



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

DAFNAE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE VITICOLE ED ENOLOGICHE

**STUDIO DEL PROFILO PROTEICO DI MOSTI
OTTENUTI DA VARIETÀ RESISTENTI DI GLERA**

Relatore

Professor Simone Vincenzi

Laureando

Roman Romanciuc

N° matricola

2045966

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

Riassunto	pag. 3
Capitolo 1	
1.1 La ricerca del CREA sul Glera	pag. 5
1.2 Storia delle varietà resistenti	pag. 6
1.3 Ibridazione	pag. 7
1.4 Il concetto di resistenza	pag. 8
1.5 Ibridi parentali	pag. 10
Capitolo 2	
2.1 Proteine dell'uva e problematiche in vinificazione	pag. 13
Materiali e metodi	
3.1 Campioni d'uva	pag. 19
3.2 Analisi quantitativa mediante protocollo KDS	pag. 19
3.3 Analisi qualitativa mediante elettroforesi (SDS-PAGE)	pag. 20
Risultati e discussione	pag. 23
Conclusioni	pag. 28

Riassunto

Il mercato del Prosecco ha un'importanza rilevante sia a livello nazionale che globale, ma ad esso sono legate molte problematiche riguardanti le crittogame, principalmente *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni e *Uncinula necator* (sin. *Erysiphe necator*) (Schwein.) Burrill, le quali diminuiscono la resa potenziale dei vigneti. Per motivi ambientali e salutistici, ogni anno vengono abbassati i limiti per l'utilizzo dei fitofarmaci rendendo la lotta contro i patogeni sempre più ardua, questo ha portato a prendere in considerazione altre strade per mantenere un buon livello produttivo.

Le varietà resistenti, conosciute come PIWI (dal tedesco *Pilzwiderstandsfähig*, che significa "viti resistenti ai funghi"), si sono dimostrate un'ottima soluzione alternativa a questo problema grazie alla loro resistenza genetica ai patogeni, queste varietà richiedono un numero significativamente ridotto di trattamenti, comportando così un notevole risparmio economico per i viticoltori.

La resistenza ai patogeni si può manifestare tramite diversi meccanismi, uno dei quali può essere l'aumento nella sintesi di proteine di difesa. Queste proteine, se sintetizzate nella bacca, possono però essere causa di successivi problemi tecnologici, legati alla instabilità proteica. In questo studio è stato analizzato il profilo proteico di 29 varietà di Glera derivate dall'incrocio di 7 varietà resistenti: Bianca, Regent, Kozma 20-3, Soreli, Calardis Blanc, SK-00-1/1, Solaris. Hanno tutte dimostrato un'eccellente resistenza agli attacchi fungini.

L'analisi quantitativa della concentrazione proteica è stata eseguita tramite metodo colorimetrico con lettura a 550 nm, la quale ha permesso di evidenziare delle notevoli differenze di concentrazione proteica tra i diversi campioni analizzati. In alcuni casi la concentrazione proteica è aumentata sensibilmente, suggerendo il possibile coinvolgimento di questo meccanismo nella difesa contro i patogeni. D'altra parte, alcuni campioni non hanno mostrato un aumento di concentrazione proteica rispetto ai parentali, confermando come l'espressione delle proteine di difesa non sia l'unico fattore che influisce sulla capacità della pianta di resistere all'attacco dei patogeni.

L'analisi qualitativa, eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide, non ha rilevato differenze significative nei profili proteici tra i campioni delle varietà resistenti e quelli della varietà di Glera non resistente. Questo suggerisce che l'eventuale meccanismo di difesa prevede solo un aumento della sintesi delle isoforme già presenti piuttosto che la sintesi di nuove proteine di difesa.

Questo è uno studio preliminare che per la prima volta affronta l'analisi e quantificazione delle proteine nelle varietà di uva resistenti. I risultati suggeriscono che le proteine potrebbero essere in parte coinvolte nell'aumentata resistenza di queste nuove varietà, ma anche che per comprendere appieno i meccanismi di resistenza sarà necessario prendere in analisi ulteriori percorsi metabolici, come quelli legati alla trascrizione genica, alle vie di segnalazione o alla produzione di altri composti difensivi.

Capitolo 1

1.1 La ricerca del CREA sul Glera

Il cambiamento climatico, le norme sempre più restrittive nell'uso dei fitofarmaci e il costante aumento della richiesta dei prodotti biologici stanno cambiando la viticoltura tradizionale, rendendo il lavoro del viticoltore più difficile.

L'UE ha introdotto diverse normative che limitano l'uso di fitofarmaci nella coltivazione, imponendo controlli rigorosi su quali prodotti possano essere adoperati anche nei vigneti. Tra le regolamentazioni più influenti vi è il Regolamento (CE) n. 1107/2009, che stabilisce i criteri per l'approvazione e l'utilizzo dei fitofarmaci. Recentemente, l'UE ha anche promosso la Strategia "*Farm to Fork*", che mira a ridurre l'uso di pesticidi chimici del 50% entro il 2030.

In Italia negli ultimi dieci anni si è verificato un incremento del 125% della superficie dedicata a vigneti biologici certificati (winemeridian.com) e tra il 2022 e il 2028 si prevede un incremento del 12% annuo sulla richiesta di vini biologici. Inoltre, va considerato che il consumatore medio è sempre più attento alla ricerca di prodotti con una certificazione di sostenibilità. Il principale criterio di valutazione riguarda la riduzione dell'uso di prodotti chimici nella coltivazione della vite (Consumer Survey Vini Sostenibili Nomisma, per Alleanza Cooperative).

Mettendo insieme questi elementi non si può ignorare il fatto che la tendenza sia quella di abbandonare, o comunque, ridurre la viticoltura tradizionale per cercare strade che vadano incontro alle linee di mercato. Per questo, da anni, il CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) di Conegliano si è focalizzato a costruire un importante piano di miglioramento genetico in modo da ottenere piante "figlie di Glera" che offrano ulteriori opportunità alla filiera vitivinicola. La ricerca iniziata nel 2012, che vedrà la conclusione nel 2028, ha portato ad avere 15500 sementali o semi, e ad oggi sono stati messi a dimora oltre 7000 genotipi resistenti.

Le selezioni sono eseguite mediante l'applicazione del MAS (*marker assisted selection*) che consente di scartare i genotipi che presentano meno di due geni di resistenza. Questa metodica è più rapida rispetto alla selezione tradizionale in quanto non c'è necessità di aspettare che la pianta esprima i geni di resistenza ma, essendo già a conoscenza della sequenza genomica è possibile sapere se il carattere di resistenza sia presente o meno. Le piante vengono selezionate solo se presentano almeno due geni di

resistenza e comunque mantengono un profilo genetico superiore al 90% di *V. vinifera* L. necessario per essere iscritto nel registro nazionale delle varietà di vite.

1.2 Storia delle varietà resistenti

Conosciute anche come PIWI, sono varietà di vite che nascono dall'incrocio di Vite europea e Vite americana con lo scopo di creare ibridi resistenti alle crittogame e alla fillossera della vite (*Viteus vitifoliae* Fitch). La scoperta del Nuovo Mondo e l'industrializzazione hanno contribuito a far arrivare in Europa Fillossera, Peronospora ed Oidio. Nei primi anni del 1800 in America vennero introdotti degli incroci per aumentare la resistenza ai patogeni, ottenendo però un vino di scarsa qualità e con il caratteristico aroma di “foxy” ed elevati livelli di metanolo. Per questo motivo tutti gli ibridi vennero coltivati per la produzione di portainnesti in quanto presentavano un'ottima resistenza alla Fillossera.

Nel 1936 furono identificate le prime fonti di resistenza all'Oidio (*Erysiphe necator* (Schwein.) Burrill) e Peronospora (*Plasmopora viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni) da *V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. labrusca*, *V. cinerea*.

Nel 1998 i ricercatori dell'Università di Udine e dell'Istituto di Genomica applicata (IGA) di Udine hanno iniziato il programma di miglioramento genetico che ha portato alla registrazione, nel 2015, dei primi vitigni resistenti prodotti in Italia: Fleurtaï, Soreli, Sauvignon Kretos, Sauvignon Nepis, Sauvignon Rytos (a bacca bianca) – Cabernet Eidos, Cabernet Volos, Merlot Khorus, Merlot Kanthus, Julius (a bacca rossa).

Il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA) nel 2012 ha iniziato un programma di miglioramento genetico che potrebbe portare al rilascio di nuove varietà resistenti: in Veneto Glera e Raboso, in Toscana Sangiovese, in Piemonte Barbera e Nebbiolo; nel Lazio Bellone, Cesanese e Malvasia del Lazio; in Puglia Primitivo, Aglianico e uva Italia (apirena).

Ad oggi sono iscritte al Registro Nazionale delle varietà di vite 36 varietà resistenti e la ricerca prosegue con l'obiettivo di trovare varietà nuove e migliori per la produzione di “vini di qualità”.

1.3 Ibridazione

L'ibridazione può avvenire nell'ambito della stessa specie (interspecifica) o tra specie diverse (intraspecifico), gli obiettivi di questa pratica sono molteplici: si può ricercare un miglioramento quantitativo della produzione, un miglioramento qualitativo o, come nel caso in esame, si ricerca un miglioramento nella difesa contro i patogeni.

La pratica dell'incrocio inizia con la demasculinizzazione della pianta portaseme, che appartiene a una varietà sensibile. Successivamente, il polline viene raccolto dalla pianta parentale resistente e utilizzato per impollinare la pianta portaseme tramite insufflazione. Questo processo dà origine a una nuova varietà, che si spera erediti i migliori caratteri delle due varietà incrociate. Quando la nuova pianta inizia a produrre, gli acini vengono raccolti, i vinaccioli rimossi, e i semi fatti germinare. Le piantine vengono quindi trasferite prima in vivaio e poi in campo, dove si attende la prima produzione per avviare la selezione. Oggi grazie al supporto della genetica molecolare, sono stati mappati i profili genetici di molte specie di *Vitis* e i caratteri di resistenza sono stati suddivisi nei singoli loci.

Locus resistenza	Patogeno	Parentale resistente	Marcatori per MAS	Referenza
Rpv3	Peronospora	Bianca, Regent	UDV-305, UDV-737, VMC7F2	Welter et al. 2007; Bellin et al. 2009
Rpv12	Peronospora	Kunbarat, Kunleany, 20/3	UDV-350, UDV-360	Venuti et al. 2013
Rpv10	Peronospora	Solaris, Bronner	GF09-44, GF09-46, GF09-47	Schwander et al. 2012
Ren3	Oidio	Bianca, Regent, 20/3, Solaris, Bronner	GF15-28, GF15-30, ScorA760	Zyprian et al. 2016, Welter et al. 2007
Rcg1	Agrobatterio	Kunbarat, 20/3	SCAR 9M3-3	Kuczog et al. 2012

Figura 1: principali loci di resistenza

La conoscenza delle mappe genetiche e l'utilizzo dei marcatori molecolari qui sopra citati permette l'utilizzo della *marker-assisted-selection* (MAS) che consente di ottimizzare la selezione dei parentali e selezionare la progenie col la proporzione più alta del genoma parentale ricorrente. La MAS permette di sostituire la fenotipizzazione e può essere effettuata precocemente nello stadio di sviluppo della pianta, riducendo notevolmente le tempistiche di selezione dal momento che molti caratteri possono essere espressi tardivamente durante lo sviluppo.

1.4 Il concetto di resistenza

I fattori di resistenza della pianta si possono distinguere in due categorie:

- Fattori di resistenza preformati (difese passive) che agiscono prima della penetrazione del patogeno, si possono immaginare come barriere strutturali.
- Fattori di resistenza indotti (difese attive) che interferiscono con i meccanismi di penetrazione, impediscono lo stabilirsi di relazioni pianta-patogeno e limitano la diffusione del patogeno nei tessuti dell'ospite.

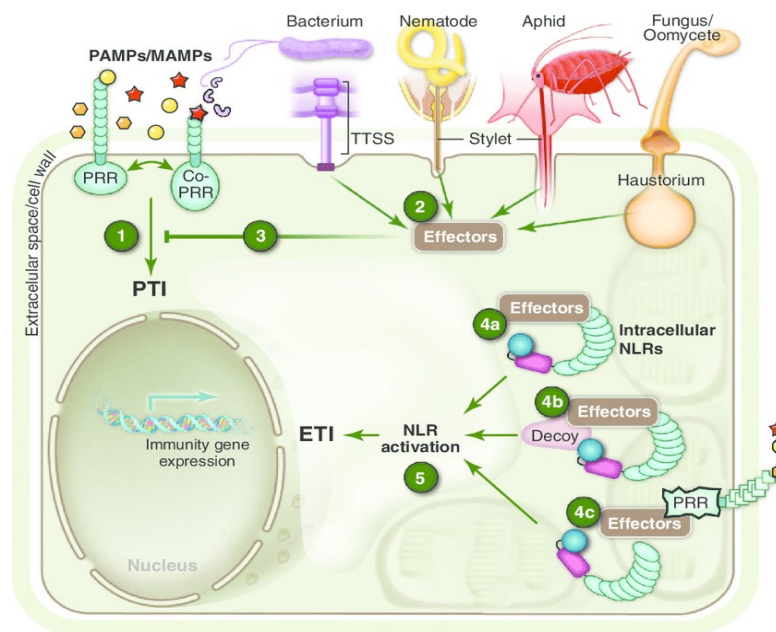


Figura 2: schema "plant immunity system"

Il riconoscimento pianta-patogeno è detto "*Plant immunity system*" (Jones e Dangl 2006) e porta all'attivazione di siti specifici del genoma, la trascrizione di questi porta alla produzione dei metaboliti necessari a combattere l'infezione.

Il processo che porta alla difesa si attua su due livelli: il primo è indotto dalla presenza di PAMPS (*Pathogens associated Molecular Patterns*), molecole esogene (frammenti di chitina, chitosano, flagelli, pili, acidi grassi ecc. del patogeno) o endogene (frammenti di pectina o xilani rilasciati dalla parete cellulare vegetale) aspecifiche che vengono riconosciuti da recettori PRR e che attivano subito i sistemi di difesa e la resistenza ottenuta viene chiamata PTI (*Pattern-triggered immunity*).

Il secondo, conosciuto come "*Gene-for-gene hypothesis*" proposto per la prima volta dal genetista britannico H. H. Flor negli anni '40, è attivato da recettori specifici (*R*-

proteins) che riconoscono effettori specifici prodotti dal patogeno, queste molecole vengono prodotte da geni specifici dei patogeni conosciuti come geni Avr (*avirulence genes*), la resistenza ottenuta dalla pianta viene chiamata ETI (*effector-triggered immunity*). Lo scopo dei processi di ibridazione è appunto quello di trasmettere i geni di resistenza alle varietà che non li presentano, senza trasmettere le caratteristiche negative delle varietà resistenti.

Il riconoscimento degli effettori da parte delle *R-protein* innesca una reazione che avvia i processi di difesa e conferisce resistenza. Questi processi portano alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di segnali molecolari che attivano i geni di difesa. Tra le molecole prodotte, un gruppo importante è rappresentato dalle fitoalessine, tra cui il resveratrolo. Sebbene le fitoalessine possano raggiungere elevate concentrazioni, non contribuiscono alla Resistenza Sistemica Acquisita (SAR).

Il livello più alto di difesa si ha quando vengono prodotte le Proteine di Patogenesi (*PR-proteins*), un gruppo di 17 famiglie di proteine con funzioni diverse. L'attivazione delle vie di segnalazione porta alla regolazione trascrizionale dei geni PR (*Pathogenesis-Related*) che possono essere attivati in risposta a specifici segnali come l'aumento dei livelli di SA (acido salicilico), JA (acido jasmonico), etilene, ossido nitrico o l'attivazione di specifiche chinasi coinvolte nella difesa; una volta trascritte e tradotte, le *PR-proteins* vengono prodotte e accumulate nelle cellule della pianta. Queste proteine hanno funzioni diverse, tra cui attività antifungina (ad esempio chitinasi, TLP e glucanasi) e capacità di degradare pareti cellulari dei patogeni o di inibire la loro crescita. Se l'infezione iniziale attiva la SAR, le *PR-proteins* non vengono prodotte solo localmente ma anche in altre parti della pianta, preparando l'intera pianta a rispondere più rapidamente e con maggiore efficacia a future infezioni. La presenza delle *PR-protein* funge da marker biochimico della SAR.

1.5 Ibridi parentali

Lo studio svolto ha utilizzato la varietà Glera come portaseme femminile, mentre per il polline è stato prelevato da più varietà resistenti diverse tra le quali:

Bianca



Figura 3: varietà Bianca (Ursula Brühl, Doris Schneider, Julius Kühn-Institut (JKI))

Bianca è un vitigno a bacca bianca, sviluppato nel 1963 nella regione viticola di Eger in Ungheria dall'incrocio di Buovier ed Eger 2, derivato a sua volta da Villar blanc. La varietà è stata autorizzata per la produzione di vino nel 1982. Uno dei vantaggi di questa varietà è la naturale resistenza alle

malattie fungine. Presenta inoltre un germogliamento precoce che la rende adatta alla coltivazione nelle regioni con climi continentali rigidi e stagioni di crescita brevi, è caratterizzata anche da una buona resistenza al gelo. I grappoli del Bianca sono di dimensioni da medie a molto grandi, con gli acini piccoli e molto pruinosi. La vite ha grande vigoria e produce una grande chioma che necessita di essere tenuta sotto controllo tramite potatura. La sua resa è molto alta. Tra le avversità a cui il Bianca è soggetto c'è la colatura, la quale può essere causata dalle cattive condizioni meteorologiche presenti durante la fioritura.

Regent



Figura 4: varietà Regent (Ursula Brühl, Doris Schneider, Julius Kühn-Institut (JKI))

Il Regent è un vitigno a bacca nera, creato in Germania nel 1967 incrociando Diana (Sylvaner x Müller-Thurgau) e Chambourcin. Dal 1996 è autorizzato in Germania per la produzione di vini DOP. È uno dei primi vitigni resistente ai funghi ad essere stato messo in commercio e il

suo sviluppo ha richiesto più di trent'anni. Dal punto di vista ampelografico, il Regent ha

foglia media, pentagonale, pentalobata. Il suo grappolo è medio, conico, alato, con acini medi ed ellittici, dalla buccia mediamente sottile e di colore blu-nero.

Kozma 20-3

Il vitigno è un nuovo incrocio interspecifico tra Sremski Karlovci 77 4-5 (Kunbarát x Traminer) x Bianca. Contiene geni di *Vitis amurensis*, *Vitis berlandieri*, *Vitis rupestris* e *Vitis vinifera*. L'ibrido è stato incrociato in Ungheria dall'allevatore Pál Kozma. Il vitigno è resistente alle malattie fungine ed al gelo.

Soreli



Figura 5: varietà Soreli (M.I.P.A.F - National Vine Certification Service)

Varietà a bacca bianca ottenuta dall'incrocio di Tocai Friulano e Kozma 20-3. Dal punto di vista ampelografico presenta germoglio glabro, senza pigmentazione. Foglia di dimensione medio grande, cuneiforme o orbicolare con seno peziolare a U. Grappolo di lunghezza superiore alla media, cilindrico, da mediamente compatto a semi-spargolo con due corte ali. Acino di piccole dimensioni, di forma sferoidale e uniforme. La buccia è spessa con pruina media, di colore verde con riflessi dorati. La polpa è leggermente soda, di sapore neutro. Inoltre, presenta ottima resistenza alla peronospora e buona resistenza all'oidio. Ridotta sensibilità alla botrite e al marciume acido.

Solaris



Figura 6: varietà Solaris (Ursula Brühl, Doris Schneider, Julius Kühn-Institut (JKI))

Varietà a bacca bianca ottenuta dall'incrocio di Merzling x Geisenheim 6493 nel 1975 in Germania da Norbert Becker ed è riconosciuta come varietà resistente alle principali malattie fungine. Il germoglio è aperto di colore giallo bronzato e con elevata presenza di peli

striscianti. Vitigno precoce sia nel germogliamento che nella fioritura. La foglia adulta è media, trilobata, leggermente bollosa, con seno peziolare a lobi leggermente sovrapposti.

Grappolo di media dimensione e compattezza. Acino medio piccolo, ellittico corto di colore verde giallo, intenso se esposto al sole.

Calardis Blanc



Figura 7: varietà Calardis Blanc (Grape varieties ANTES)

Varietà a bacca bianca ottenuta dall'incrocio di Ga-47-42 (Bacchus x Seyval Blanc) x Seyve Villard 39-639 nel 1993 in Germania. Questa varietà è resistente a Peronospora, Oidio, Marciume nero e Botrite. L'obiettivo dell'incrocio era ottenere una varietà

adatta al contesto del cambiamento climatico per diminuire il livello di zuccheri nell'uva così da ottenere vini meno alcolici.

Capitolo 2

2.1 Proteine dell'uva e problematiche in vinificazione

La maggior parte delle proteine dell'uva si trova nel pericarpo e svolge le più svariate funzioni, tra le quali: funzioni strutturali, funzioni di trasporto attivo di acqua e sostanze nutritive, funzioni catalitiche di reazioni chimiche. La concentrazione proteica dipende molto dalla varietà dell'uva ma non solo, durante l'annata viticola all'interno dell'acino stesso avvengono variazioni importanti di cambiamento di concentrazione in base all'andamento della stagione. Il contributo maggiore è dato dalle proteine sintetizzate in risposta allo stress.

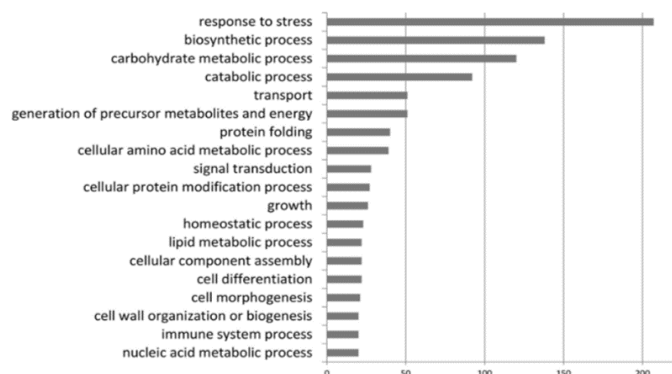


Figura 8: livelli di concentrazione delle diverse tipologie di proteine nell'uva (Riebel et al. 2017)

Le proteine prodotte in seguito a situazioni di stress fanno parte della famiglia delle *PR proteins*, nella seguente figura sono riportate le famiglie di proteine con annesse le loro funzioni.

FAMIGLIE	PROTEINE
PR1	ruolo sconosciuto, attiva contro Oomiceti
PR2	β -1,3 glucanasi
PR3, PR4, PR8, PR11	chitinasi ed endochitinasi
PR5	taumatine (TLP)
PR6	inibitori di proteasi
PR7	endoproteasi
PR9	perossidasi
PR10	ribonucleasi
PR12, PR 13, PR14	difensine, tionine, LTP (lipid tranfer protein)
PR15, PR16	ossalato ossidasi, ossalato ossidasi-like
PR17	ruolo sconosciuto, identificata in tabacco

Figura 9: Classificazione delle PR-proteins (Ferreira R.B. et al., 2007)

Tra tutte queste le due proteine che prevedono un incremento nell'espressione in seguito a stress sono le chitinasi e TLP (*taumatine like protein*).

Le chitinasi di classe IV sono quelle presenti in maggior concentrazione nell'acino e svolgono la loro funzione di difesa degradando la chitina presente nella parete cellulare fungina, rompendo i legami β -1,4 tra le unità di N-acetilglucosamina, che sono i mattoni costitutivi della chitina. Questa degradazione indebolisce la struttura della parete cellulare del fungo, compromettendone l'integrità ed impedendogli di crescere e proliferare. La dispersione dei frammenti di chitina, che fungono da elicitivi, innesca la produzione di altre proteine di difesa da parte della pianta stessa.

Le TLP appartengono alla famiglia delle proteine PR-5 e sono una parte fondamentale del sistema di difesa dell'uva, e della pianta in generale, contro i funghi patogeni. Queste proteine si legano alla parete e inducono la lisi cellulare creando dei pori trans-membrana provocando uno squilibrio osmotico che conduce il fungo alla morte. Queste proteine hanno anche funzione di molecola segnale che va ad attivare altri percorsi di difesa sistemici, rinforzando ulteriormente le barriere di difesa della pianta. Ad esempio, possono stimolare metaboliti secondari antifungini come le fitoalessine. Questa categoria di proteine collabora inoltre con altri enzimi di difesa, come chitinasi e glucanasi, portando a una protezione più efficace contro i patogeni.

Nel mosto e nel vino, la concentrazione proteica varia significativamente in base alla varietà d'uva, al tipo di vinificazione, alle tecnologie impiegate, all'intensità delle lavorazioni meccaniche e alle condizioni stagionali. Nella vinificazione in rosso, le problematiche legate alle proteine sono quasi inesistenti, poiché la reazione con i tannini provoca la precipitazione dell'eccesso proteico (McRae et al 2015). Al contrario, nella vinificazione in bianco e rosato, la stabilità proteica è cruciale per garantire la longevità del prodotto.

Come detto in precedenza, la concentrazione maggiore delle proteine si trova nel pericarpo dell'acino e quindi un maggior tempo di contatto con il mosto porta ad un'estrazione maggiore di proteine. Oltre ai caratteri genetici della varietà la variazione del contenuto proteico varia anche a seconda dei trattamenti fisici, all'aggiunta di coadiuvanti, ai cambiamenti delle condizioni fisiche (temperatura) e chimiche (pH, potenziale redox).

Insieme ai processi che portano all'aumento della concentrazione proteica, ce ne sono altri che portano alla diminuzione: l'aumento del tenore alcolico riduce la solubilità delle proteine e causa la naturale flocculazione e, in seguito, precipitazione delle stesse. Nel seguente grafico è rappresentato un classico andamento della concentrazione proteica dopo la raccolta dell'uva.

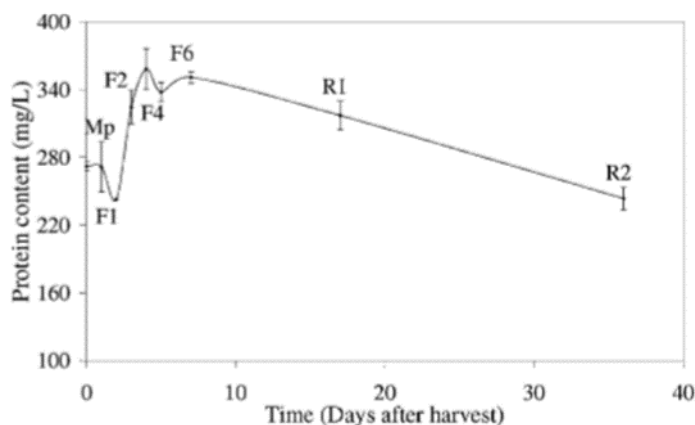


Figura 10: variazione della concentrazione proteica nel mosto/ vino rispetto al tempo dalla data di raccolta dell'uva (Vincenzi et.al.,2011).

Post vinificazione, in seguito a tutti i passaggi di chiarifica, nel vino si ritrova una concentrazione proteica ben minore rispetto a quella di partenza. Le proteine che sono in grado di resistere di più alle condizioni difficili del vino sono proprio le PR-proteins (Waters et.al., 1992), in particolare chitinasi e TLP.

Per i vini bianchi la problematica principale è legata alla casse proteica che consiste nell'intorbidimento del vino a seguito di uno shock termico, le proteine che ne sono la causa sono appunto le PR-proteins. Sembra che la chitinasi abbia una temperatura di denaturazione inferiore alle TLP (Falconer et al., 2010), e che la denaturazione di quest'ultima sia parzialmente reversibile mentre quella della chitinasi non lo è; quindi, possiamo supporre che le chitinasi siano la principale causa di instabilità.

Proteina	T_m (°C)	Reversibilità della denaturazione
chitinasi (classe IV)	55	No
TLP (VVTL1)	62	Sì (parziale)

Figura 11: Temperature di denaturazione (T_m) di chitinasi e TLP purificate (Falconer et al., 2010).

Tra le tecniche di stabilizzazione che possono essere utilizzate nel vino, troviamo: l'uso di enzimi proteolitici per degradare le proteine instabili, il caseinato, la colla di pesce, il PVPP e l'ultrafiltrazione con un cut-off a 10 kDa (Pascal Ribéreau-Gayon 2006). Tuttavia, quest'ultima tecnica può comportare una significativa riduzione delle qualità organolettiche del vino, un effetto simile a quello osservato nei trattamenti termici. Tra tutte le soluzioni proposte la Bentonite resta quella che presenta i migliori risultati di stabilità mantenendo un'ottima qualità organolettica.

La Bentonite è un silicato di alluminio con struttura lamellare che presenta una grande superficie specifica e una carica negativa, per quest'ultimo motivo si presta bene alla rimozione delle proteine del vino in quanto esse sono per la maggior parte cariche negativamente. Le proteine vengono eliminate dalla bentonite tramite adsorbimento, si istaura un complesso proteina-bentonite insolubile che tende a precipitare sul fondo e il vino viene filtrato. Il vantaggio di usare la bentonite è principalmente l'efficacia, la facilità d'uso e il costo che è relativamente economico rispetto ad altri prodotti chiarificanti, lo svantaggio è quello di rimuovere anche gli aromi (Vincenzi et al 2015) quindi il dosaggio deve essere fatto con cura. Attualmente non esiste ancora un metodo ufficiale per la determinazione del dosaggio di bentonite e sono disponibili diversi test empirici tra cui possiamo trovare: TCA TEST (Berg and Akiyoshi, 1961), BENTOTEST (Jacob, 1962), PROTOCHECK (Ever), PROTEOTEST (Vason), VINEO (Biorad), HEAT TEST (Pocock and Rankine, 1973). Essendo basati su principi di funzionamento diversi,

questi metodi forniscono anche risultati differenti, lasciando sempre nel produttore il dubbio sul corretto dosaggio di bentonite da utilizzare. Il test a caldo, basato su una simulazione accelerata di quello che può avvenire naturalmente in bottiglia, sembra essere attualmente quello più attendibile e con minori problemi di sovra stima, permettendo di preservare l'aroma ottenendo ottimi risultati di stabilità.

Materiali e metodi

3.1 Campioni di uva

L'uva è stata fornita dal CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) di Conegliano (TV) dalla campagna viticola 2023 e proviene dal loro campo sperimentale situato a Susegana (TV), i campioni sono stati prelevati dal campo e immediatamente congelati, l'estrazione del mosto è avvenuta quindi su campioni preventivamente scongelati in presenza di una piccola quantità di metabisolfito di potassio per prevenire l'ossidazione e poi pressati direttamente in laboratorio. Il mosto prodotto ha subito una prima centrifugazione a 10000 g per 10 min, ed in seguito una filtrazione a 1.2 μm (GF/A, Whatman).

3.2 Analisi quantitativa mediate protocollo KDS

Le proteine totali sono state precipitate mediante il metodo "potassio dodecil solfato" (KDS) e valutate quantitativamente per via colorimetrica (Vincenzi et al., 2005) con lettura a 550 nm.

Procedimento: si preleva 1 mL di mosto filtrato in precedenza e lo si mette in provetta, si aggiunge 10 μL di SDS al 10% e si agita per miscelare bene la soluzione, le provette poi verranno messe a bagnomaria bollente per 5 min in quanto si velocizza il processo di denaturazione delle proteine.

Il SDS (sodio dodecil solfato) è un detergente anionico che si lega alle catene polipeptidiche denaturandole e conferisce loro una carica negativa uniforme rendo le proteine solubili in soluzione acquosa.

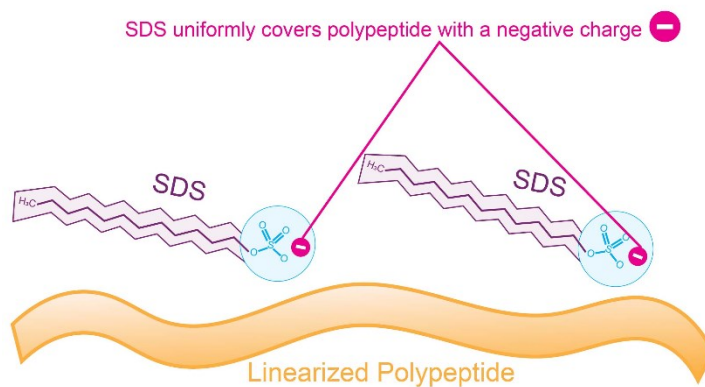


Figura 12: Azione di SDS su proteina (Pallabi Roy Chakravarty)

Una volta denaturate le proteine si aggiungono 250 μL di cloruro di potassio 1M (KCl) e si lascia incubare per almeno 2 ore a temperatura ambiente in agitazione, oppure overnight senza agitazione.

Il KCl aggiunto alla soluzione si divide in ioni K^+ e Cl^- che interagiscono con le molecole di SDS e le proteine. In particolare, lo ione K^+ in soluzione andrà in competizione con il sodio dell'SDS, andandolo a sostituire. Il sale potassico del dodecil solfato è molto meno solubile della sua controparte sodica, e tende quindi a precipitare, trascinando sul fondo anche le proteine a cui si è legato tramite la sua coda idrofobica.

Una volta che le proteine sono precipitate si centrifuga a 14000 g per 15 min e si elimina il surnatante, mentre il pellet residuo viene risospeso con 1mL di KCL 1M, questa procedura serve per eliminare tutto il SDS rimasto nel pellet di proteine, il lavaggio va ripetuto 3 volte eseguendo sempre la centrifugazione a ogni ciclo.

Una volta ottenuto, il pellet purificato si risospende nel volume iniziale con acqua distillata. Da ciascun campione ottenuto prelevare 25 μL di soluzione e metterli in un pozzetto della piastra ELISA, a ogni campione aggiungere 200 μL di reagente. Il reagente è composto da 50 parti di BCA (acido bicinconico) e 1 parte di solfato rameico, questa soluzione serve per formare il composto cromoforo. Sulla piastra ELISA bisogna costruire anche la retta di taratura, che viene fatta utilizzando albumina di siero di bovino (BSA) in concentrazione crescente da 0 mg/L a 1000 mg/L; la retta di taratura ci servirà in seguito per ricavare i valori delle concentrazioni proteiche dei nostri campioni.

La piastra, una volta pronta, si mette a incubare a 37°C per 30 min e poi letta con spettrofotometro (Microplate Reader, Euroclone) a 550 nm.

3.3 Analisi qualitativa mediante elettroforesi (SDS-PAGE)

Per preparare il pellet per l'elettroforesi sono stati prelevati 200 μL di mosto ai quali sono stati aggiunti 800 μL di etanolo 100%, la soluzione è stata lasciata reagire *overnight* e in seguito centrifugata a 14000 g per 10 minuti, il surnatante è stato eliminato e i pellet ottenuti sono stati lasciati all'aria aperta per far evaporare l'etanolo rimanente.

I pellet sono stati risospesi in 25 μL di tampone di caricamento contenente 15% (v/v) glicerolo e 1.5 % (p/v) SDS in Tris-HCl pH 6.8 e scaldati a 100 °C per 5 minuti prima

dell'analisi. Sono stati preparati gel (1.5 mm di spessore) con T=14% (acrilammide-N,N'metilenbisacrilammide 29:1), utilizzando l'apparato Mini-Protean III (Bio- Rad). Sono stati usati come standards di peso molecolare gli SDS-PAGE Molecular weight Standards Broad Range (Bio-Rad).

Le corse venivano condotte con un tampone di corsa costituito da 25 mM Tris, 192 mM glicina e 0.1% (p/v) SDS, ad amperaggio costante (25 mA) e terminavano quando il fronte di migrazione, visualizzato con blu di bromofenolo, raggiungeva la base del gel. I gel sono stati poi colorati con soluzione di Coomassie colloidale.

Risultati e discussione

4.1 Analisi quantitativa della concentrazione proteica

Semenzale	Parentali
SRa_5_14_2	GleraxBianca
SRa_6_7_3	GleraxRegent
SRa_7_10_4	GleraxBianca
SRa_8_12_2	GleraxBianca
SRa_9_8_1	GleraxKozma20/3
SRa_9_10_2	GleraxKozma20/3
SRa_9_10_5	GleraxKozma20/3
SRa_9_11_2	GleraxKozma20/3
SRa_10_10_1	GleraxKozma20/3
SRa_10_12_4	GleraxKozma20/3
SRa_10_12_8	GleraxKozma20/3
SRa_11_7_6	GleraxKozma20/3
SRa_11_10_5	GleraxKozma20/3
SRa_11_11_6	GleraxKozma20/3
SRa_12_7_8	GleraxKozma20/3
SRa_12_11_4	GleraxKozma20/3
SRa_13_0_1	GleraxKozma20/3
SRa_13_1_3	GleraxKozma20/3
SRa_13_10_8	GleraxKozma20/3
SRa_14_0_3	GleraxKozma20/3
SRa_14_8_4	GleraxKozma20/3
SRa_15_6_4	GleraxKozma20/3
SRa_15_10_1	GleraxSoreli
SRa_16_3_8	GleraxSoreli
SRb_1_66_2	GleraxSoreli
SRb_4_40_5	Glera10xCalardis Blanc
SRb_4_63_5	Glera19xCalardis Blanc
SRb_6_9_2	Glera10xSK-00-1/1
7_3_8	GleraxSolaris
Glera	-

Figura 13: campioni analizzati con i rispettivi parentali

Essendo le casse proteiche la principale causa di instabilità negli spumanti, e vini banchi in generale, è fondamentale conoscere la concentrazione di proteine presente in queste nuove varietà.

Si è deciso di svolgere lo studio direttamente sul mosto per vedere la reale concentrazione derivante dal metabolismo della pianta, se lo studio fosse stato condotto sul vino ci sarebbero state interferenze di proteine prodotte da altri microrganismi (lieviti e batteri) o dati falsati a causa di chiarifiche o altri trattamenti enologici.

Come già detto in precedenza, i campioni di uva congelati sono stati forniti dal CREA e provengono dalla campagna viticola 2022-2023. In totale sono stati forniti 29 campioni di varietà resistente di Glera e un campione di Glera tradizionale usato come campione di controllo, l'analisi di ogni campione è stata replicata nove volte per avere un valore statistico significativo.

Di seguito è riportata la tabella con tutti i valori medi di concentrazione proteica in mg/L, i dati presentano anche dei buoni valori di ripetibilità.

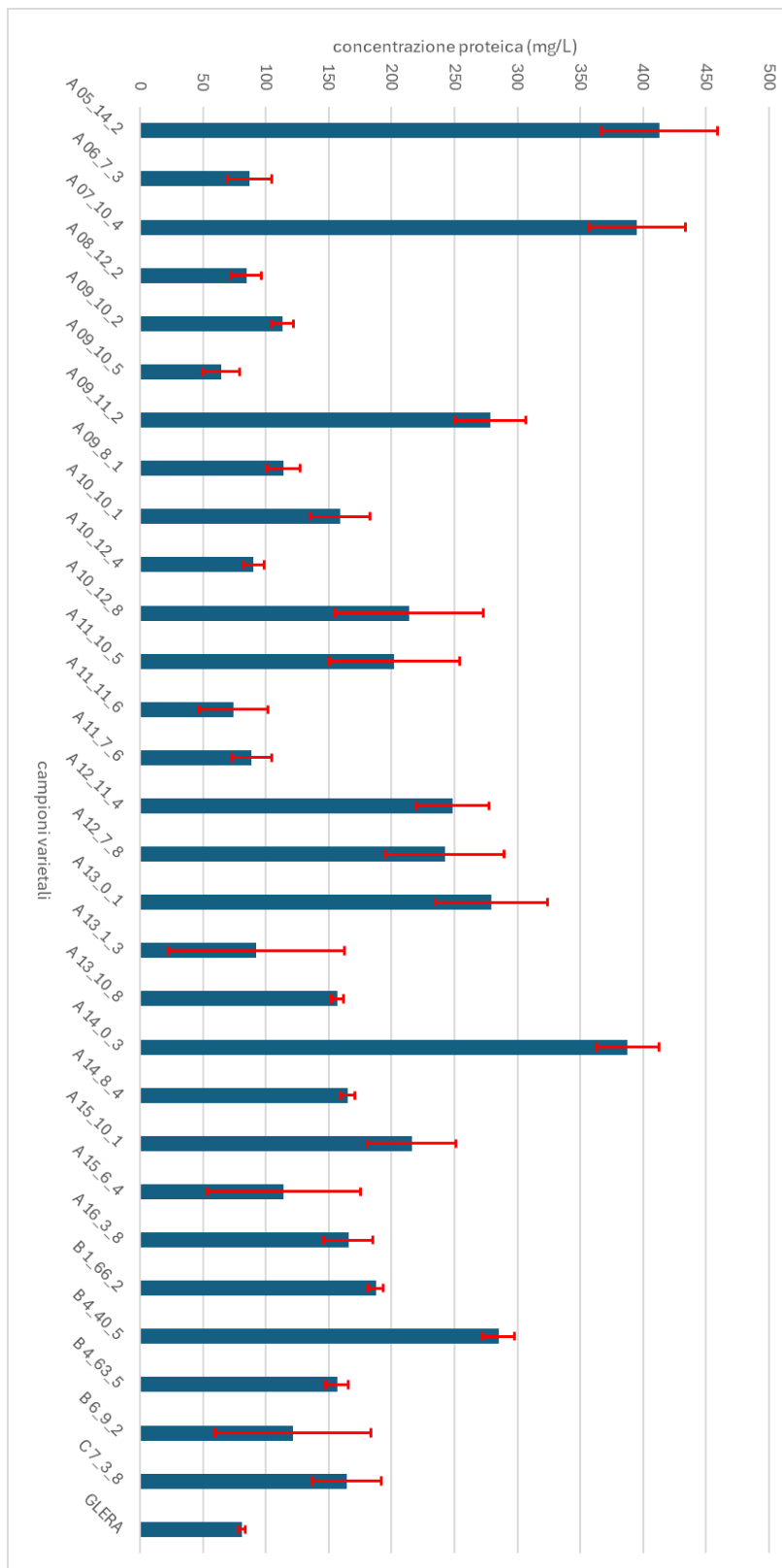


Figura 14: grafico raffigurante le concentrazioni (mg/L) di tutte le varietà resistenti analizzate

Oltre all'analisi quantitativa è stata eseguita anche un'analisi di tipo qualitativo mediante elettroforesi per evidenziare eventuali differenze nel profilo proteico. Le analisi hanno portato ai seguenti risultati.

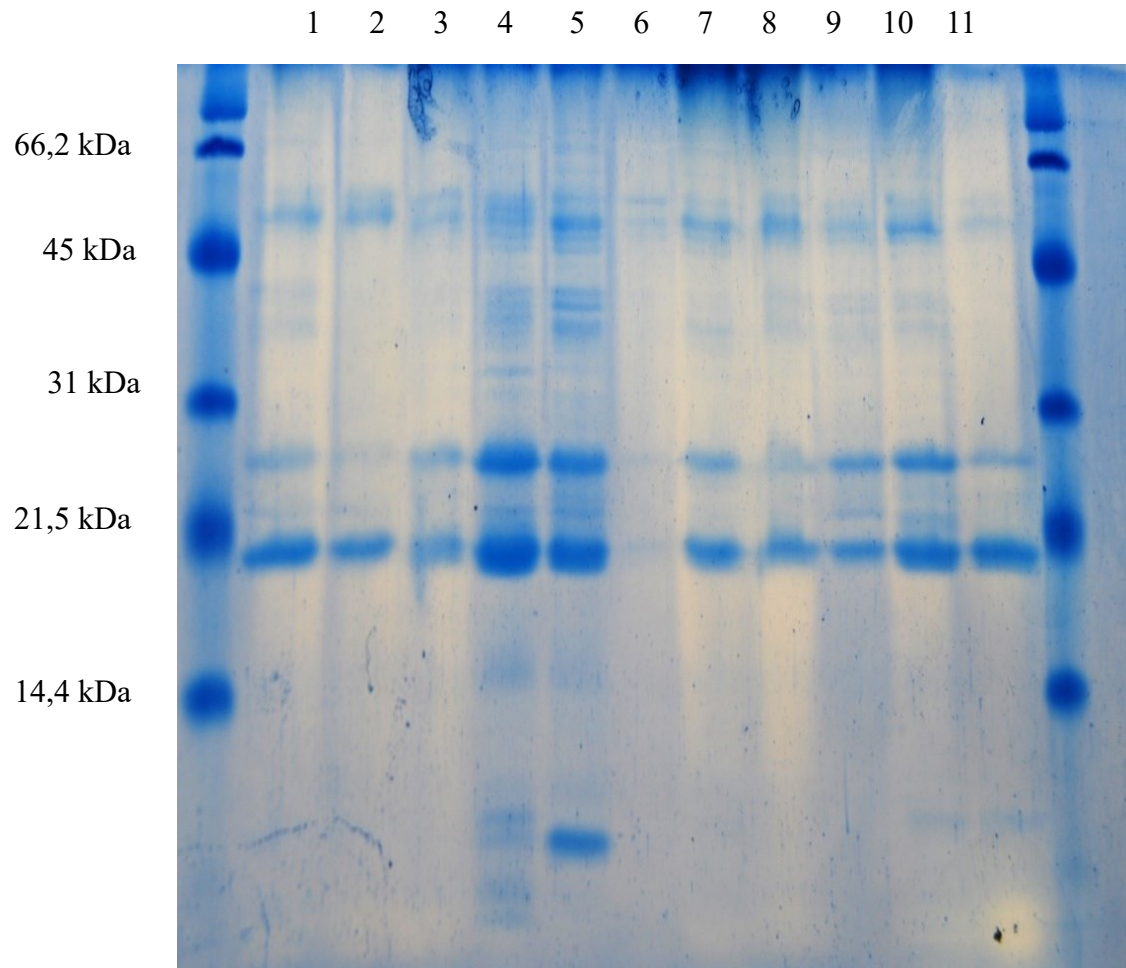


Figura 15 gel 1 di proteine di mosti da vitigni resistenti: 1 (13_0_1), 2 (12_11_4) 3(16_3_8), 4 (Kozma 20-3) 5 (5_14_2), 6 (9_10_5), 7 (13_1_3), 8 (15_10_2), 9(Glera), 10 (7_3_8), 11 (8_12_2)

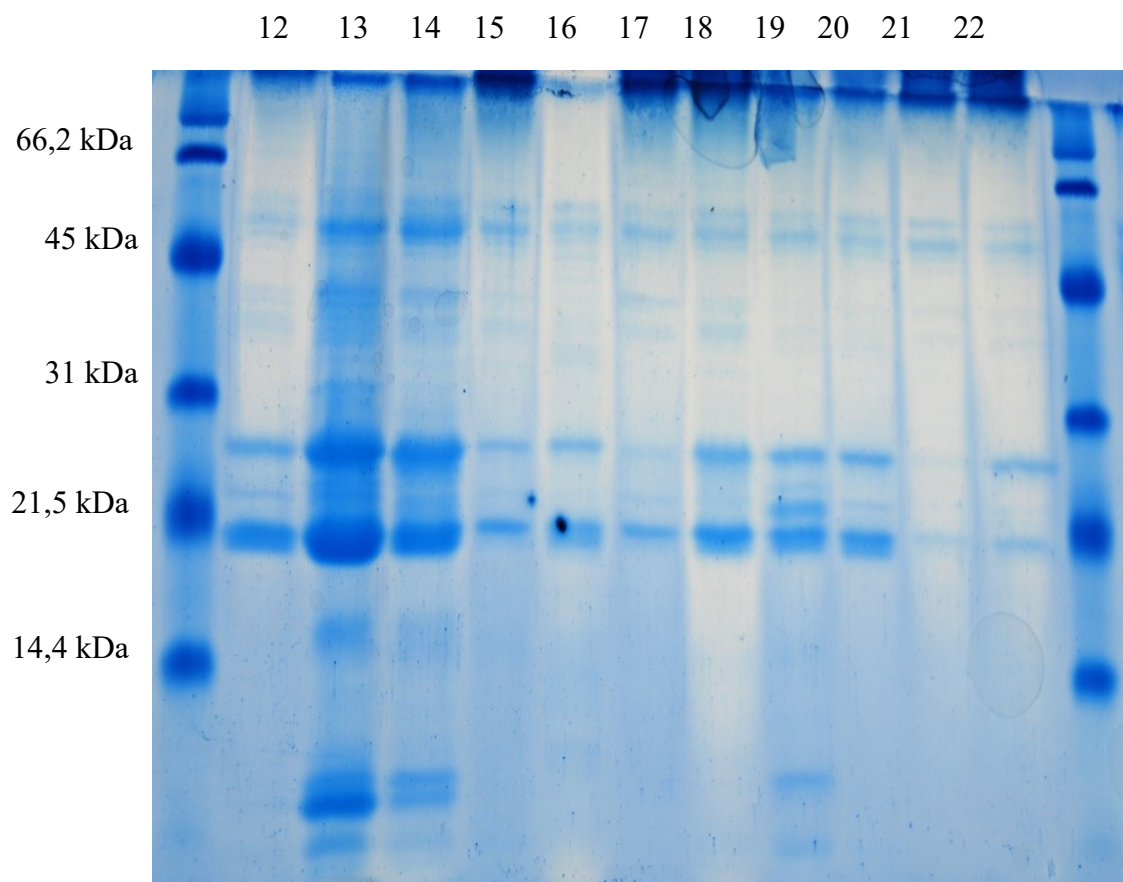


Figura 16 gel 2 di proteine di mosti da vitigni resistenti: 12 (11_7_6), 13 (Bianca), 14 (Solaris), 15(9_11_2), 16 (13_10_8), 17(15_6_4), 18 (10_12_8), 19 (1_66_2), 20 (9_8_1), 21 (10_10_1), 22(11_10_5)

23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

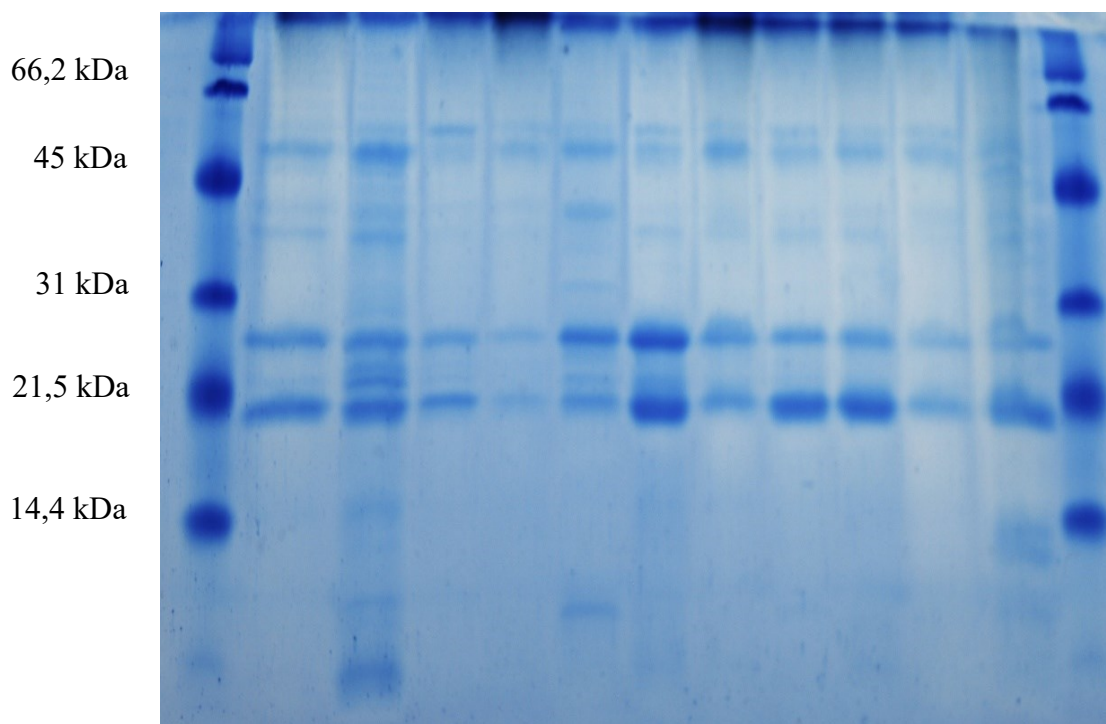


Figura 17: gel 3 di proteine di mosti varietà gi Glera resistenti: 23 (6_9_2), 24 (11_11_6), 25(14_8_4), 26(12_7_8), 27 (10_12_4), 28 (6_7_3), 29 (7_10_4), 30 (9_10_2), 31 (4_63_5), 32(4_40_5), 33 (14_0_3)

Come si vede dalla Figura 14 la variabilità delle concentrazioni di proteina tra i campioni è ampia.

Il Glera tradizionale risulta tra i campioni con la concentrazione più bassa (80.9 mg/L) come ci si aspettava in base ai dati di letteratura noti. Anche il profilo proteico (Figura 15, lane 9) conferma la presenza delle tipiche bande corrispondenti a diverse isoforme di Thaumatin-like-proteins tra 20 e 25 kDa e all'invertasi a 60 kDa, mentre risulta praticamente assente la chitinasi a 30 kDa.

Per l'analisi quantitativa mancano i dati delle varietà parentali, che però sono state analizzate in elettroforesi. In particolare, Kozma 20-3 (Figura 15, lane 4) e Bianca (Figura 16, lane 13) hanno mostrato delle bande molto intense seguite da Solaris (Figura 16, lane 14). Inoltre, Bianca e Solaris hanno mostrato la presenza di una banda aggiuntiva a basso PM che potrebbe corrispondere alla Lipid transfer protein (9 kDa) già riscontrata in uva,

mentre Kozma ne contiene solo tracce. Mancava invece la varietà Regent per la quale non è stato possibile fare l'analisi elettroforetica.

Come già detto in precedenza l'analisi quantitativa delle proteine nelle diverse varietà resistenti ha mostrato una notevole variabilità.

I due campioni con il maggiore contenuto di proteina (> 400 mg/L) sono A_05_14_2 e A_07_10_4, entrambi ottenuti da incrocio con Bianca. Stranamente il terzo incrocio con Bianca (A_08_12_2) ha mostrato invece un valore molto basso, comparabile alla Glera. I dati sono parzialmente confermati dall'analisi elettroforetica: il campione A_05_14_2 (Figura 15, lane 5) è uno di quelli con la maggiore intensità delle bande proteiche e inoltre mostra la stessa banda a 9kDa della varietà Bianca, mentre il campione A_08_12_2 (Figura 15, lane 11) ha in effetti un profilo proteico con bande meno intense. Solo per la varietà A_07_10_4 (Figura 17 lane 29) non c'è corrispondenza tra il contenuto proteico misurato per via colorimetrica e l'intensità delle bande elettroforetiche, che sono meno intense del previsto. Considerando che l'elettroforesi è denaturante ed è stata eseguita anche in presenza di 8M urea per poter separare meglio eventuali aggregati proteici, la spiegazione più plausibile per questa discrepanza è una sovrastima del contenuto proteico determinata con il metodo colorimetrico. Si tratta in effetti di un metodo basato sulla reazione dell'acido bicinconinico che, nonostante l'accurato protocollo di purificazione delle proteine che è stato applicato (KDS, Vincenzi et al, 2005), potrebbe ancora risentire di alcune interferenze dovute alla presenza di polifenoli.

Anche l'unico incrocio ottenuto dalla varietà Regent (A_06_7_3) ha mostrato una discrepanza tra quantificazione ed elettroforesi. Anche se il contenuto proteico risulta apparentemente basso, l'elettroforesi (Figura 17, lane 28) mostra due bande di TLP molto intense.

Il gruppo più numeroso è quello costituito dalle varietà ottenute da incrocio con Kozma 20-3. La numerosità di questo gruppo permette di mettere in evidenza come il contenuto proteico sia ereditato in maniera differente dai diversi incroci. In ogni caso, ad eccezione del campione A_14_0_3 (che risulta avere un contenuto proteico elevato, ma un profilo elettroforetico "mediamente" intenso), nessuno dei campioni arriva ad avere una quantità di proteine pari a quelle riscontrate con gli incroci di Bianca. Nessun degli incroci di Kozma ha mostrato la presenza della banda di LTP a 9kDa, come atteso data la mancanza della proteina in entrambi i genitori.

Entrambi gli incroci ottenuti da Soreli (A_15_6_4 e A_16_3_8) hanno mostrato un contenuto proteico superiore alla Glera ma non elevato come in altri casi (114 e 165 mg/L, rispettivamente). Non è stato possibile fare un confronto con il parentale perché anche in questo caso, per motivi tecnici, non è stato possibile analizzare il Soreli.

Il campione B_1_66_2 è interessante non tanto per il contenuto proteico che è nella media (187.3 mg/L) ma per la presenza, nel profilo elettroforetico, di una isoforma di TLP aggiuntiva non presente negli altri campioni (Figura 16, lane 19).

I due incroci ottenuti da Calardis hanno mostrato entrambi valori di proteina superiore alla Glera, ma con valori nella media e profili elettroforetici molto simili.

Anche l'incrocio ottenuto da Solaris, nonostante il profilo del parentale sia molto intenso (Figura 16, lane 14), ha mostrato un contenuto proteico relativamente contenuto (164 mg/L), confermato anche dal profilo elettroforetico nella media (Figura 15 lane 10).

Conclusioni

Mettendo insieme l'analisi quantitativa e qualitativa si pone in luce come ci sia una notevole variabilità nel profilo proteico all'interno delle varietà resistenti, suggerendo che il carattere di resistenza non è dato solo da una maggior espressione delle proteine di difesa nella pianta, ma che sono evidentemente coinvolti anche altri meccanismi di difesa.

È comunque evidente come il contenuto proteico dei parentali possa avere un effetto su quello degli incroci ottenuti, in particolare gli incroci ottenuti dalla varietà Bianca hanno raggiunto concentrazioni proteiche superiori a 400 mg/L.

Al di là dell'effetto che può avere sui meccanismi di resistenza, è importante conoscere il contenuto proteico dei nuovi incroci, in quanto elevate concentrazioni proteiche nei mosti richiedono l'adozione di tecniche di stabilizzazione più invasive. Inoltre, trattandosi in questo caso specifico di incroci mirati ad ottenere delle varietà di Glera resistente, un maggior contenuto proteico potrebbe avere anche delle ricadute sulle caratteristiche della schiuma dei vini spumanti ottenuti.

Considerando la variabilità nell'espressione delle proteine che include anche un effetto delle condizioni ambientali, per confermare i dati trovati in questo elaborato sarà necessario ripetere le analisi anche in annate successive.

Sitografia

La resistenza a peronospora e oidio in vite: selezione assistita da marcatori molecolari (Agraria.org)

Mercato vino biologico: 2022-2028, crescita media annua del 12% (winemeridian.com)

Si chiamano PIWI, ma cosa sono in realtà le “varietà resistenti”? - Slowine (slowfood.it)

Vino, sempre più consumatori scelgono quello sostenibile - Di Laura Saggio (terraevita.edagricole.it)

Bibliografia

Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., & Di Gaspero, G. (2009). "Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site." *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 163-176.

B. De Nardi, F. Santellani, T. Possamai, R. Velasco. "Breeding for mildew resistance to improve environmental and socio-economic sustainability in hotspot areas of Veneto."

Dangl, J.L., Horvath, D.M., & Staskawicz, B.J. (n.d.). "Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment."

Durrant, W.E., & Dong, X. (2004). "Systemic acquired resistance."

Ebrahim, S., et al. (2011). "Pathogenesis-related proteins: chitinases and β -1,3-glucanases in defense against fungal pathogens."

Enoki, S., & Suzuki, S. (2016). "Pathogenesis-Related Proteins in Grape."

Flor, H.H. (1971). "Current status gene-for-gene concept."

Grover, A. (2012). "Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles."

Jongedijk, E., et al. (1995). "Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants."

J. C. McRae, G. J. Falconer (2015) "Tannins and their complex interaction with proteins and polysaccharides in wine"

Jones, J.D.G., & Dangl, J.L. (2006). "The plant immune system."

Kaur, S., et al. (2015). "Characterization of plant chitinases and their genes in response to fungal infections and abiotic stress."

Liu, J.-J., & Ekramoddoullah, A.K.M. (2006). "The Multitasks of Plant Pathogenesis-Related Proteins (PR-5) in Host Defense."

Monteiro, S., et al. (2003). "Expression of pathogenesis-related proteins in grapevine leaves induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*."

Pascal Ribéreau-Gayon, Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2^a edizione, John Wiley & Sons, 2006.

Pocock, K.F., Hayasaka, Y., McCarthy, M.G., & Waters, E.J. (2000). "Thaumatococcus-like Proteins and Chitinases, the Haze-Forming Proteins of Wine, accumulate during Ripening of Grape (*Vitis vinifera*) Berries and Drought Stress Does Not Affect the Final Levels per Berry at Maturity."

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., & Hunt, M.D. (1996). "Systemic Acquired Resistance."

Sharma, P., et al. (2011). "Chitinase: Role in Pathogenicity and Host-Pathogen Interactions."

Tanford, C. (1968). "Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation."

Velazhahan, R., et al. (1999). "The PR-5 family: thaumatococcus-like proteins."

Vincenzi, S., Annarita Panighel, Diana Gazzola, Riccardo Flamini, Andrea Curioni (2015) "Study of combined effect of proteins and bentonite fining on the wine aroma loss"

Vincenzi, S., Marangon, M., Tolin, S., Curioni, A. (2011). "Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability."

Vincenzi, S., Mosconi, S., Zoccatelli, G., Dalla Pellegrina, C., Veneri, G., Chignola, R., Peruffo, A.D.B., Curioni, A., & Rizzi, C. (2005). "Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine."