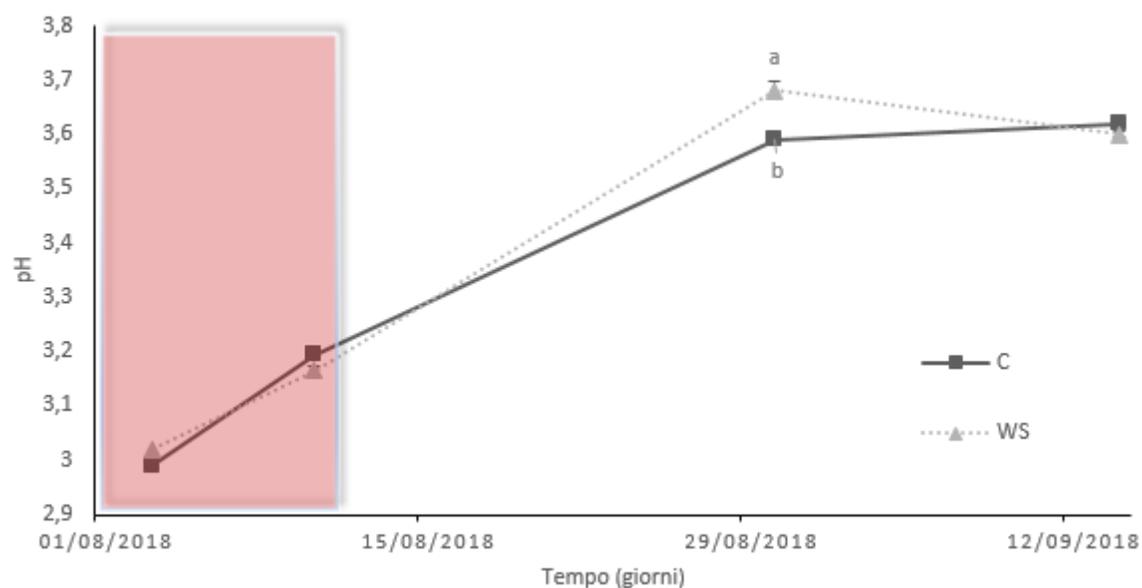


Fig. 14. Andamento del pH in piante C e WS. Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

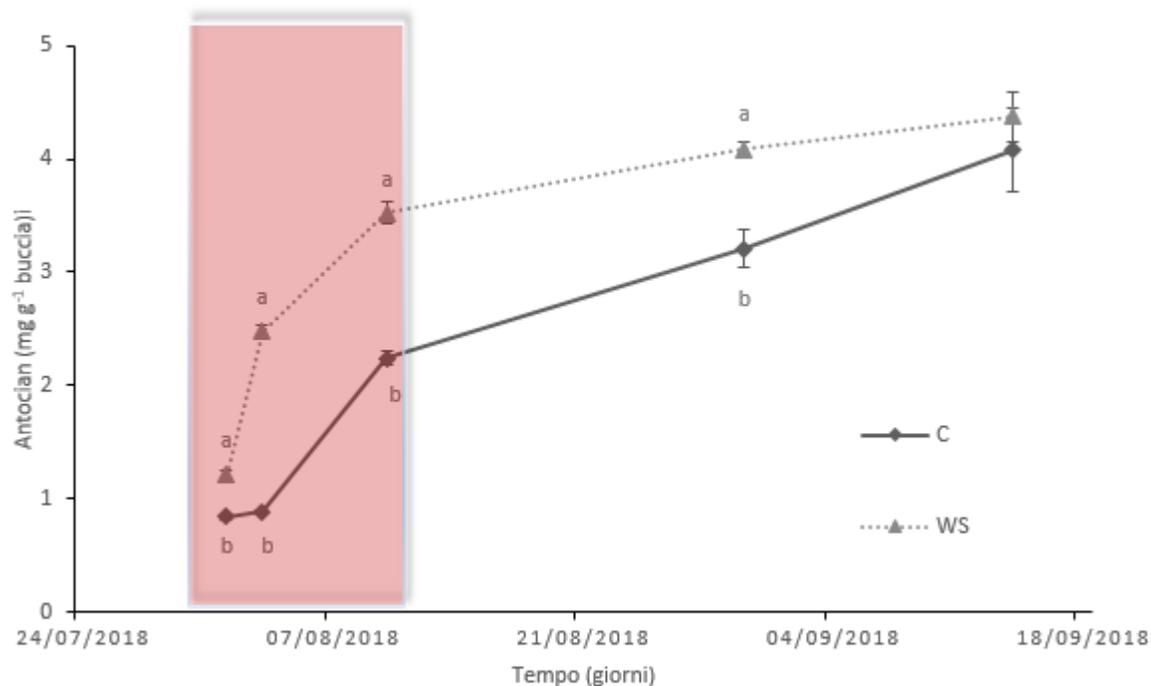


Fig. 15. Andamento degli antociani totali espressi in mg g^{-1} di buccia in piante C e WS. Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Nella Fig. 15 sono riportati gli andamenti dell'accumulo di antociani nella bucciadurante la maturazione e alla vendemmia. Nella fase di riduzione della disponibilità idrica si è registrato un aumento di circa il doppio della concentrazione antocianica nelle piante WS rispetto alle piante C. Nel periodo successivo al trattamento, quando le condizioni idriche sono state nuovamente riportate ad uno stesso livello, gli antociani nelle piante WS hanno continuato ad aumentare, ma con un tasso più basso, mentre nelle piante C si è verificato un recupero, che ha permesso il raggiungimento alla raccolta di valori simili tra le due tesi.

Gli andamenti nell'accumulo di antociani trisostituiti (delfidina, petunidina e malvidina) e disostituiti (cianidina e peonidina) sono riportati in Fig. 9 e 10. La percentuale di antociani trisostituiti è risultata sempre più alta nelle piante C, rispetto alle piante WS, ad eccezione del campionamento effettuato il 30 agosto, a 20 giorni dalla fine dello stress idrico. Per differenza, le piante WS hanno invece presentato un aumento percentuale delle antocianine disostituite in confronto a C.

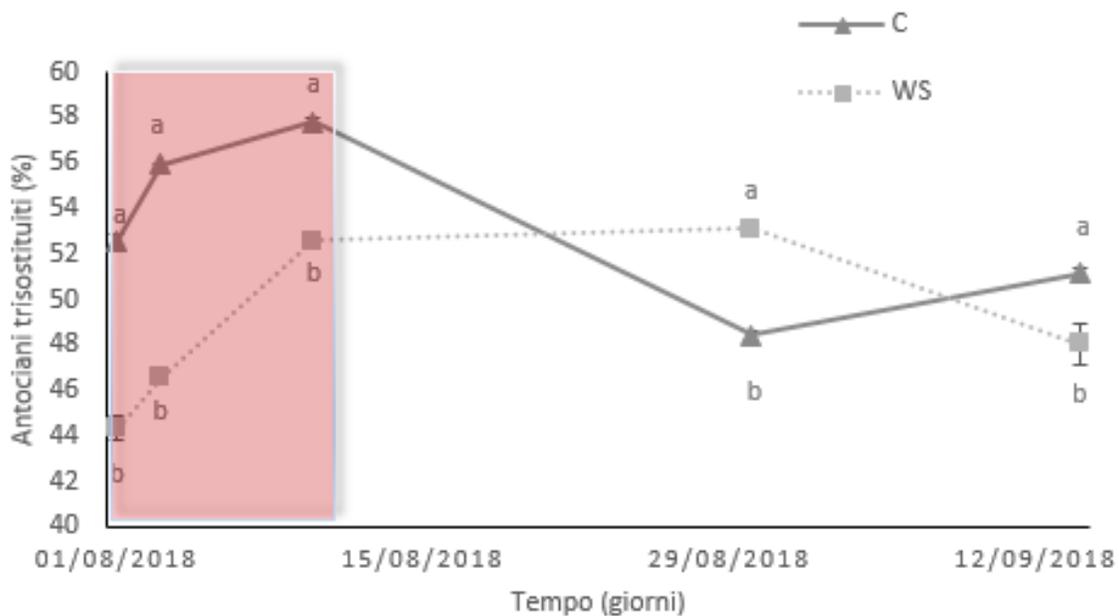


Fig. 16. Andamento dell'accumulazione di antociani trisostituiti (%) in piante C e WS. Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

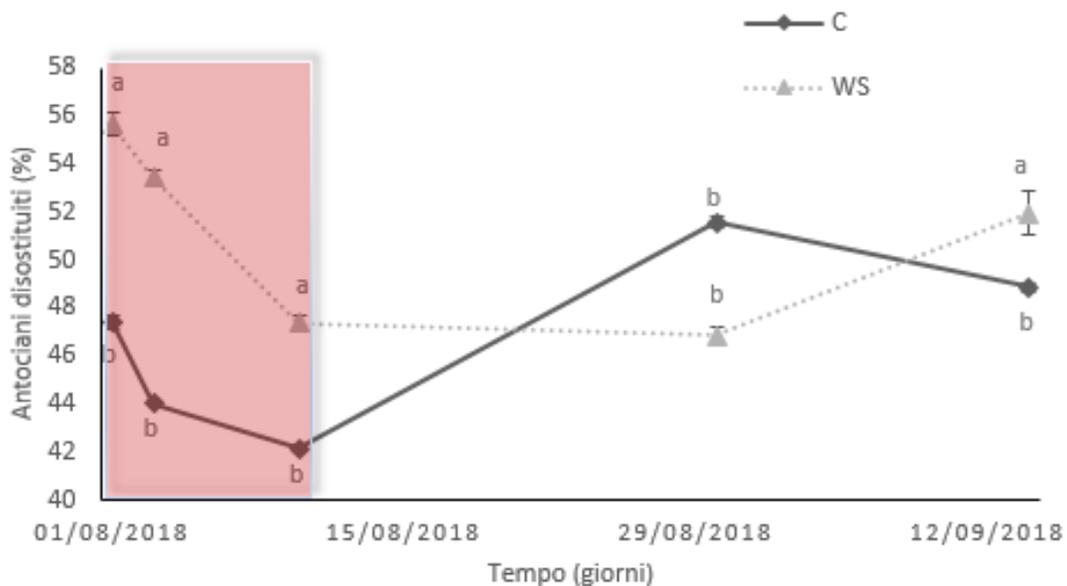


Fig. 17. Andamento dell'accumulo di antociani disostituiti (%) in piante C e WS. Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

3.3. EFFETTI DELLO STRESS IDRICO SULL'ESPRESSIONE GENICA DI ALCUNI GENI CHIAVE DELLA BIOSINTESI DEGLI ANTOCIANI.

I risultati dell'analisi dell'espressione dei principali geni coinvolti nel percorso biosintetico degli antociani (MybA1, UFGT, DFR e LDOX) sono riportati in Fig. 18.

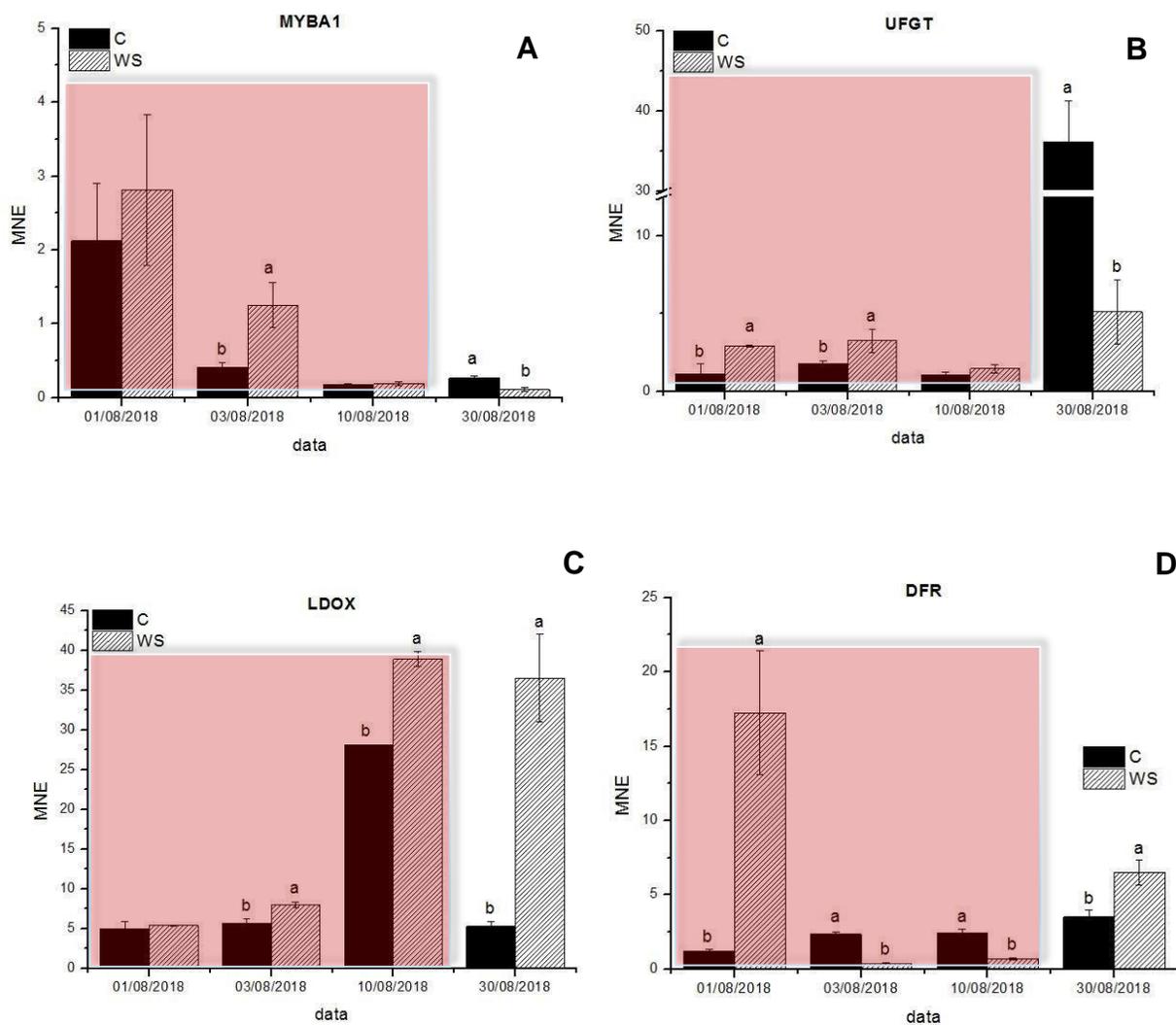


Fig 18. Espressione di alcuni dei geni chiave della via Biosintetica degli antociani: MYBA1 (A); UFGT (B); LDOX (C); DFR (D). Le diverse lettere a e b, se presenti, indicano differenze statisticamente significative tra le due tesi alle diverse date ($P < 0.05$).

L'espressione genica del fattore di trascrizione MybA1 e dei geni UFGT e LDOX ben coincide con l'andamento dell'accumulo degli antociani totali. Infatti, durante le fasi di stress idrico si ha una maggiore espressione di tali geni nelle piante WS, che ha probabilmente determinato un loro rapido aumento. Nelle ultime fasi di maturazione una maggiore espressione dei geni UFGT e MybA1 è stata rilevata nelle piante C, mentre l'espressione di LDOX è rimasta sempre più alta nelle piante WS. Per quanto riguarda il gene DFR, l'andamento dell'espressione genica non è risultata così ben correlabile con

l'osservato accumulo di antociani, poiché durante il periodo di stress idrico è stato rilevato solo un iniziale incremento nelle piante WS e successivamente un incremento in C. Dopo il re-watering, un ulteriore incremento è stato rilevato nell'espressione di DFR nelle piante WS.

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi ha riguardato la valutazione degli effetti dello stress idrico imposto in fase di invaiatura sulla maturazione e sull'accumulo degli antociani delle uve in piante in vaso di Sangiovese. La scelta di limitare lo stress alla fase di invaiatura (durata circa 10 giorni nel 2018, anno della prova) è stata effettuata per ricreare una condizione sempre più frequente negli areali viticoli dell'Emilia-Romagna, caratterizzati nei periodi estivi da ripetute ondate di calore associate a periodi di siccità. L'annata 2018 si è distinta come una tra le stagioni più calde degli ultimi anni, facendo registrare +1,77 °C rispetto alla media delle temperature della serie storica 1961-1990 (ISPRA, 2018). Durante il periodo di riduzione dell'irrigazione inoltre, sono state registrate temperature medie di 28,6°C, con temperature massime di 36,8 °C.

Come atteso, l'imposizione della riduzione irrigua pari al 50% rispetto ai volumi restituiti alle piante di controllo, ha comportato una forte riduzione nella traspirazione delle piante stressate, con conseguente incremento della temperatura degli acini, e un forte decremento del potenziale idrico del fusto, raggiungendo il valore minimo di Ψ_{stem} pari a -1,6 MPa. Il successivo re-watering ha consentito un ripristino dello stato idrico delle piante sottoposte a stress. Come riportato in bibliografia, periodi di deficit idrico possono influire profondamente sulla fisiologia della vite agendo su diversi aspetti e determinando una crescita differenziata dei germogli e delle bacche, differenti livelli di rese finali, modificando anche le componenti qualitative della bacca. Stress idrici moderati, pur in relazione al momento in cui sono applicati, in generale determinano un miglioramento delle uve raccolte, favorendo un miglior rapporto tra zuccheri/acidi e aumentando il contenuto di polifenoli totali (VanLeeuwen, et al., 2009). Nelle nostre condizioni, tra le piante C e WS non si è avuta alcuna significativa differenza nel peso della bacca alla raccolta e questo risultato è probabilmente da imputare al fatto che lo stress idrico è stato imposto durante la fase di invaiatura quando l'acino aveva completato la crescita per divisione cellulare.

È stato infatti osservato che una riduzione della disponibilità d'acqua prima dell'invasatura, nella fase in cui si verificano i processi di divisione e espansione cellulare, comporta una riduzione marcata nella dimensione e nel peso della bacca rispetto ad una condizione in cui il deficit idrico si verifica dopo l'invasatura. In Cabernet Franc è stato stimato che il 75% della dimensione finale dell'acino è determinata nella prima fase di crescita, confermando la maggiore sensibilità della vite allo stress idrico in questa fase fenologica (Matthews & Anderson, 1989), rispetto alla fase di maturazione (Bondada & Shutthanandan, 2012). Lo studio condotto da Ojeda, et al., 2002, conferma che la riduzione della disponibilità idrica nel periodo tra la fioritura e l'invasatura ha un effetto sulla riduzione del peso della bacca più intenso rispetto ad uno stress idrico nelle fasi successive all'invasatura (Ojeda, et al., 2002; Girona, et al., 2009). A conferma di ciò, un secondo stress idrico dopo l'invasatura, imposto nella varietà Tempranillo, non ha provocato una ulteriore riduzione della taglia della bacca rispetto agli acini che hanno subito un solo deficit idrico nelle fasi precedenti l'invasatura (Santesteban, et al., 2011). Contrariamente, nella varietà Shiraz è stato osservato che una riduzione dell'irrigazione nelle fasi successive all'invasatura ha causato una riduzione del peso dell'acino maggiore rispetto alle piante che hanno subito uno stress nelle fasi precedenti l'invasatura, in quanto il re-watering durante la maturazione ha permesso un recupero nel peso delle bacche precedentemente stressate (Ollè, et al., 2011). Appare evidente quindi che uno stress idrico agisce sicuramente sulle componenti della resa, in modo diverso a seconda dell'intensità dello stesso e della fase fenologica in cui si verifica.

Ulteriori evidenze sperimentali sono state ottenute confrontando le rese di piante sottoposte a diversi regimi idrici, le quali hanno evidenziato un calo delle rese più accentuato quando lo stress idrico avviene prima dell'invasatura rispetto alla fase di maturazione (Intrigliolo, et al., 2012). Anche per Sangiovese e Montepulciano coltivate in vaso, deficit idrici precedenti l'invasatura hanno pregiudicato le rese, a causa di una riduzione del peso del grappolo e dell'acino, ma senza significative diminuzioni nel numero dei grappoli (Palliotti, et al., 2014).

Nel presente lavoro, nonostante non sono state registrate differenze al livello di peso medio dell'acino e del numero di acini per grappolo, in seguito ad uno stress idrico imposto durante la fase d'invasatura, è stata evidenziata una significativa riduzione delle

rese nelle piante WS, probabilmente a causa di alcuni fenomeni di disseccamento parziale di alcuni grappoli verificatosi nelle piante stressate.

La fase di maturazione della bacca di vite è caratterizzata da un aumento nella quantità di solidi solubili e dalla diminuzione di acidità titolabile. Questi parametri risultano condizionati dallo stato idrico della pianta con risultati finali diversi in funzione dell'intensità e del periodo in cui si verificano i cambiamenti nello stato idrico (Matthews & Anderson, 1988). Vari autori hanno studiato come lo stress idrico, in diverse fasi del ciclo vegetativo, condiziona i parametri della qualità, ottenendo peraltro risultati discordanti.

Nella presente prova, in fase di raccolta, non sono state osservate differenze significative in termini di °Brix, acidità titolabile e pH registrati nelle uve delle piante C e WS. Quindi, lo stress idrico applicato nella fase di invaiatura non ha provocato una robusta modifica dei componenti della maturità tecnologica in accordo con quanto osservato da Santesteban, et al., (2011), che non ha riscontrato alcuna modifica nel contenuto di solidi solubili e acidità totale tra piante che hanno ricevuto un doppio stress idrico nella fase successiva all'invaiatura e piante che hanno subito un solo stress idrico prima dell'invaiatura. Risultati simili sono stati ottenuti anche sulla varietà Shiraz coltivata in vaso, dove la quantità di zuccheri (°Brix) alla raccolta non ha mostrato differenze tra piante ben irrigate e piante sottoposte a stress idrico sia prima che dopo la fase di invaiatura (Ojeda, et al., 2002).

L'effetto della ridotta disponibilità idrica è stato studiato anche sulle varietà Sangiovese e Montepulciano coltivate in vaso, dove una riduzione del 40% della disponibilità idrica rispetto a condizioni di irrigazioni ottimali, per un periodo di quattro settimane prima dell'invaiatura, ha comportato una riduzione nel contenuto totale dei solidi solubili (°Brix), ma nessuna differenza in termini di acidità titolabile e pH nelle piante sottoposte a stress rispetto a quelle ben irrigate (Palliotti, et al., 2014). Diversamente in una prova condotta in Spagna, utilizzando la varietà Tempranillo, si è evidenziata una diversa risposta nella composizione della bacca in funzione dell'intensità e della fase fenologica in cui la pianta viene sottoposta a stress idrico. Una riduzione dell'irrigazione nella fase precedente l'invaiatura ha determinato un ritardo nella maturazione tecnologica a causa di un minore accumulo di solidi solubili e di un aumento dell'acidità titolabile. Al contrario, uno stress

idrico nella fase successiva all'invasatura, con una riduzione del potenziale idrico non inferiore a potenziali idrici fogliari (Ψ_{leaf}) pari a -1,12 MPa, ha determinato un miglioramento delle componenti dell'acino. L'effetto positivo dello stress idrico in questa parte del ciclo vegetativo, è dovuto ad una concentrazione del succo cellulare in seguito alla leggera disidratazione dell'acino. Invece forti riduzioni dell'irrigazione nelle ultime fasi della maturazione possono pregiudicare negativamente la maturazione, molto probabilmente in seguito ad una riduzione dell'attività fotosintetica e conseguente assorbimento di carbonio (Girona, et al., 2009).

Risultati contrastanti a quelli sopra riportati sono stati ottenuti da Intrigliolo, et al. (2012), che, utilizzando la stessa varietà Tempranillo coltivata in pieno campo ha confrontato l'effetto di una riduzione dell'irrigazione prima dell'invasatura (raggiungendo il valore di Ψ_{stem} -1,0 MPa) e dopo l'invasatura (raggiungendo il valore di Ψ_{stem} -1,4 MPa) sulle componenti della maturità tecnologica. In questa prova, uno stress idrico precoce ha determinato una maggiore quantità di solidi solubili (° Brix) e una riduzione dell'acidità titolabile (g L⁻¹ acido tartarico) rispetto ad uno stress idrico nella fase successiva l'invasatura, per due anni su tre in cui è stato effettuato lo studio. Comportamenti diversi tra le prove di stress idrico in post invasatura sono imputabili a differenti livelli di deficit idrico e a condizioni ambientali eterogenee che implicano comportamenti fisiologici dissimili. (Intrigliolo, et al., 2012). Ugualmente in Cabernet Franc una riduzione dell'irrigazione dopo l'invasatura ha determinato valori più bassi di solidi solubili (°Brix) e acidità titolabile rispetto a piante che hanno subito un deficit idrico prima dell'invasatura o a piante ben irrigate (Matthews & Anderson, 1988).

Anche la concentrazione di antociani totali alla raccolta risulta influenzata da periodi di stress idrici sia prima che dopo l'invasatura, con un aumento in entrambi i casi rispetto a condizioni di normale irrigazione (Matthews & Anderson, 1988). In generale la riduzione dell'irrigazione durante diverse fasi del ciclo colturale comporta un aumento nella concentrazione di flavonoidi nella bacca, che può essere imputabile in primo luogo ad una riduzione delle dimensioni della bacca, che determina a sua volta un aumento nel rapporto tra buccia e polpa (Chaves, et al., 2007).

Nella presente prova è stato rilevato un forte aumento del contenuto di antociani per mg di buccia durante il periodo di imposizione dello stress idrico nelle piante WS rispetto alle

piante C. Questo risultato, associato alla assenza di effetti a livello delle dimensioni dell'acino tra le due tesi, permette di affermare che il veloce accumulo di antociani nelle uve delle piante WS è probabilmente dovuto ad una risposta delle piante allo stress idrico attraverso la stimolazione del metabolismo secondario. Nella fase successiva del re-watering, le piante C aumentano l'accumulo, raggiungendo in fase di vendemmia livelli lievemente inferiori rispetto alle piante WS, anche se non statisticamente significativi. L'aumento degli antociani in seguito allo stress è stato osservato anche nello studio condotto da Santesteban et al. (2011), in cui utilizzando la varietà Tempranillo è stato valutato come variasse il contenuto di antociani in funzione dello stato idrico della pianta. I risultati hanno mostrato che un periodo di stress idrico nella fase successiva l'invaiaitura ($\Psi_{PD} -0,6\text{MPa}$), nel momento di maggiore sintesi di antociani, determina un aumento nell'accumulo di antociani totali rispetto a piante normalmente irrigate o a piante che hanno subito un singolo periodo di stress idrico nel periodo precedente l'invaiaitura (Santesteban, et al., 2011). L'andamento degli antociani è stato analizzato anche sulla varietà Merlot, che, sottoposta a stress idrico in fase di invaiaitura, mantenendo un potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}) tra -1,2 e -1,4 MPa fino in prossimità della raccolta, ha presentato un aumento nel contenuto di antociani rispetto alle viti di controllo, che è stato imputato sia alla riduzione nella crescita delle bacche che ad una maggiore stimolazione della biosintesi (Castellarin, et al., 2007).

In un altro esperimento, utilizzando la varietà Cabernet Sauvignon, si è valutato l'accumulo di antociani in relazione alla riduzione dell'irrigazione in pre- e post-invaiaitura. I risultati della prova mostrano un maggiore accumulo di antociani per entrambi i trattamenti rispetto al controllo. Anche in questo caso gli autori hanno dimostrato che nelle piante sottoposte ad una riduzione dell'irrigazione prima dell'invaiaitura, si è verificato un anticipo nell'accumulo di antociani e un incremento nel contenuto di antociani alla raccolta, non solo grazie ad una riduzione del peso della bacca, ma anche ad una stimolazione della loro biosintesi (Castellarin, et al., 2007). Anche nello studio di Deluc, et al., (2009) effettuato sempre su Cabernet Sauvignon è stato dimostrato che uno stress idrico prolungato (con valori minimi di Ψ_{stem} pari a -1,2 MPa) durante il ciclo vegetativo ha determinato un aumento nel contenuto di antociani che è stato correlato ad un aumento nella concentrazione di acido abscissico (ABA) a livello della bacca. Tramite

l'utilizzo della tecnica microarray, è stata anche attestata una stimolazione nella biosintesi dell'ormone ABA in seguito allo stress abiotico nell'acino, grazie al monitoraggio dell'espressione di uno dei principali geni del suo metabolismo (NECD1) (Deluc, et al., 2009). L'acido abscissico non solo è coinvolto nell'attivazione dei meccanismi di difesa agli stress idrici, ma ha un ruolo importante nella momento iniziale di attivazione del processo di maturazione. Ulteriori studi volti a verificare l'effetto di applicazioni esogene di ABA su acini sia in laboratorio che in pieno campo hanno verificato in entrambi i casi un effetto positivo dei trattamenti sulla sintesi ed accumulo di antociani nell'acino (Koyama, et al., 2009). Come già riportato precedentemente, le alte temperature causano una riduzione della quantità di antociani nelle bacche, in seguito ad una loro degradazione o inibizione della biosintesi. Infatti, elevate temperature provocano uno stress ossidativo, innescando la produzione di H₂O₂ che porta alla formazione di perossidasi, responsabili della degradazione degli antociani (Ferrandino & Lovisolo, 2014). È stato dimostrato che per bacche coltivate su piastra Petri, la somministrazione di ABA esogeno risulta migliorare l'accumulo di antociani, riuscendo a superare l'effetto negativo dovuto ad alte temperature notturne (Mori, et al., 2005). Nel presente studio, durante il periodo di stress idrico il livello termico delle bacche appartenenti alle piante WS ha raggiunto una temperatura superiore ai 35 °C, indicata da Mori, et al., 2007 come un livello termico che causa una forte degradazione degli antociani. Invece le piante C, grazie ad una maggiore traspirazione, hanno mantenuto una temperatura dei grappoli più bassa durante il trattamento. Nonostante le temperature prossime ad un valore critico per la degradazione, le piante WS sono riuscite ad accumulare un quantitativo quasi doppio di antociani durante il periodo di stress, rispetto alle piante C al quale potrebbe aver contribuito anche l'acido abscissico, maggiormente sintetizzato come risposta allo stress idrico. Attualmente, non ci sono chiare evidenze nel dimostrare che i cambiamenti che si verificano nelle bacche durante la maturazione, in condizioni di stress idrico, sono dovute all'azione dell'ABA. Però molti studi affermano che c'è una forte correlazione tra il periodo di inizio maturazione e il picco di ABA (Gambetta, et al., 2010). È possibile ipotizzare che in condizioni di stress abiotici, l'aumento della concentrazione di ABA induca una stimolazione nella trascrizione dei geni coinvolti nella sintesi dei flavonoidi, determinando un aumento della quantità di metaboliti secondari, in particolare polifenoli (Ferrandino &

Lovisolò, 2014). Questa è un'ipotesi che verrà senz'altro verificata in future indagini correlate alla prova della mia tesi.

Per quanto riguarda la composizione degli antociani, nelle condizioni di deficit idrico essa può risultare influenzata dalla riduzione dell'apporto irriguo, come dimostrato nello studio di Castellarin, et al. (2007). In tale ricerca infatti, lo stress idrico stimolava l'idrossilazione e la metilazione dell'anello B dei flavonoidi determinando una presenza più alta di antociani trisostituiti e causando una differenza nella colorazione delle bacche, con una maggiore presenza di pigmenti di colore viola-blu. Inoltre, nelle piante stressate si è avuto un aumento nell'espressione del gene F3'5'H, in grado di spiegare l'aumento degli antociani trisostituiti (Castellarin, et al., 2007). Nella presente prova la percentuale di antociani trisostituiti e disostituiti è risultata influenzata dallo stress idrico, ma in maniera differente da quanto riportato dal lavoro sopracitato, poiché si ha una maggiore presenza di antociani trisostituiti nelle piante C e di disostituiti nelle piante WS, sia nel periodo di stress idrico che in fase di raccolta. Ciò fa ipotizzare che lo stress idrico abbia una influenza nei confronti della composizione antocianica dipendente oltre che dall'entità e dalla fase in cui viene attuato, anche dalla cultivar.

Per quanto riguarda l'espressione dei geni chiave della biosintesi degli antociani, in Merlot la trascrizione di UFGT e MybA1 è risultata ben correlata con il contenuto di antociani totali, mentre per i geni DFR e LDOX tale correlazione è risultata meno significativa (Castellarin, et al., 2007). Anche su Cabernet Sauvignon la trascrizione del gene Myb e del gene UFGT è risultata positivamente correlata all'aumento totale di antociani, dimostrando una maggiore stimolazione del metabolismo in condizioni che provocano una riduzione dello stato idrico della pianta (Deluc, et al., 2009). Questi risultati sono simili a quelli riscontrati in questa prova, dove è stata valutata l'espressione dei geni UFGT, DFR, LDOX, MybA1 attraverso PCR Real Time. L'espressione dei geni UFGT, che agisce in maniera specifica nella sintesi degli antociani, MybA1, suo regolatore trascrizionale, e LDOX, che agisce subito a monte di UFGT, hanno presentato un andamento speculare all'andamento dell'accumulo degli antociani nelle due tesi, con valori significativamente più alti nelle piante WS durante il periodo di stress idrico, rispetto alle piante C. Nel caso di DFR, che ha fatto registrare una maggiore espressione nelle piante C rispetto a WS

anche nel periodo di stress idrico, si potrebbe invece ipotizzare uno shift anche verso la produzione di altri flavonoidi, tra cui i flavonoli, che sarebbe interessante verificare.

5. CONCLUSIONI

Il graduale aumento delle temperature e la diminuzione della disponibilità idrica sono scenari che stanno caratterizzando questi decenni e che potrebbero essere più intensi in futuro. Stagioni con basse precipitazioni durante il periodo estivo sono sempre più frequenti, esponendo i viticoltori ad eventi siccitosi, più o meno forti, soprattutto nel periodo compreso tra l'invasatura e la maturazione.

Le nuove condizioni ambientali hanno effetti importanti sulla fisiologia della vite, comportando pertanto una modifica nella composizione delle uve e dei vini.

In questo lavoro di tesi si è cercato di riprodurre, attraverso la coltivazione di viti in vaso, una possibile situazione di carenza idrica con tempistiche e intensità simili a quelle che possono verificarsi sempre più assiduamente in pieno campo intorno alla fase di invasatura. Moderati stress idrici possono avere un effetto positivo sui parametri che definiscono la qualità e a tale proposito sono stati monitorati i livelli di solidi solubili, pH e acidità con particolare attenzione all'accumulo degli antociani. In base ai risultati ottenuti in questo lavoro di tesi nel corso dell'annata 2018, i parametri della maturità tecnologica non sembrano essere fortemente influenzati da un deficit idrico localizzato nelle fasi iniziali della maturazione. In accordo con quanto ottenuto da studi precedenti, anche in questa prova, il metabolismo degli antociani è risultato stimolato dalla riduzione del potenziale idrico della pianta e dalla conseguente situazione di stress verificata nel periodo di riduzione dell'irrigazione. Questa risposta della pianta è stata verificata anche a livello dei geni che intervengono nella via biosintetica degli antociani, risultati anch'essi maggiormente espressi nelle uve delle piante stressate.

Nonostante questa risposta molto chiara, ulteriori indagini sarebbero necessarie per approfondire le complesse relazioni che sono alla base della risposta delle viti quando sottoposte a stress multipli, rappresentati da alti livelli di temperature ed intensità luminosa associati a ridotte disponibilità idriche, che sempre più spesso si verificano in molte aree viticole, sia in Italia che all'estero.

6. BIBLIOGRAFIA

- Angelakis, K. A. R. -, 2009. *Grapevine Molecular Physiology e Biotechnology*. s.l.:Springer.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N. & Ebisuda, N., 2001. Sunlight exposure and temperature effect on berry growth and composition of cabernet sauvignon and grenache in the central San Joaquin valley of California. *American Journal Enology and Viticulture*, 52(1), 1-7.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D. & Robinson, S. P., 2006. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology*, 140, 279-291.
- Bondada, B. & Shutthanandan, J., 2012. Understanding Differential Responses of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Leaf and Fruit to Water Stress and Recovery Following Re-Watering. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 1232-1240.
- Bray, E. A., 1997. Plant responses to water deficit. *Elsevier Science*, 2(2), 48-54.
- Castellarin, S. D., Matthews, M. A., Gaspero, G. D. & Gambetta, G. A., 2007. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating Xavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227, 101-112.
- Castellarin, S., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E. & Di Gaspero, G., 2007. Trascriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruit of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment*, 30, 1381-1399.
- Charrier, G., Delzon, S., Domec, J., Zhang, L., Delmas, C. E. L., Merlin, I., Corso, D., King, A., Ojeda, H., Ollat, N., Prieto, J. A., Scholach, T., Skinner P., Van Leeuwen, C., Gambetta., G. A., 2018. Drought will not leave your glass empty: Low risk of

hydraulic failure revealed by long-term drought observations in world's top wine regions. *Plant Sciences*, 4, 1-9.

Chaves, M., Pereira, J.S., Maroco, J., L., Rodrigues M., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho I., Faria, T., Pinheiro, C.I., 2002. How plant cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89(7), 907-916.

Chaves, M., Santos, T.P., Souza, C.R., Ortuno, M.F., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2007. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*, 150, 237-252.

Deluc, L. G., Quilici, D. R, Decendit, A., Grimplet, J., Wheatley, M. D, Schlauch, K. A., Mérrillon, J. M., Cushman, J. C, Cramer, G. R., 2009. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* 14(9), 18711-18739.

Farquhar, G. D. & Sharkey, T. D., 1982. Stomatal conductance. *Annual Reviews*, 33(1), 317-345.

Ferrandino, A. & Lovisolo, C., 2014. Abiotic stress effects on grapevine (*Vitis vinifera* L.): Focus on abscisic acid-mediated consequences on secondary metabolism and berry quality. *Environmental and Experimental Botany*, 103, 138-147.

Gambetta, G. A., Matthews, M. A., Shaghasi, T. H., McElrone, A. J., Castellarin, Simone D., 2010. Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta*, 232:219–234.

Geròs, H., Chaves, M., Gil, H. M. & Delrot, S., 2016. *Grapevine in a Changing Environment*. s.l.:Wiley blackwell.

Girona, J., Marsal, J., Mata, M., Del Campo, J., Basile, B., 2009. Phenological sensitivity of berry growth and composition of Tempranillo grapevines (*Vitis vinifera* L.) to water stress. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 268-277.

- Gladstone, E. & Dokoozlian, N. K., 2003. Influence of leaf area density and trellis/training system on the light microclimate within grapevine canopies. *Vitis*, 42(3), 123-131.
- Haselgrove, L., Botting, D., Heeswijck, R., Van Hoj, P.B., Dry, P.R., Ford, C., Iland, P.G., 2000. Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch exposure on the phenolic composition of vitis vinifera L cv Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 141-149.
- Intrigliolo, D. S., Pe´rez, D., Risco, D., Yeves, A., Castel, J. R., 2012. Yield components and grape composition responses to seasonal water deficits in Tempranillo grapevines. *Irrigation Science* 30(5), 339-349.
- ISPRA, 2018. *comunicato stampa*, Roma: ISPRA.
- Jeong, S., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S. & Esaka, M., 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167(2) 247-252.
- Jones, G., 2012. Climate, Grapes, and Wine: Structure and Suitability in a Changing. *ISHS*, 931, 19-28.
- Jones, G.V., 2014. *Earth*. [Online]
Available at: <https://www.earthmagazine.org/article/climate-terroir-and-wine-what-matters-most-producing-great-wine>
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R. & Storchmann, K., 2005. climate change and global wine quality. *Climatic Change*, 73(3), 319-343.
- Koyama, K., Sadamats, K. & Goto-Yamamoto, N., 2009. Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional and Integrative Genomics*, 10(3), 367-381.
- Kridemann, P. E., Loveys, B. R., Fuller, G. L. & Leopold, A. C., 1972. Abscisic acid and stomatal regulation. *Plant Physiology*, 49(5), 842-847.

- Loveys, B. R. & Kriedemann, P. E., 1974. Internal control of stomatal physiology and photosynthesis. stomatal regulation and associated changes in endogenous levels of abscisic and phaseic acids. *Plant Physiology*, 1(3), 407-415.
- Marco Moriondo, M. Bindi, 2007. Impact of climate change on the phenology of typical mediterranean crops. *Italian Journal of Agrometeorology*, 3, 5-12.
- Matthews, M. A. & Anderson, M. M., 1988. Fruit Ripening in *Vitis vinifera* L.: Responses to Seasonal Water Deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(4), 313-320.
- 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, 52-60.
- Mori, K., G.Yamamoto, N., Kitayama, M. & Hashizume, K., 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 58(8), 1935-1945.
- Mori, K., Saito, H., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M.; Kobayashi, S.; Sugaya, S.; Gemma, H., Hashizume, k., 2005. Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *Vitis*, 44(4), 161-165.
- Movahed, N., Pastore, C., Cellini, A., Allegro, G., Valentini, G., Zenoni, S., Cavallini, E., D'Incà, E., Tornielli, G. B., Filippetti, I., 2016. The grapevine VviPrx31 peroxidase as a candidate gene involved in anthocyanin degradation in ripening berries under high temperature. *Springer*, 129(3), 513-526.
- Novello, V., Schubert, A., Antonietto, M. & Boschi, A., 1992. Water relation of grapevine cv Cortese with different training system. *Vitis*, 31(2), 65-75.
- OIV, 2018. *I dati della congiuntura mondiale, Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino*.

- Ojeda, H., Carbonneau, A., Deloire, A., Andary, C., Kraeva, E. 2002. Influence of Pre- and Postveraison Water Deficit on Synthesis and Concentration of Skin Phenolic Compounds during Berry Growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(4), 261-267.
- Ollè, D., Guiraud, J.L., Souquet, M., Terrier, N., Ageorges, A., Cheynier, V., Verries, C., 2011. Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 90-100.
- Orduña, R. M. D., 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844-1855.
- Paliotti, A., Silvestroni, O. & Petoumenou, D., 2009. Photosynthetic and Photoinhibition behaviour of two field-grown grapevine under multiple summer stress. *American journal enology and viticulture*, 60, 189-198.
- Paliotti, A., Tombesi, S., Frioni, T., Famiani, F., Silvestroni, O., Zamboni, M., Poni, S., 2014. Morpho-structural and physiological response of container-grown Sangiovese and Montepulciano cvv. (*Vitis vinifera*) to re-watering after a pre-veraison limiting water deficit. *Functional Plant Biology*, 41(6), 634-647.
- Paliotti, A., Poni, S. & Silvestroni, O., 2018. *Manuale di viticoltura*. s.l.:Edagricole.
- Reynolds, A. G., Douglas, W. A. & Andrew, N. P., 1995. Impact of Training System and Vine Spacing on Vine Performance and Berry Composition of Chancellor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 88-97.
- Reynolds, A. G. & Heuvel, J. E. V., 2009. Influence of Grapevine training system on vine growth and fruit composition: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(3), 251-268.
- Santesteban, L. C., Miranda, C. & Royo, J. B., 2011. Regulated deficit irrigation effects on growth, yield, grape quality and individual anthocyanin composition in *Vitis vinifera* L. cv. 'Tempranillo'. *Agricultural Water Management*, 98(7), 1171-1179.

- Seo, M. & Koshiba, T., 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Plant Science*, 7,41,48
- Smart, R. E., 1974. Aspects of water relations of the grapevine (*Vitis vinifera*). *American Journal of Enology Viticulture*, 25(2), 84-91.
- Soar, C. J., Speirs, J., Maffei, S. M. & Loveys, B. R., 2004. Gradients in stomatal conductance, xylem sap ABA and bulk leaf ABA along canes of *Vitis vinifera* cv. Shiraz: molecular and physiological studies investigating their source. *Functional Plant Biology*, 31(6), 659-669.
- Spayd, S., Tarara, J., Mee, D. & Ferguson, J., 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv merlot berries. *American Journal of Enology and viticulture*, 3, 171-182.
- Speir, J., Binney, A., Collins, M., Edwards, E., Loveys, B., 2013. Expression of ABA synthesis and metabolism genes under different irrigation strategies and atmospheric VPDs is associated with stomatal conductance in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon). *Journal of Experimental Botany*, 64(7), 1907-1916.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 2009. *fisiologia vegetale*:Piccin.
- Teslić, N., Vujadinović, M., Ruml, M., Ricci, A., Vuković, A., Parpinello, G. P., Versari, A. 2018. Future climatic suitability of the Emilia-Romagna (Italy) region for grape production. *Regional Environmental Change*, 19(2), 599-614.
- Tombesi, S., Nardini, A., Frioni, T., Soccolini, M., Zadra, C., 2015. Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Scientific Reports*, 5, 1-12
- Tombesi, S., Poni, S. & Palliotti, A., 2016. stress idrico in *Vitis vinifera*: variabilità delle risposte fisiologiche interspecifiche e loro potenziale sfruttamento nella mitigazione degli effetti de cambiamenti climatici. *Italus Hortus*.

- Valentini, G., Allegro, G., Pastore, C., Colucci, E., Magnanini, E, Filippetti, I., 2019. Chioma chiusa o chioma aperta in risposta ai cambiamenti climatici. *L'informatore Agrario*.
- VanLeeuwen, C., Tregoat, O., Choné, X., Bois, B., Pernet, D., Gaudillère, J.P., 2009. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes?. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 121-134.
- White, M. A., Whalen, P. & Jones, G. V., 2009. Land and wine. *Nature Geoscience*, 2(2),82-84.
- Williams, L. & Ayars, J., 2005. Grapevine water use and the crop coefficient are linear functions of the shaded area measured beneath the canopy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 132, 201-211.