

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territori e Sistemi Agro Forestali

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO PROTEICO NEI VINI OTTENUTI DA VARIETÀ RESISTENTI

Docente di riferimento:

Professor Simone Vincenzi

Laureando: Alberto Bernardi

Matricola n. 1220874

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO -----	3
ABSTRACT -----	4
VITIGNI RESISTENTI: -----	
1.1 STORIA DEI VITIGNI RESISTENTI	5
1.2 COSA SONO I VITIGNI RESISTENTI	7
1.3 VARIETÀ RESISTENTI ISCRITTE A REGISTRO	7
1.4 MECCANISMI DI RESISTENZA AGLI ATTACCHI FUNGINI	9
1.5 GENI NOTI CHE CODIFICANO PER LA RESISTENZA AI PATOGENI	9
1.6 POTENZIALITÀ E LIMITI DEI VITIGNI RESISTENTI	11
PROTEINE: -----	
2.1 CARATTERISTICHE E STRUTTURA DELLE PROTEINE	12
2.2 PROTEINE NELL'UVA	14
2.3 PROTEINE IN VINIFICAZIONE	15
2.4 PROTEINE NEL VINO	17
2.5 PROTEINE PR (Pathogenesis related)	17
2.6 FUNZIONI E CRITICITÀ DELLE PROTEINE NEL VINO	18
STABILITA' DELLE PROTEINE: -----	
3.1 CASSE PROTEICA	19
3.2 STABILIZZAZIONE CON BENTONITE	20
MATERIALI E METODI -----	22
RISULTATI E DISCUSSIONE -----	24
CONCLUSIONI -----	30
SITOGRAFIA -----	31
BIBLIOGRAFIA -----	31

Riassunto

I vitigni PIWI sono delle varietà di vite note per la loro resistenza alle crittogame. Grazie a questa proprietà suscitano molto interesse perché sembrano essere in grado di risolvere una serie di problematiche quali: costi economici dei trattamenti, inquinamento dell'ambiente e soprattutto limiterebbero l'uso del rame, un metallo pesante che causa problemi sia legislativi (limite nel vino pari a 1 mg/L) sia salutistici. La resistenza alle avversità fungine manifestata da queste varietà è dovuta ad incroci che hanno mirato all'introduzione di geni di resistenza. Attualmente, però, ancora non si sa per cosa codifichino questi geni di resistenza. Si sa infatti che la resistenza ai patogeni può essere dovuta a diversi meccanismi, tra cui sintesi di polifenoli (fitoalessine) o di proteine di difesa. Per tale motivo in questo studio è stato caratterizzato sia qualitativamente che quantitativamente il profilo proteico di 27 mosti ottenuti dalle seguenti varietà PIWI: Aromera, Cabernet cortis, Fleurtaï, Johanniter, Nephis, Prior, Rytos, Solaris, Soreli, Souvigner gris. L'analisi qualitativa è stata eseguita attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide. Da questa si evince come non vi siano differenze significative tra il profilo delle varietà in oggetto rispetto a quelle convenzionali. L'analisi quantitativa eseguita per via colorimetrica ha invece evidenziato come in alcuni vitigni il contenuto proteico sia più elevato rispetto alla media. Questi risultati mettono in luce una possibile problematica nella gestione dei vini ottenuti da varietà PIWI in quanto ad oggi non esistono metodi non invasivi per ottenere la stabilità proteica. Per tale motivo risulta chiaro che un vino contenente elevate quantità di proteina richiede dosi più elevate di bentonite che portano ad un depauperamento organolettico del vino.

Abstract

PIWI vines are vine varieties known for their resistance to cryptogams. For this property they arouse a lot of interest because they seem to be able to solve a series of problems such as: economic costs of treatments, environmental pollution and especially they would limit the use of copper, a heavy metal that causes problems from both legislative (limit in wine equal to 1 mg / L) and health point of view. The resistance to fungal adversities shown by these varieties depends on resistance genes introduced by crossing.

At present, however, it is not yet known what these resistance genes code for. In fact, it is known that resistance to pathogens can be due to several mechanisms, including synthesis of polyphenols (phytoalexins) or defence proteins. For this reason, in the present study the protein profile of 27 grape juice obtained from the following PIWI varieties: Aromera, Cabernet cortis, Fleurtai, Johanniter, Nephis, Prior, Rytos, Solaris, Soreli, Sauvignier gris, was both qualitatively and quantitatively characterized. Qualitative analysis was performed by means of polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed no significant differences between the protein profile of resistant varieties and that of the conventional ones. Quantitative analysis done by colorimetric test showed instead that in some samples the protein content is higher than the average content in grape juice. This finding highlights a possible problem in the management of wines obtained by PIWI varieties as today there are no non-invasive methods to obtain protein stability. For this reason, it is clear that a wine containing high quantities of protein would require higher doses of bentonite which would lead to an organoleptic impoverishment of the wine.

Vitigni Resistenti

1.1 STORIA DEI VITIGNI RESISTENTI

Fino alla metà del 1800 la vite veniva propagata e coltivata in Europa in maniera molto elementare: per moltiplicare la vite era sufficiente prelevare un pezzo di tralcio dalla pianta madre e dopo averlo messo a dimora esso radicava dando origine ad una pianta identica a quella originaria (clone); i vigneti inoltre non necessitavano di particolari cure se non la potatura e la concimazione.

Nella seconda metà dell'800 tutto cambiò a causa dell'arrivo di tre parassiti provenienti dall'America. Già da anni vi erano scambi scientifici e commerciali ma si presume che le lunghe traversate oceaniche fungessero da quarantena per tali parassiti. Sembra che con l'avvento del battello a vapore, il quale ridusse drasticamente i tempi di navigazione, si verificò l'arrivo in Europa di due parassiti fungini noti come peronospora e oidio ed un insetto chiamato fillossera.

Gli effetti che questo avvenimento ebbe sulla viticoltura europea furono devastanti con perdite dei raccolti dovute agli attacchi fungini e moria delle piante dovuta ai danni causati da fillossera. Era chiaro che si dovessero trovare efficaci soluzioni al problema quanto prima. Un viticoltore francese di nome Lèopold Lalliman ben presto mise a punto una tecnica usata ancora oggi e chiamata innesto. Questa permette di superare i problemi relativi agli attacchi di fillossera ma è totalmente inefficace nel mettere a riparo la vite da avversità fungine.

Negli anni '30 iniziarono i primi studi sull'ibridazione. Questi miravano a dare vitigni resistenti alle avversità ma al contempo uve di qualità. A Conegliano il Professor Dalmasso testò vari ibridi produttori diretti ovvero le piante prodotte da incrocio tra viti americane ed europee. Gli IPD si dimostrarono ottimi nel resistere agli attacchi fungini ma portando con sé un ingente quantità di patrimonio genetico non europeo si rivelarono scadenti rispetto alla qualità delle uve e quindi dei vini.

Lo step successivo fu quello di cercare di mantenere i geni responsabili delle qualità di resistenza eliminando al contempo le sequenze che codificano per caratteri di qualità indesiderati; nacquero così i vitigni resistenti. Per fare ciò si re incrociarono gli IPD con il

parentale europeo al fine di ridurre via via il patrimonio genetico non europeo. Questo procedimento potrebbe sembrare facile all'apparenza ma in realtà richiede molta dedizione e soprattutto molto tempo. Infatti, una volta effettuata l'impollinazione artificiale con successivo ottenimento del seme d'interesse questo va messo a dimora ed è necessario attendere anni prima di poter valutare le caratteristiche fenotipiche del nuovo clone ottenuto. Solo negli ultimi tempi grazie a speciali tecniche è stato possibile valutare la qualità del clone ottenuto direttamente dal seme. Per questi motivi i tempi necessari allo sviluppo di varietà di vite resistenti alle avversità ed al contempo produttrici di uva qualitativamente discreta sono molto lunghi.

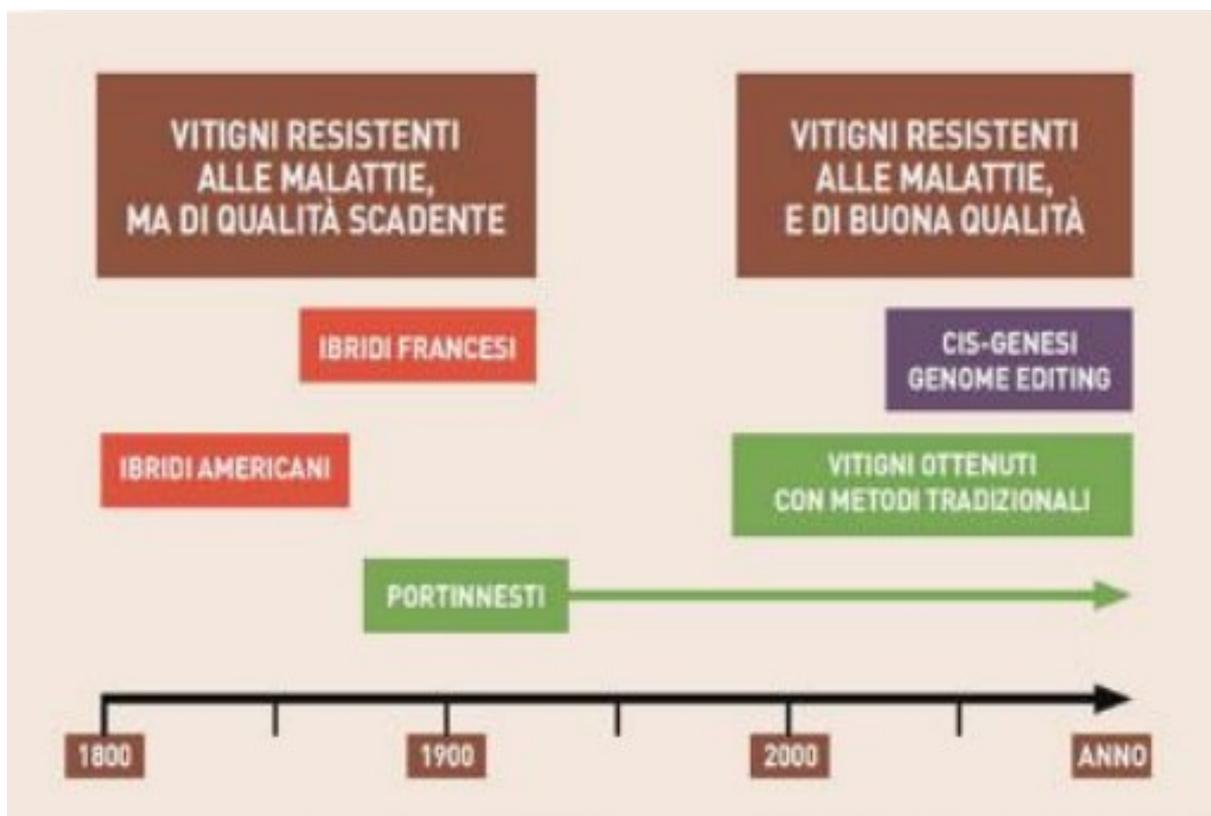


Figura 1: Evoluzione temporale dei vitigni (Zulini, 2016).

1.2 COSA SONO I VITIGNI RESISTENTI

I vitigni resistenti anche conosciuti con il termine PIWI (acronimo tedesco del termine PilzWiderstandsfähige che sta a significare letteralmente “resistente ai funghi”) sono una classe di vitigni prodotti a partire da incrocio intraspecifico di *Vitis vinifera* con varietà di vite americane o asiatiche. Le piante prodotte vengono re incrociate più volte e successivamente selezionate fino ad ottenere una pianta che presenti buone qualità di resistenza unite a buone qualità organolettiche dell’uva. La caratteristica peculiare dei vitigni PIWI è quella di possedere un patrimonio genetico tale da permettere di generare un’efficace risposta difensiva quando vengono in contatto con agenti fungini quali ad esempio peronospora ed oidio. Si suppone che la coevoluzione della vite americana con i patogeni in questione sia responsabile dell’abilità nel difendersi anche se ad oggi non vi sono certezze in merito. Altra peculiarità di questi vitigni è la grande somiglianza alla vite europea in quanto in essi è presente solo un 4-5% di patrimonio genetico non europeo.

1.3 VARIETÀ RESISTENTI ISCRITTE A REGISTRO

Nel registro nazionale delle varietà di vite ad oggi risultano iscritte 36 differenti cultivar PIWI le quali derivano principalmente da Germania ed Italia; va precisato che lo studio condotto in questa tesi è incentrato solo su dieci di queste: Aromera, Cabernet cortis, Fleurtaï, Johanniter, Nephis, Rytos, Solaris, Soreli, Souvigner gris, Prior.

Origine	Istituto	Anno Nome	Col.	Inscrizione	Proponente
				in Italia	
Germania	Julius Kühn-Institut (JKI)	1967 Regent	N	2009	Provincia Autonoma di Bolzano
Ungheria	Trasdánubian Research Institute of Viticulture and Enology – University of Horticulture and Food Industry	1967 Poloskey Muskotály	B	2019	Vinai Viticoltori Trentini
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1975 Bronner	B	2009	Provincia Autonoma di Bolzano
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1968 Johanniter	B	2013	Istituto Agrario S. Michele all'Adige
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1973 Helios	B	2013	Istituto Agrario S. Michele all'Adige
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1975 Solaris	B	2013	Istituto Agrario S. Michele all'Adige
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1982 Cabernet	N	2013	Istituto Agrario S. Michele all'Adige
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1983 Cabernet	N	2013	Istituto Agrario S. Michele all'Adige
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1987 Prior	N	2013	Istituto Agrario S. Michele all'Adige
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1983 Souvignier Gris	B	2014	Piwi International e Provincia Autonoma di Bolzano
Germania	Istituto di Ricerca di Friburgo	1987 Muscaris	B	2014	Piwi International e Provincia Autonoma di Bolzano
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Cabernet Eidos	N	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Cabernet Volos	N	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Fleurital	B	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Julius	N	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Merlot Kanthus	N	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Merlot Khonus	N	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Sauvignon Nepis	B	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Sauvignon Nyros	B	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2002 Soreli	B	2015	Università degli Studi di Udine
Italia	Università degli Studi di Udine, Istituto di Genomica Applicata GA	2003 Sauvignon Kretos	B	2015	Università degli Studi di Udine
Germania	Valentin Blattner (breeder privato)	1991 Cabernet Blanc	B	2020	Vitis Rauscedo
Germania	Valentin Blattner (breeder privato)	1991 Cabernet	N	2020	Vitis Rauscedo
Germania	Valentin Blattner (breeder privato)	1991 Pinoth	N	2020	Vitis Rauscedo
Ungheria	Trasdánubian Research Institute of Viticulture and Enology – University of Horticulture and Food Industry	2004 Pinoth Regina	N	2020	Civl. Consorzio Innovazione Vite
Italia	Fondazione Edmund Mach (FEM)	1994 Fernantis	N	2020	Fondazione Edmund Mach (FEM)
Italia	di San Michele all'Adige (TN)	1994 Nernantis	N	2020	Fondazione Edmund Mach (FEM)
Italia	Fondazione Edmund Mach (FEM)	1994 Charvir	B	2020	Fondazione Edmund Mach (FEM)
Italia	di San Michele all'Adige (TN)	1994 Vahosia	B	2020	Fondazione Edmund Mach (FEM)
Italia	di San Michele all'Adige (TN)	1994 Pinot Iskra	B	2020	Università degli Studi di Udine
Italia	Università di Udine, Istituto di Genomica Applicata (IGA)	2002 Kersus	B	2020	Università degli Studi di Udine
Italia	Università di Udine, Istituto di Genomica Applicata (IGA)	2002 Pinot Kors	N	2020	Università degli Studi di Udine
Italia	Università di Udine, Istituto di Genomica Applicata (IGA)	2002 Volturis	N	2020	Università degli Studi di Udine
Repubblica Ceca	Breeding Station of Vine Grape, Ltd.	1964 Savar	N	2021	Fondazione Edmund Mach (FEM)
Ungheria	Trasdánubian Research Institute of Viticulture and Enology – University of Horticulture and Food Industry	2001 Palma	B	2021	Fondazione Edmund Mach (FEM)
Italia	Scoperta nel 2005 da Francesco e Marco Ranchella	2005 Ranchella	N	2021	Francesco Ranchella

Figura 2: tabella varietà PIWI iscritte al registro nazionale delle varietà di vite (registro nazionale varietà di vite).

1.4 MECCANISMI DI RESISTENZA AGLI ATTACCHI FUNGINI

I meccanismi di difesa nelle piante possono essere distinti in meccanismi costitutivi ed indotti. Le resistenze costitutive sono già presenti nelle piante prima del contatto con il patogeno e sono riconducibili a fattori morfo-anatomici della foglia, del grappolo, dell'acino ed alla presenza di composti con attività antifungina preformati, come ad esempio composti fenolici. Nel caso di resistenza indotta l'attivazione di meccanismi di difesa è determinata dall'attacco del patogeno; quindi, l'espressione della reazione di difesa è preceduta dal riconoscimento del patogeno da parte della pianta. La risposta di difesa si basa sul riconoscimento da parte della cellula vegetale attaccata di segnali del patogeno: tali segnali attivano la traduzione a livello genico che porta ad una rapida morte cellulare. Tale risposta ipersensibile (Hypersensitive Response, HR) determina un blocco della crescita e diffusione del patogeno che non può colonizzare i tessuti circostanti. La reazione ipersensibile è generalmente associata ad un solo gene dominante, è però razza-specifica e viene chiamata resistenza verticale (Flor, 1971). Sono state poi descritte reazioni di tipo sistemico (Systemic Active Reaction, SAR) le quali si basano sull'attivazione di geni che codificano per la produzione di proteine legate alla patogenesi (Pathogenesis Related Protein, PR) come glucanasi e chitinasi che agiscono direttamente sul patogeno.

1.5 GENI NOTI CHE CODIFICANO PER LA RESISTENZA AI PATOGENI

Il gene VpPR10.2 isolato in *Vitis pseudoreticulata* determina resistenza ai funghi ed in particolare a *P. viticola*; esso ha un'alta omologia al gene VvPR10.2 presente in *Vitis vinifera* la quale però è suscettibile. Entrambi i geni, come si può dedurre dal nome codificano per una PR protein della famiglia PR-10 quindi con attività ribonucleasica.

Il gene VvGLP3 viene fortemente espresso in seguito all'infezione di *Uncinula necator*, esso codifica per una germin-like protein (GLP). Va ricordato che esistono molti altri sistemi con i quali la vite si difende dagli attacchi di oidio; infatti, tra le specie di origine nordamericana *V. rotundifolia* è considerata resistente a *U. necator* grazie al singolo locus dominante Run1 (Resistance to *Uncinula necator* 1) che è stato trasferito anche a *V. vinifera*, con sei incroci successivi, conferendo agli ibridi una resistenza completa (Pauquet et al., 2001). Nella specie

di origine nordamericana *V. cinerea* e nell'ibrido interspecifico Regent, sempre di origine americana, sono stati individuati altri geni in grado di conferire una resistenza parziale all'oidio della vite. Per i geni di tipo QTL (Quantitative Trait Loci), come Ren2 e Ren3, scoperti in questi genotipi, non è stato chiarito il meccanismo fisiologico che determina la resistenza (Welter, 2007).

Riguardo alla resistenza negli acini è stato evidenziato che il gene GLP (germin-like proteins), denominato VvGLP3 viene indotto negli acini più vecchi e non in quelli giovani, a seguito dell'infezione con *E. necator* (Ficke et al., 2004). Al contrario il gene VvPR-1 viene espresso in maniera maggiore negli acini suscettibili a seguito dell'inoculo. In effetti gli acini, che sono molto suscettibili nel periodo post-allegagione, diventano del tutto immuni 2-4 settimane dopo la fioritura (Ficke et al., 2003). Il meccanismo che regola tale tipo di resistenza negli acini più vecchi non è ancora chiaro. È invece appurato che l'espressione di questi geni non sia costitutiva ma indotta; risulta necessario quindi l'attacco fungino affinché vi sia la trascrizione di tali geni.

PRINCIPALI LOCI DI RESISTENZA IDENTIFICATI NEL CROMOSOMA DEI SOTTOGENERI DI <i>VITIS</i>
Muscadinia; <i>Vitis rotundifolia</i> : Oidio (Run 1, 2.1 e 2.2) – <i>Peronospora</i> (Rpv 1 e 2)
<i>Vitis rupestris</i> : Oidio, in Regent (Ren 3, 9) – <i>Peronospora</i> (Rpv 3)
<i>Vitis vinifera</i> ; sativa: Kishmish Vatkana; Oidio (Ren 1) – Dzhandzhal kara; Oidio (Ren 1)
<i>Vitis lincecumii</i> : <i>Peronospora</i> (Rpv 3)
<i>Vitis romanetii</i> : Oidio (Ren 4 e 5)
<i>Vitis riparia</i> : <i>Peronospora</i> (Rpv 5 e 9)
<i>Vitis piasezkii</i> Maximowicz: Oidio (Ren 6 e 7)
<i>Vitis amurensis</i> : <i>Peronospora</i> (Rpv 8, 10 e 12)
<i>Vitis cinerea</i> : Oidio (Ren 2) – <i>Peronospora</i> (Rpv 14)

Figura 3: tabella raffigurante i loci di resistenza individuati per ciascuna varietà di vite.

1.6 POTENZIALITÀ E LIMITI DEI VITIGNI RESISTENTI

I vitigni resistenti hanno svariate qualità positive che li rendono interessanti per le aziende. Primo tra tutti è il fatto che necessitano di un ridotto numero di trattamenti fitosanitari; questo fatto ha molte implicazioni positive, quali ad esempio la possibilità di praticare la viticoltura in zone abitate o soggette a vincoli di carattere ambientale. È inoltre garantita una qualità superiore del vino perché questo non presenta residui di sostanze chimiche usate per la lotta alle crittogame nonché un risparmio economico per il produttore, il quale evita l'onere della lotta alle avversità fungine. È importante notare che l'utilizzo del rame viene drasticamente ridotto; il che ha implicazioni positive sull'ambiente e sulla salute del consumatore. Questo fatto inoltre giova molto in ambito enologico dove i residui di ione Cu^{++} sono un serio problema perché interferiscono con il metabolismo del lievito portando a fermentazioni stentate o addirittura all'arresto (Cavazza et al., 2013).

Va però sottolineato che ci sono alcuni aspetti che sono ancora da perfezionare per quanto riguarda i cloni in oggetto: il primo di essi è la presenza se pur limitata dei sentori sgraditi cosiddetti "foxy" ereditati dal genoma non europeo. Questo difetto è dovuto ad una serie di composti dell'acido antranilico tra i quali spicca per importanza il metil-antranilato. La sua sintesi avviene in presenza di metanolo per mezzo di un enzima specifico. Come accennato la presenza in quantità tangibili di questo composto è limitata alle varietà che portano con sé del genoma americano. La specie che più esprime questa caratteristica è *V. labrusca* ed ovviamente tutte le varietà derivate come, per citarne una, la Concord.

Altro problema, per fortuna limitato alle varietà a bacca rossa, è la possibile presenza di antociani diglucosidi. La legge prevede una soglia limite di 15 mg/l per tali composti. Gli antociani diglucosidi si trovano in tracce su *V. vinifera* mentre sono presenti in gran quantità su *V. riparia* e *V. rupestris*. Purtroppo, i geni che codificano per questo carattere sono di tipo dominante; questo fatto rende il carattere difficile da eliminare e complica il lavoro di selezione nonché l'ottenimento di varietà che oltre a presentare tutte le caratteristiche tecnologiche necessarie siano anche esenti dalla produzione di questi composti indesiderati. Un altro punto, che però non è mai stato affrontato fino ad ora, riguarda invece soprattutto le varietà a bacca bianca ed è legato alle proteine prodotte nell'acino, che poi in parte si trasferiranno al vino. Queste potrebbero successivamente creare problemi di instabilità (casce proteica). Mentre per quanto riguarda le varietà commerciali attualmente coltivate è

ben nota la predisposizione a produrre proteine (ad esempio Sauvignon blanc o Manzoni bianco che sono considerate varietà instabili, o Glera, che invece soffre molto meno del problema dell'instabilità proteica), ad oggi non sono ancora note le caratteristiche delle proteine delle varietà PIWI.

Proteine

2.1 CARATTERISTICHE E STRUTTURA DELLE PROTEINE

Le proteine sono macromolecole biologiche composte di amminoacidi legati tra loro attraverso legame peptidico: il gruppo amminico di un amminoacido si condensa al gruppo carbossilico di un altro con perdita di una molecola d'acqua. Questo fenomeno dà vita a delle catene, le quali si ripiegano su sé stesse a causa delle interazioni tra i gruppi -R degli amminoacidi dando vita a strutture secondarie, terziarie e quaternarie.

La forma tridimensionale della proteina è molto importante in quanto nella maggior parte dei casi è determinante per la funzionalità della macromolecola.

Le proteine hanno numerose funzioni negli organismi viventi; la più importante è sicuramente la catalisi di reazioni chimiche.

Per quanto riguarda le proteine vegetali, alcune sono implicate nella risposta difensiva agli attacchi fungini; queste prendono il nome di PR (Pathogenesis Related) proteins.

Le proteine hanno varie peculiarità, tra le quali ricordiamo la capacità di assumere una carica positiva, neutra o negativa a seconda del pH della soluzione in cui si trovano. Inoltre, ricordiamo che per ogni proteina vi è un pH al quale la carica complessiva risulta 0; questo valore prende il nome di punto isoelettrico. Questa caratteristica è fondamentale perché determina la reattività chimica della macromolecola, ricordiamo ad esempio che le interazioni che legano proteine a tannini e bentonite nel vino sono dovute al pH particolarmente basso il quale fa sì che tutte abbiano carica positiva.

Per quanto riguarda le dimensioni possiamo affermare che queste hanno un peso molecolare compresa tra $5 \cdot 10^3$ e 10^6 Dalton.

Le proteine sono classificate tra i colloidali in quanto sono troppo grandi per rientrare nei soluti e troppo piccole per far parte dei solidi sospesi, altra caratteristica che le rende tali è la capacità di assumere una carica elettrica.

Ricordiamo infine che le proteine manifestano la loro funzionalità entro un preciso range di temperatura. Generalmente quando la temperatura supera una certa soglia tipica e differente per ogni macromolecola avviene la denaturazione che consiste in un cambiamento della struttura causato dalla rottura dei legami non covalenti, come legami idrogeno, ponti disolfuro e altre interazioni, che sono responsabili del mantenimento della struttura tridimensionale e della funzionalità della proteina stessa; il processo risulta irreversibile al di sopra della cosiddetta temperatura di melting. Non solo la temperatura elevata, ma anche composti chimici o la semplice variazione di pH possono causare la denaturazione delle proteine.



Figura 4: morfologia di una proteina in cui si possono notare le strutture citate nel testo.

2.2 PROTEINE NELL'UVA

Nell'uva sono presenti una gran quantità di composti azotati di cui fanno parte amminoacidi liberi, polipeptidi ed una quantità variabile tra 300 e 600 diverse proteine. Queste assolvono le funzioni più disparate; per citarne alcune ricordiamo: struttura morfologica della cellula, trasporto attivo di acqua e sostanze nutritive, catalisi di reazioni chimiche. È interessante notare come però il contributo quantitativo più elevato sia dato dalle proteine sintetizzate in risposta agli stress.

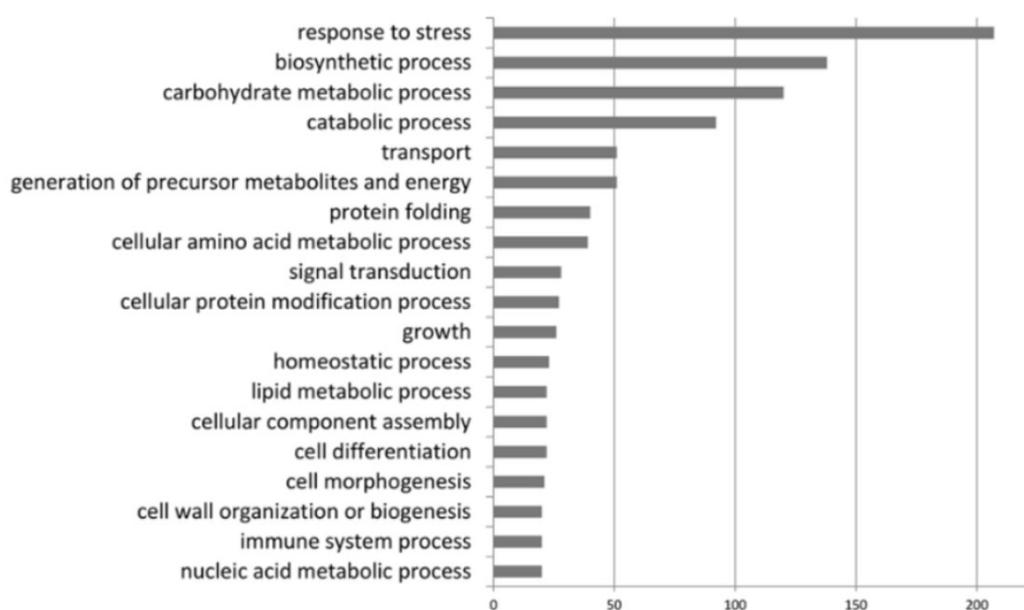


Figura 5: ruolo delle proteine nell'uva (Riebel et al.,2017).

Il gruppo più numeroso di proteine coinvolte nelle risposte allo stress include proteine PR come la chitinasi di classe IV, le proteine simili alla taumatina o le polifenol ossidasi (PPO).

Questo elevato numero di proteine documenta l'importanza di una complessa risposta allo stress nelle uve. Queste proteine si trovano principalmente nella buccia dell'uva, per proteggerla dagli stress biotici e abiotici. Il contenuto in PR proteins aumenta nel corso della maturazione dell'uva (Riebel et. al., 2017) quindi si può affermare che l'epoca della vendemmia influenza il contenuto in proteine del vino.

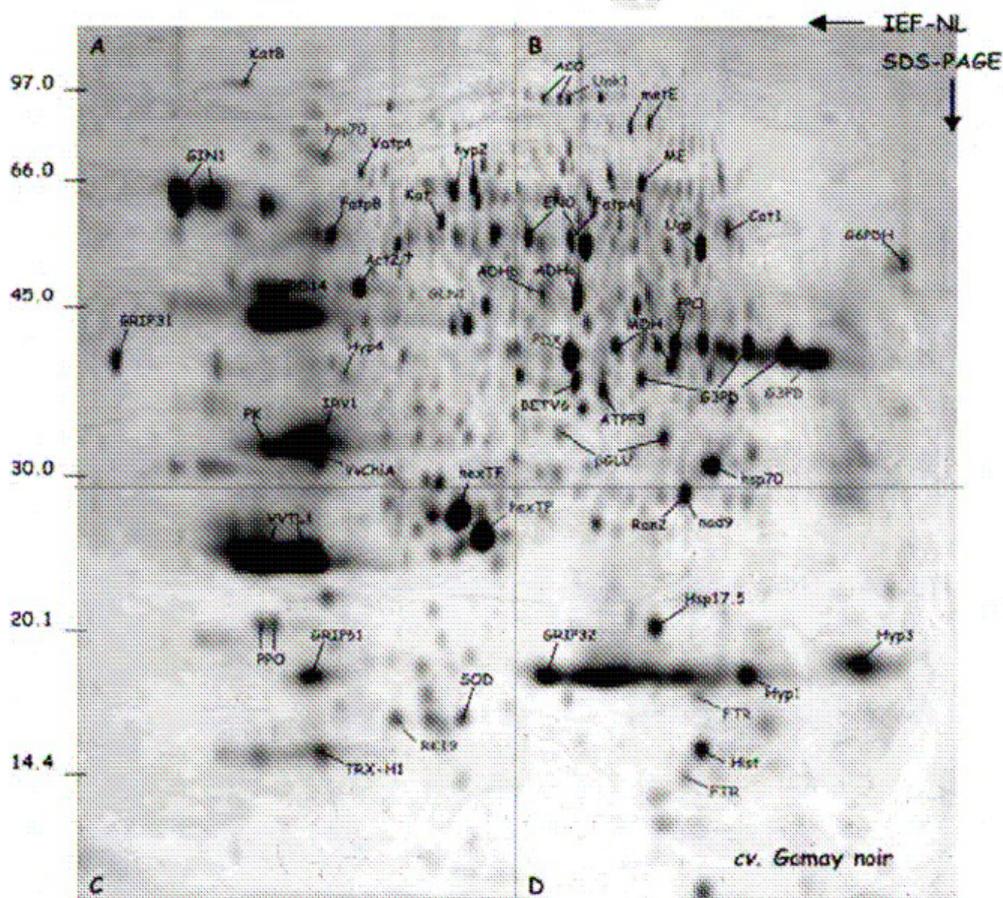


Figura 6: Analisi elettroforetica bidimensionale delle proteine del mesocarpo della bacca di *Vitis vinifera* L. cv. Gamay. (da Sarry et al., 2004).

2.3 PROTEINE IN VINIFICAZIONE

Nel mosto e nel vino contrariamente a quanto si potrebbe pensare il pool di proteine presenti muta in maniera considerevole a causa di vari fattori quali: trattamenti fisici, aggiunta di coadjuvanti, cambiamento delle condizioni fisiche (temperatura), chimiche (pH, redox) e infine dall'operato di microorganismi.

La vinificazione in rosso non viene presa in considerazione perché generalmente l'elevata quantità di tannini riesce a precipitare efficacemente gran parte delle proteine; questo fatto unito alla colorazione del vino fa sì che la casse proteica non rappresenti un problema in questi vini. Per quanto riguarda bianchi e rosati invece il discorso è molto diverso. Per produrre questi vini l'uva dopo la raccolta di norma viene pigiata, lasciata a macerare (opzionale), e

pressata. Come si è accennato in precedenza la gran parte delle proteine si trova nel pericarpo; quindi, è chiaro che la concentrazione proteica nel mosto di uve bianche dipende dall'intensità delle operazioni meccaniche sul pigiato e dal periodo di contatto con le bucce oltre che dall'abbondanza nell'uva. Nonostante la quantità di proteine estratte in una vinificazione in bianco sia relativamente inferiore rispetto ad una vinificazione con macerazione, il quantitativo estremamente basso di tannini rende queste proteine più solubili, con il rischio di diventare instabili in un secondo momento durante la conservazione del vino.

Un altro responsabile della presenza di proteine nel vino è il lievito: le cellule rilasciano proteine e mannoproteine durante la loro attività fermentativa, ma soprattutto dopo la fine della fermentazione, a causa del fenomeno chiamato autolisi.

Oltre alle proteine dell'uva, una possibile fonte di proteine esogene può essere un collaggio errato, si parla in questo caso di surcollaggio, che può riguardare prodotti come patatina, proteina di pisello, gelatina o estratto proteico di lievito. Ricordiamo che anche il lisozima, usato per limitare l'attività dei batteri lattici, è una proteina.

È noto, comunque, che in vinificazione parallelamente ai processi che possono portare ad un aumento di proteina ne avvengono altri in grado di ridurre la concentrazione; questi sono essenzialmente l'aumento del tenore alcolico che, sottraendo l'acqua, riduce la solubilità delle proteine e la naturale flocculazione che avviene ad opera dei polifenoli presenti quando essi incontrano le proteine. Considerati tutti i processi descritti sembra che nel tempo il tenore proteico nel vino decresca spontaneamente (Vincenzi et al., 2011) del quale un grafico è stato riportato di seguito.

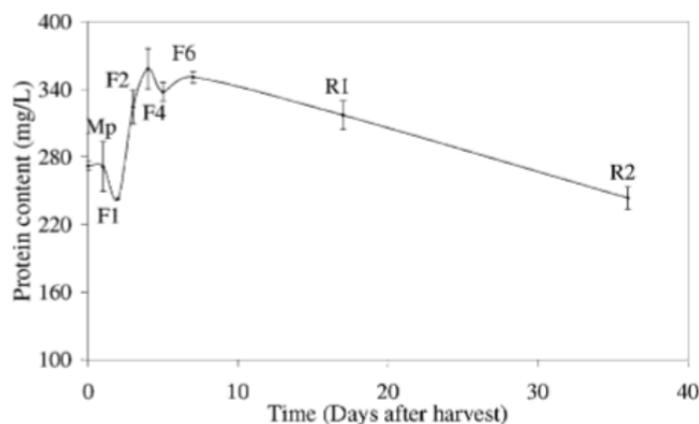


Figura 7: variazione del tenore proteico nel mosto \ vino rispetto al tempo dalla data di raccolta dell'uva (Vincenzi et.al.,2011).

2.4 PROTEINE NEL VINO

Nel vino si nota un enorme semplificazione rispetto al pool di proteine presenti nel mosto; questo perché, come accennato, durante il processo di vinificazione ci sono numerose fonti di denaturazione. Le proteine in grado di resistere alle condizioni avverse sono proprio le PR proteins (Waters et.al., 1992). In particolare, si riscontrano pesi molecolari compresi tra 20 e 30 kDa corrispondenti proprio a chitinasi e TLP. Si riscontra inoltre un contributo compreso tra 9% e 14% delle proteine totali dovuto all'invertasi.

2.5 PROTEINE PR (Pathogenesis related)

Le proteine PR sono un gruppo di proteine sintetizzate in risposta a stress biotici ed abiotici oltre che in modo costitutivo. Vengono scoperte per la prima volta in una pianta di tabacco attaccata dal virus del mosaico.

Queste proteine sono tipicamente acide, a basso peso molecolare ed altamente resistenti a bassi valori di pH, nonché alla degradazione proteolitica.

In base alla similarità delle sequenze amminoacidiche sono state classificate undici diverse famiglie di PR proteins. Alcune di queste famiglie sono presenti anche nella vite. Le due principali proteine solubili accumulate nell'uva durante la maturazione sono state identificate come chitinasi (famiglia PR-3) e proteine simili alla taumatina (TLP) (famiglia PR-5).

<i>Cultivar</i>	Brix	Proteine totali (mg/mL)	TLP (mg/mL)	Chitinasi (mg/mL)
Moscato di Alessandria	20.6	251	119	118
Sauvignon blanc	21.5	191	119	76
Sultana	21.0	86	23	44
Pinot nero	20.2	62	35	21
Shiraz	20.8	31	18	9

Figura 8: Quantità di proteine totali, chitinasi e Thaumatin-like proteins in diverse cultivar di *V. vinifera* (da Pocock et al., 2000).

Nel 2007 con i programmi di sequenziamento del genoma di vite e lo sviluppo della tecnologia per l'analisi delle proteine è stato possibile dimostrare che nella vite sono presenti più famiglie di proteine PR come le osmotine (appartenenti anch'esse alla famiglia PR-5), le β -1,3-glucanasi (famiglia PR-2) e le proteine PR-10.

Le proporzioni e la quantità di proteine PR presenti nell'uva dipendono dalla cultivar, dalle condizioni climatiche, dalle tecniche agronomiche adottate oltre che logicamente da ferite ed attacchi fungini. Benché inizialmente sembrasse non esistere una relazione tra stress idrico e concentrazione in proteine PR (Pocock et al., 2000), più recentemente è stato dimostrato che la carenza di acqua può causare un aumento di proteine nell'uva (Meier et al., 2016), con tutte le implicazioni che ne derivano, se si considera la situazione di cambiamento climatico che stiamo vivendo. Questa correlazione tra stress idrico e proteine non è per nulla strana, in quanto è ben noto che gli stress biotici e abiotici nelle piante condividono diverse vie metaboliche, con il risultato che stress di diversa origine possono portare a risposte metaboliche simili.

In genere gli attacchi fungini producono un forte aumento quantitativo di proteine proprio come risposta sistemica della pianta, ma in alcuni studi è stato dimostrato che le infezioni da *Botrytis cinerea* riducono il contenuto in PR-proteins sia *in vivo* che *in vitro*. Questo fatto è stato imputato all'azione di enzimi proteolitici secreti dal fungo (Marchal et al., 1998).

2.6 FUNZIONI E CRITICITÀ DELLE PROTEINE NEL VINO

Le proteine assumono ruoli sia positivi sia negativi nel determinare le qualità organolettiche e la limpidezza del vino.

Essendo agenti surfattanti i protidi sono importanti per quanto riguarda la schiumabilità di vini frizzanti e spumanti; essi determinano la quantità e la persistenza della schiuma (Brissonnet e Maujean, 1991); ancora più attive nell'influenzare la schiuma sono le mannoproteine, che oltre ad avere una capacità schiumogena intrinseca (che non hanno le PR proteins dell'uva), hanno anche un effetto sinergico con le altre proteine presenti nel vino (Vincenzi et al., 2014).

Per quanto riguarda gli aspetti negativi è chiaro che le proteine sono in grado di combinare la componente tannica, il che in alcuni casi può risultare vantaggioso ma in altri potrebbe essere

sgradito. Il problema maggiore rimane comunque la termo-instabilità di alcune proteine. Queste, infatti, a seguito di shock termici, con un meccanismo non ancora del tutto chiarito, sono in grado di denaturarsi e successivamente flocculare determinando l'intorbidamento del vino producendoun grosso difetto estetico.

Pathogen-related family	Activity	Pathogen target
PR-1	?	Membrane?
PR-2	1,3- β -glucanase	Cell wall glucan
PR-3	Endochitinase	Cell wall chitin
PR-4	Endochitinase	Cell wall chitin
PR-5	?	Membrane
PR-6	Proteinase inhibitor	Proteinase
PR-7	Proteinase	?
PR-8	Endochitinase	Cell wall chitin
PR-9	Peroxidase	*
PR-10	RNAase	?
PR-11	Endochitinase	Cell wall chitin
Unclassified	α -Amylase	Cell wall glucan
	Polygalacturonase	Polygalacturonase
	Inhibitor (PGI)	

Figura 9: funzioni e target delle varie famiglie di PR proteins.

Stabilità delle proteine

3.1 CASSE PROTEICA

La casse proteica è una problematica tipica dei vini bianchi. Consiste nell'intorbidamento del vino. Alcuni fattori predisponenti sono noti; tra questi spicca lo shock termico, cioè un riscaldamento del vino seguito da un successivo raffreddamento. Non è chiaro il ruolo giocato dalla concentrazione di proteina. Risulta noto invece che la tipologia di proteina presente è

determinante nel causare tale difetto in quanto come detto in precedenza alcuni protidi sono più suscettibili di altri a questo fenomeno. Infatti, è noto che i maggiori contributi riguardanti la termo-instabilità sono dovuti alle PR proteins. A proposito di ciò sembra che le chitinasi abbiano una temperatura di denaturazione (T_m) che risulta inferiore rispetto alle TLP (Falconer et al., 2010); inoltre mentre la denaturazione di quest'ultime sembra parzialmente reversibile sappiamo che quella delle chitinasi non lo è. Pertanto, si può supporre che la classe di proteine che crea maggiori problemi sia quella che comprende le chitinasi.

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

Figura 10: Temperature di denaturazione (T_m) di chitinasi e TLP purificate (Falconer et al., 2010).

È noto che nel vino sono presenti anche dei colloidali protettori (polisaccaridi e mannoproteine) in grado di mitigare il problema (Ribéreau Gayon et al., 2006).

Una tecnica che permette la stabilizzazione del vino è l'ultrafiltrazione con cut-off a 10 kDa però il depauperamento organolettico che ne deriva sembra essere oggettivamente inaccettabile (Feuillat, Peyron, & Jousset-Drouhin, 1987). Lo stesso principio vale per i trattamenti termici. Ad oggi la soluzione più accreditata è il trattamento con bentonite; bisogna tenere presente però che anch'esso non è esente da problematiche legate alla sfera organolettica.

3.2 STABILIZZAZIONE CON BENTONITE

La bentonite è un silicato d'alluminio con struttura lamellare dotato di una grande superficie specifica e carica negativa, sono inoltre presenti cationi scambiabili. Questa riesce ad interagire con le proteine grazie al pH del vino che le carica positivamente.

La dose da usare può essere determinata tramite test di stabilità (non esiste una standardizzazione né un test universalmente riconosciuto anche se l'heat test sembra essere il più affidabile tra tutti) oppure empiricamente grazie all'esperienza dell'enologo.

È importante usare la dose idonea in quanto un sotto dosaggio non elimina il rischio di casse proteica mentre un sovradosaggio porta ad una modificazione del colore nei rossi a causa dell'interazione con antociani ed a una perdita di aromi secondari su tutti i vini a causa dell'azione sequestrante su una serie di molecole aromatiche (Voilley, Lamer, Dubois & Feuillat, 1990). Si segnala che il trattamento con bentonite può avere un duplice effetto vista la sua discreta efficacia nel rimuovere la vitamina B2 (riboflavina) la quale è generalmente indesiderata nei vini per ragioni che non tratteremo.

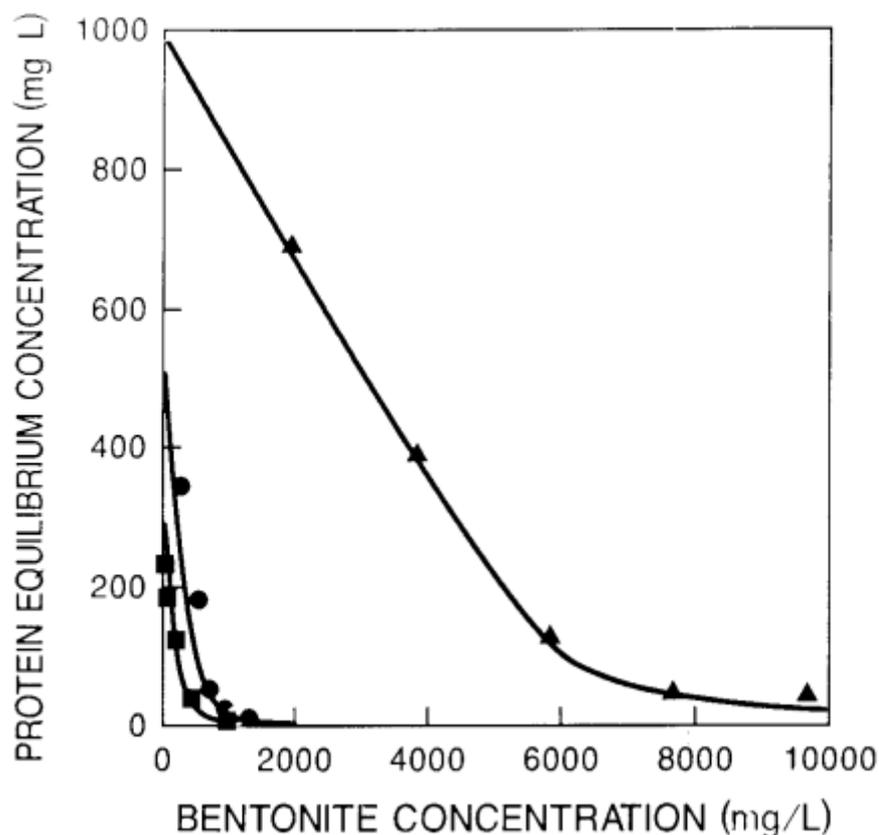


Figura 11: effetto della dose di bentonite su vino contenente 250 mg/l (quadrato), 500 mg/l (cerchio) e 1000 mg/l (triangolo) di proteina. (Blade et.al.,1987).

Materiali e metodi

CAMPIONI DI MOSTO

I campioni analizzati in questa tesi sono stati recuperati direttamente dopo la pigiatura dell'uva.

I campioni sono stati prelevati tra le annate 2020 e 2021 presso la cantina sperimentale di Veneto Agricoltura. Al momento del prelievo, il mosto è stato centrifugato, filtrato a 0.45 μm (Sartorius, Acetato di cellulosa) e conservato in congelatore fino al momento dell'analisi.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN PROTEINE TOTALI

Le proteine totali dei campioni sono state valutate per via colorimetrica (Vincenzi et al., 2005), attraverso precipitazione con sodio dodecil solfato (SDS) e KCl; quindi, fatte reagire con la bicinconina (BCA protein assay reagent kit, Pierce), la quale riduce il rame da bivalente a monovalente. Si forma un composto cromoforo dovuto alla chelazione della BCA con un catione acuprico avente colorazione porpora; tale colorazione viene letta per via spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 562 nm.

Procedimento:

si preleva 1 mL di mosto e si aggiungono 10 μL di SDS al 10%, il tutto viene messo in una provetta a temperatura di ebollizione per 5 minuti. Al campione così trattato vengono aggiunti 250 μL di cloruro di potassio 1M (KCl) e quindi messo in un oscillatore orbitale per 2 ore a temperatura ambiente. Trascorse le due ore, il campione viene centrifugato a 14000 g, ad una temperatura di 4°C per 15 minuti; dal campione centrifugato viene poi eliminato il surnatante e il pellet residuo (proteine precipitate e SDS) viene sciolto con 1 mL di KCl 1M. Si esegue nuovamente la centrifugazione a 4°C per 15 minuti, a 14000 g. Terminata la centrifugazione, dal campione si elimina il surnatante e si risospende il pellet con 500 μL di

acqua bidistillata. Dal campione così ottenuto si prelevano 25 µl che vengono messi in un pozzetto di una piastra ELISA (Sarstedt) a cui vengono aggiunti 200 µl di Working Reagent. Il Working Reagent è una soluzione di reagente A e reagente B in rapporto 50:1 e contenenti la BCA, utile per formare il composto cromoforo. La piastra è stata incubata a 37°C per 30 minuti e poi l'assorbanza è stata letta con un lettore di piastre (Microplate Reader, Euroclone) a 550 nm. È stata costruita una retta di taratura utilizzando, come proteina, l'albumina di siero bovino (BSA) in concentrazione crescente da 0 a 500 mg/L.

ELETTROFORESI DENATURANTE DISCONTINUA IN PRESENZA DI SODIO DODECIL SOLFATO (SDS-PAGE)

Queste analisi elettroforetiche sono state eseguite sostanzialmente secondo il metodo di Laemmli (1970), ma in assenza di β-mercaptoetanolo, se non chiaramente specificato nella discussione.

I campioni di mosto scongelati sono stati precipitati con 4 volumi di etanolo overnight a -20°C. Dopo centrifugazione a 14000g per 15 minuti, il supernatante è stato eliminato ed il pellet è stato lasciato all'aria per lasciare evaporare il residuo di etanolo.

I campioni sono stati risospesi in 25µl 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) (Fluka), 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

QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE

Come già detto nell'introduzione, un dato ancora poco conosciuto sui vitigni resistenti è la concentrazione di proteine, che poi si tradurrà in problemi di instabilità proteica nel vino finito.

In questa tesi si è deciso di lavorare direttamente sul mosto, in modo da non avere interferenze dovute alla fermentazione (che potrebbe precipitare o degradare alcune proteine dell'uva, ma che allo stesso tempo potrebbe contribuire mediante un rilascio di proteine da parte dei lieviti) o ai processi di chiarifica.

Per questo i campioni analizzati derivano tutti dalla cantina di Veneto Agricoltura, in cui è stato possibile recuperare i mosti subito dopo il momento della pigiatura, senza rischi di ossidazione o di inizio di fermentazione che si potrebbero verificare su campioni conservati in modo non adeguato.

Un ulteriore vantaggio è che prelevando i campioni da un unico sito, anche le procedure di pigia-diraspatura e di pressatura sono standardizzate, e sarà quindi possibile valutare le differenze in contenuto proteico derivate esclusivamente dall'uva.

In totale, su due anni di attività, sono stati recuperati 27 campioni da 11 varietà diverse. Per quasi tutte le varietà sono presenti sia repliche nei due anni di vendemmia, sia repliche nello stesso anno ma su siti di produzione diversi.

In questo modo, come si vede nel Grafico, sono state ottenute in alcuni casi delle variabilità elevate, ma i dati possono considerarsi rappresentativi della varietà in oggetto.

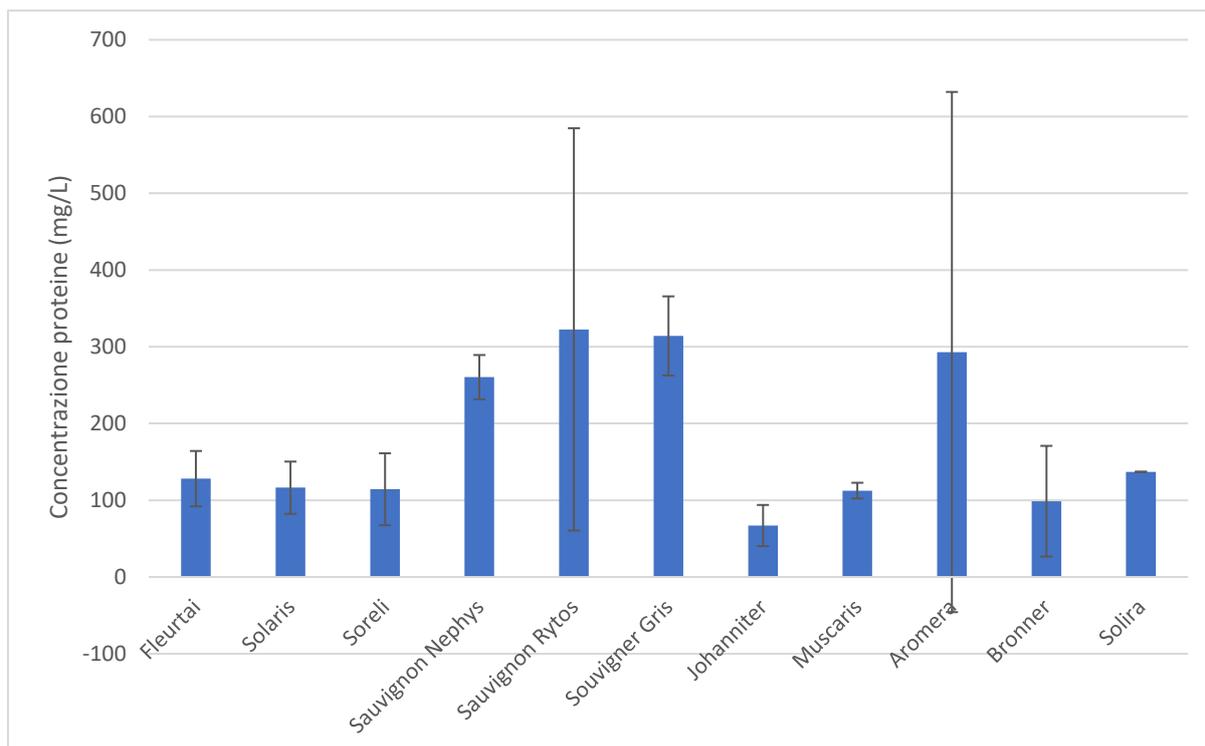


Grafico 1: Concentrazione proteica media nei mosti di varietà resistenti raccolti nelle annate 2020-2021.

Come si può osservare, nonostante la variabilità elevata, è possibile evidenziare delle differenze importanti tra le diverse varietà.

È da sottolineare che nel caso dell’Aromera, la grande deviazione dipende da un campione del 2021 che derivava da coltivazione biodinamica (926 mg/L), mentre gli altri 3 campioni della stessa varietà raccolti nei due anni mostravano un contenuto proteico più uniforme (media 293 mg/L).

Considerando tutti i dati, però, l’analisi statistica non ha permesso, a causa della elevata variabilità, di evidenziare delle differenze statisticamente significative tra le varietà (ANOVA, $p < 0.05$). Anche togliendo il dato anomalo dell’Aromera, in ogni caso tenendo una soglia di $p < 0.05$ non sono state riscontrate differenze significative.

Nel caso del Sauvignon Rytos, i campioni analizzati sono soltanto 2, provenienti dallo stesso vigneto ma raccolti nelle due diverse annate, e i risultati sono stati molto differenti tra loro (508 e 137 mg/L nel 2020 e nel 2021, rispettivamente).

In ogni caso, ad eccezione di queste due varietà, è possibile notare una certa omogeneità di comportamento per le altre varietà prese in esame.

Gran parte delle varietà ha mostrato un contenuto di proteine intorno ai 100 mg/L, paragonabile al valore medio riscontrabile anche nelle varietà di *V. vinifera*.

Particolarmente interessante è la varietà Johanniter, che ha mostrato dei valori di proteine mediamente più basse rispetto alle altre varietà. Questo dipende in parte anche dai parentali, che includono il Riesling, vitigno che in genere dà vini poco instabili, ma anche il Pinot bianco, che in realtà rientra nella categoria dei vitigni a comportamento variabile (cioè mostra un contenuto proteico molto differente a seconda delle condizioni climatiche di coltivazione).

Il fatto di avere un basso contenuto proteico è certamente un fattore positivo dal punto di vista enologico, in quanto produrrà vini che richiederanno senza dubbio un minor numero di trattamenti di chiarifica.

Tra le altre varietà, l'Aromera ha destato interesse per il dato anomalo di oltre 900 mg/L ottenuto con il campione biodinamico. È noto che la produzione di proteine di difesa nell'uva, pur essendo costitutiva, può anche essere indotta dallo stress, e questo potrebbe essere il motivo di un valore così alto. Escludendo questo valore, comunque, la media si mantiene intorno ai 300 mg/L, che colloca questo vitigno nella classe dei vitigni instabili (Manzoni bianco, Sauvignon, Moscati, ecc.). In effetti, l'Aromera include tra i suoi parentali il Muscat Ottonel, che appartiene proprio alla famiglia dei Moscati e potrebbe essere il responsabile dell'ereditarietà di questo carattere.

Allo stesso modo si collocano sempre nel range di instabilità anche le 3 varietà derivate da Sauvignon, e anche in questo caso l'elevato contenuto proteico deriva molto probabilmente da un semplice effetto di eredità del carattere.

ANALISI ELETTROFORETICA

Nonostante sia già evidente dai dati quantitativi descritti nel paragrafo precedente che il contenuto proteico delle uve non è un carattere correlato alla resistenza dei vitigni resistenti, si è deciso di fare un'analisi anche qualitativa delle proteine delle diverse varietà mediante analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide.

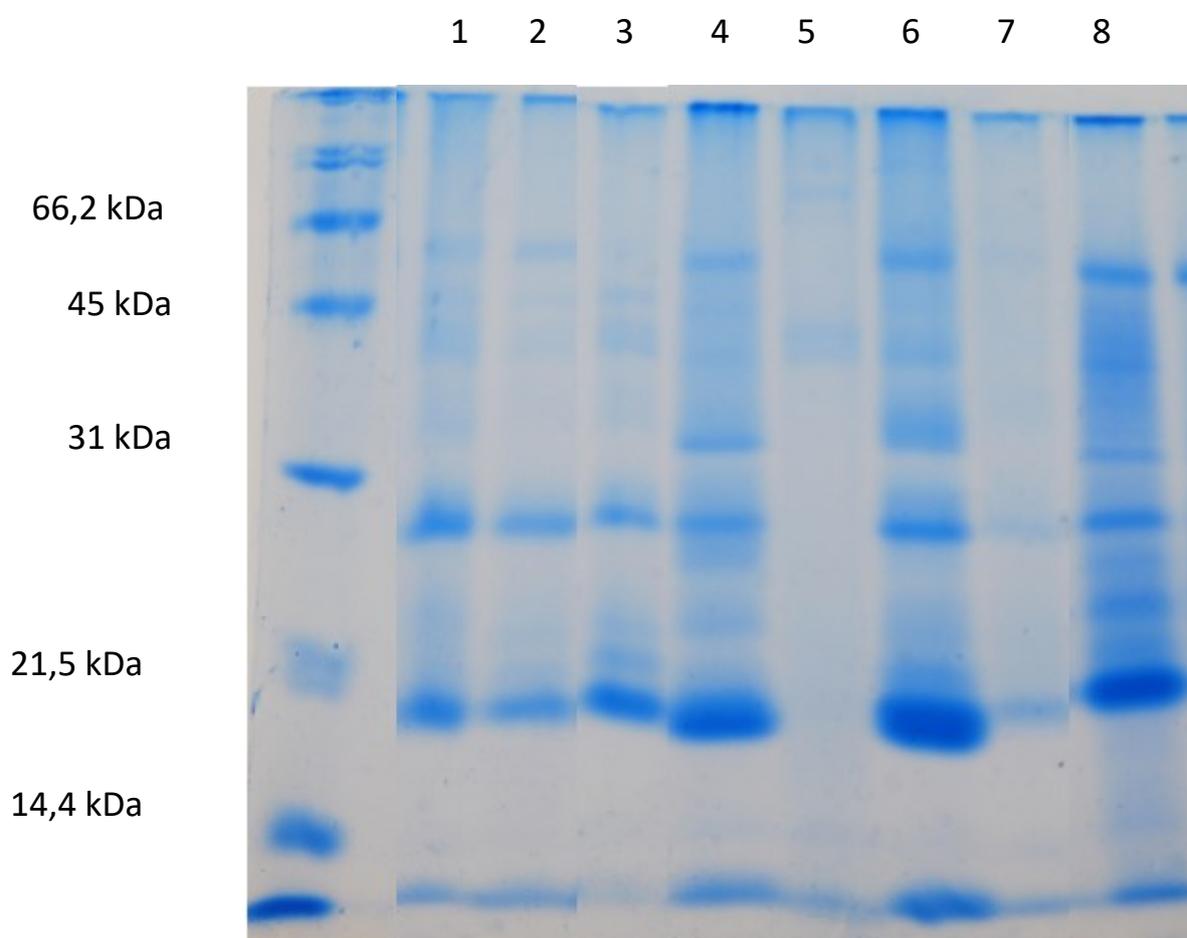


Figura 12: Elettroforesi di proteine da mosti di vitigni resistenti. 1. Fleurtaï A, 2. Solaris A, 3. Soreli A, 4. Sauvignon Nephys A, 5. Johanniter A, 6. Sauvignon Rytos A, 7. Muscaris A, 8. Aromera A.

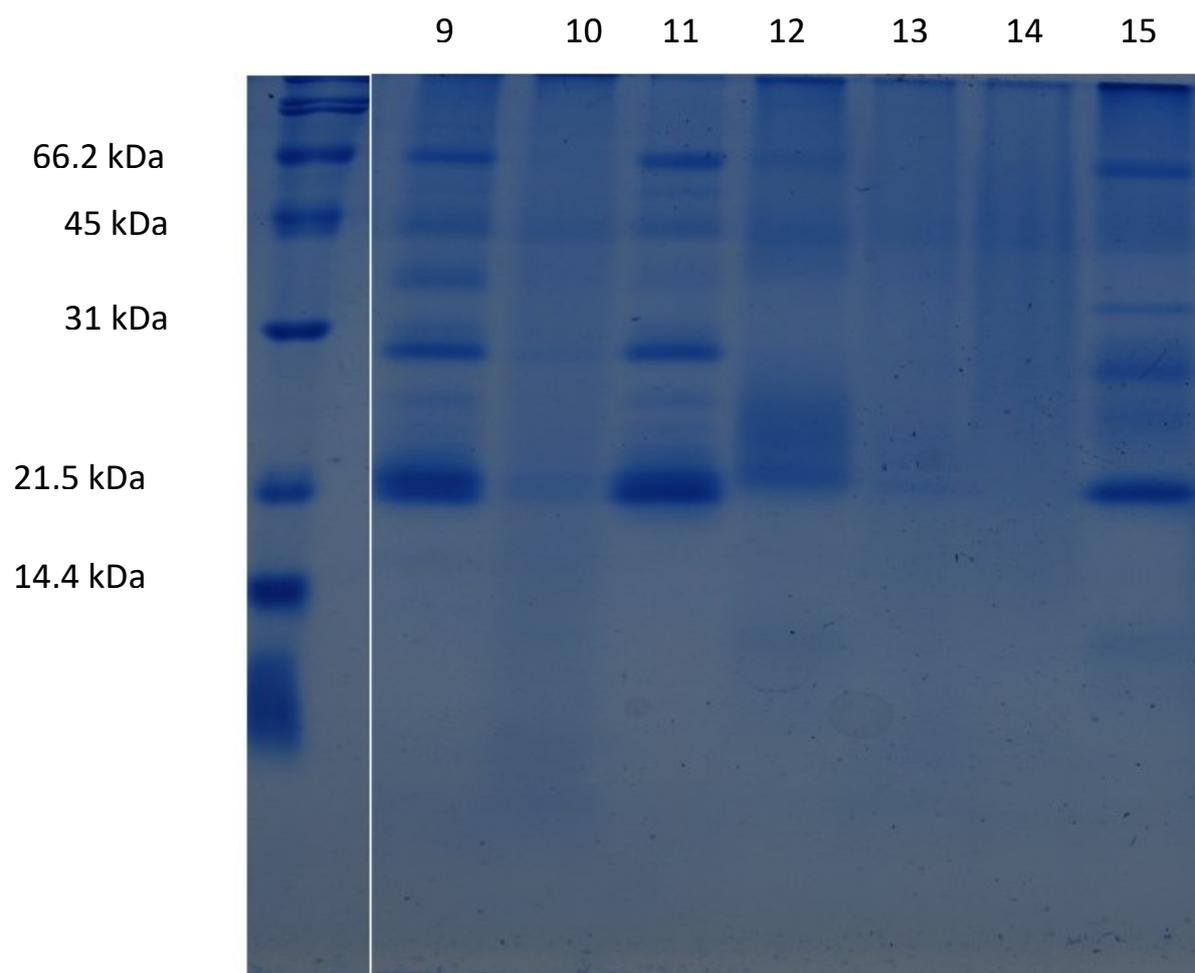


Figura 13: Elettroforesi di proteine da mosti di vitigni resitenti. 9. Bronner A, 10. Johanniter B, 11. Bronner B, 12. Muscaris B, 13. Johanniter C, 14. Bronner C, 15. Solira A

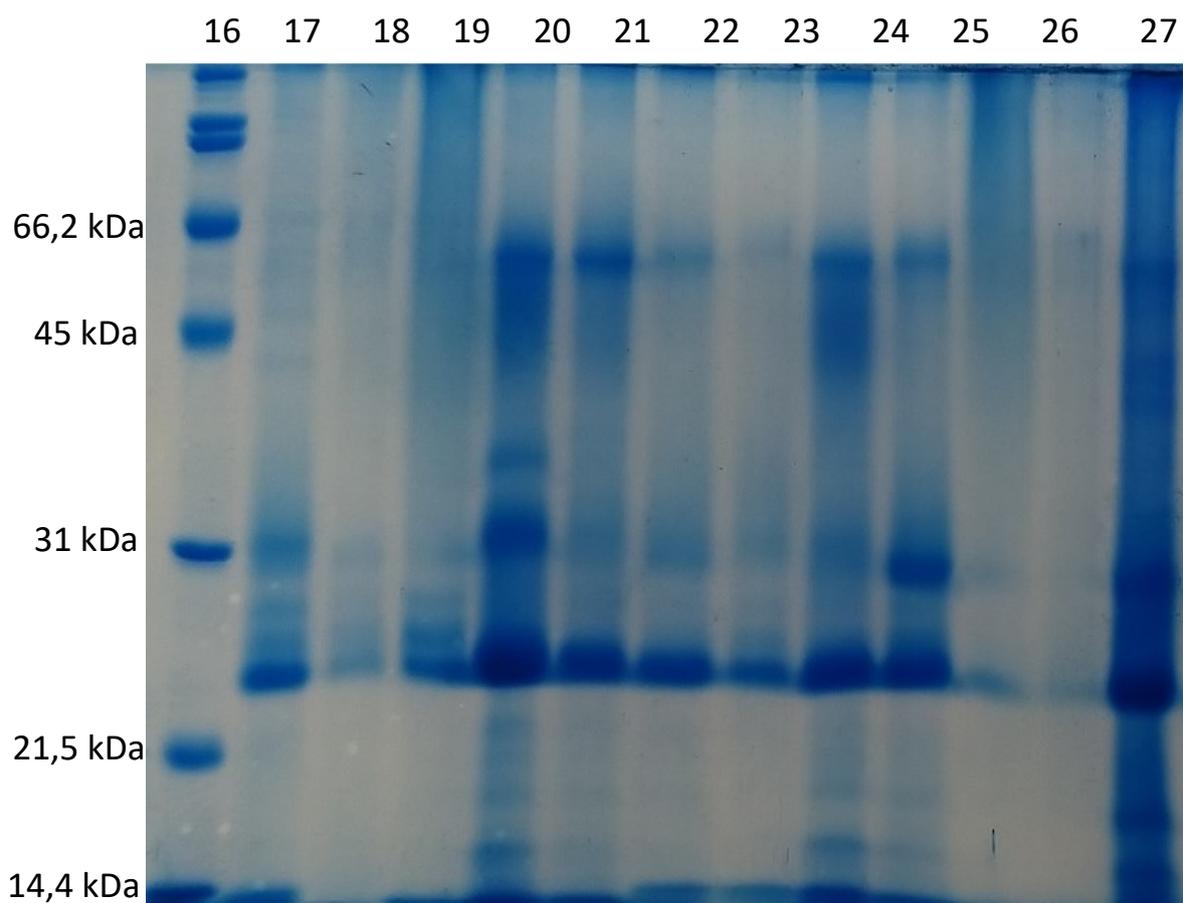


Figura 14: Elettroforesi di proteine da mosti di vitigni resitenti. 16. Aromera B, 17. Soreli B, 18. Sauvignon Rytos B, 19. Sauvignier gris A, 20. Sauvignier gris B, 21. Sauvignon Nephys B, 22. Fleurtaï B, 23. Aromera C, 24. Solaris B, 25. Johanniter D, 26. Fleurtaï C, 27. Aromera D

Come atteso, i profili elettroforetici corrispondono a quelli classici dell'uva ottenuta da *V. vinifera*, con la maggior parte delle proteine concentrate nel range tra 20 (Thaumatococcus-like proteins) e 31 kDa (chitinasi) e la presenza di una banda a circa 60 kDa (invertasi).

Dal momento che in elettroforesi è stato caricato in ogni pozzetto il pellet corrispondente a 100 µl di mosto di partenza, anche l'intensità delle bande dovrebbe corrispondere alla concentrazione proteica del mosto di partenza. In effetti si può notare come le corsie corrispondenti al Johanniter (corsie 5, 10, 13 e 25) siano molto tenui, e addirittura nella maggior parte dei casi non sono nemmeno visibili delle bande proteiche. Al contrario i vitigni che hanno mostrato il maggior contenuto di proteine con l'analisi quantitativa, sono anche quelli che hanno il profilo elettroforetico più intenso e più ricco di bande. Da notare il campione 27 che corrisponde all'Aromera da coltivazione biodinamica, dove si nota l'elevata concentrazione di proteine.

Conclusioni

Questa analisi ha permesso di mettere in evidenza come anche tra i vitigni resistenti ci possa essere una notevole variabilità nel contenuto proteico. Questo studio sarà interessante per i produttori che vorranno cimentarsi con la coltivazione di questi vitigni, perché fornisce già delle indicazioni preliminari sull'entità dei trattamenti che saranno necessari per la stabilizzazione dei vini risultanti.

Un altro dato che si evince da questa analisi, è che l'elevata sintesi di proteine nell'uva nei vitigni resistenti è un carattere che è stato semplicemente ereditato da parentali già noti per dare vini instabili, e non un carattere correlato alla maggiore resistenza ai patogeni.

L'analisi qualitativa in elettroforesi ha confermato questa ipotesi.

Ulteriori studi saranno necessari per ampliare la conoscenza sui vitigni resistenti e sulla loro risposta agli stress ambientali, che potrebbe influire notevolmente sull'espressione proteica.

Sitografia

<http://catalogoviti.politicheagricole.it/catalogo.php>

<https://piwi-international.de/it/2022/02/8232/>

<https://www.sciencedirect.com/>

<https://www.agraria.org/>

Bibliografia

Blade W. H., Boulton R., (1987). Adsorption of Protein by Bentonite in a Model Wine Solution

Brissonnet, F. and Maujean, A. (1991). Identification of some foam-active compounds in champagne base wines

Cavazza A., Guzzon R., Malacarne M., Larcher R., (2013). The influence of the copper content in grape must on alcoholic fermentation kinetics and wine quality: a survey on the performance of 50 commercial active dry yeasts

Deytieux, C., Geny, L., Lapailierie, D., Claverol, S., Bonneau, M. and Donèche, B. (2007). Proteome analysis of grape skins during ripening J. Experimental Botany

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

Falconer R. J., Marangon M., Van Sluyter S. C., Neilson K. A., Chan C., Waters E. J., (2010). Thermal Stability of Thaumatin-Like Protein, Chitinase, and Invertase Isolated from Sauvignon blanc and Semillon Juice and Their Role in Haze Formation in Wine

Feuillat, M., Peyron, D., & Jousset-Drouhin, V. (1987). Influence de la filtration tangentielle des vins sur leur composition physicochimique et leur caractères sensoriels. Application aux vins de Bourgogne

Ficke A., Gadoury D.M., Seem R.C., Dry I.B., (2003). Effects on ontogenetic resistance upon establishment and growth of *Uncinula necator* on grape berries

Ficke A., Gadoury D.M., Seem R.C., Godfrey D., Dry I.B., (2004). Host barriers and responses to *Uncinula necator* in developing grape berries

Flor H.H., (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*

Gadoury D.M., Seem R. C., Pearson R. C., Wilcox W. F., Dunst R. M., (2001). Effects of powdery mildew on wine growth, yield and quality of Concord grapes

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage

Marchal R., Berthier L., Legendre L., Marchal-Delahaut L., Jeandet P., Maujean A., (1998). Effects of *Botrytis cinerea* Infection on the Must Protein Electrophoretic Characteristics

Meier M., Jaeckels N., Tenzer S., Stoll M., Decker H., Fronk P., Dietrich H., Will F., (2016). Impact of drought stress on concentration and composition of wine proteins in Riesling

Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A.-F., (2001). Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection

Pocock K. F., Hayasaka Y., Mccarthy M. G., Waters E. J., (2000). Thaumatin-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

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdiou D., (2006). *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatment 2nd Edition*

Riebel M., Fronk P., Distler U., Tenzer S., Decker H., (2017). Proteomic profiling of German Dornfelder grape berries using data-independent acquisition

Sarry, J. E., Sommerer, N., Sauvage, F. X., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G. and Romieu, C. (2004). Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp

Vincenzi, S., Crapisi, A., Curioni, A. (2014). Foamability of Prosecco wine: cooperative effects of high molecular weight glycoconjugates and wine PR-proteins

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., D.B. Peruffo A., Curioni A. and Rizzi C. (2005). Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine

Voilley A., Lamer C., Dubois P., Feuillat M., (1990). Influence of Macromolecules and Treatments on the Behavior of Aroma Compounds in a Model Wine

Waters E. J., Wallace W., Williams P. J., (1992). Identification of Heat-Unstable Wine Proteins and Their Resistance to Peptidases

Welter L. J., Gokturk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Topfer R., Zyprian E. M., (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L).

Zulini L., Stefanini M., (2016) - Il miglioramento genetico della fondazione Mach