



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimenti animali alimenti risorse naturali e ambiente

LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

“Variazione del profilo aromatico in uve Moscato giallo sottoposte a
vendemmie differite ed appassimenti”

“Variation in the aromatic profile of yellow Muscat grapes processed with
postponed harvest and dryng”

Relatore

Dott. CLAUDIO BONGHI

Correlatore

Dott. Massimiliano Corso

Laureando:

ALBERTO BONERA

Matricola n. 1039130

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Sommario

RIASSUNTO

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 Premessa.....	6
1.2 Morfologia e fisiologia della bacca d'uva.....	7
1.3 Sviluppo e maturazione dell'acino d'uva in <i>Vitis vinifera</i>	8
1.3.1 Fase erbacea.....	9
1.3.2 Invaiaura e sindrome di maturazione.....	13
1.4 Componenti aromatiche varietali dell'uva.....	17
1.4.1 Vitigni aromatici: il caso del Moscato giallo.....	21
1.5 Determinazione della maturità dell'uva e tecniche di surmaturazione.....	23
1.5.2 Tecniche di surmaturazione.....	24
1.5.3 Tecniche di appassimento.....	27
2. SCOPO DELLA TESI.....	30
3. MATERIALI E METODI.....	32
3.1 Materiale vegetale e trattamenti.....	32
3.2 Analisi biochimiche e sensoriali sulle uve.....	33
3.3 Analisi molecolari (estrazione RNA, DNAsi e sintesi del cDNA).....	34
3.4 Analisi degli aromi.....	36

3.4.1 Estrazione e concentrazione dei componenti volatili di fermentazione e varietali.....	36
3.4.2 Analisi GC/MS.....	37
3.5 Analisi sensoriali.....	37
4. RISULTATI.....	40
4.1 Analisi biochimiche.....	40
4.2 Profili di espressione di geni coinvolti nei metabolismi di terpeni, zuccheri e acidità.....	43
4.3 Analisi sui metaboliti aromatici dei vini.....	49
4.4 Analisi sensoriali.....	52
4.4.1 Analisi del profilo aromatico.....	52
4.4.2 Analisi qualità olfattiva.....	54
5. DISCUSSIONE.....	56
6. CONCLUSIONE.....	
7. BIBLIOGRAFIA.....	

1. INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

La vite è tra le più importanti specie coltivate in termini di vastità d'area e impatto economico. La bacca di *Vitis Vinifera*, comunemente chiamata acino, costituisce la materia prima della vinificazione ed il suo stato di maturazione e la sua composizione sono tra i fattori più importanti tra quelli in grado di determinare la qualità del vino. È risaputo che il “buon vino” si ottiene da un'ottima tecnica di coltura applicata in vigneto, fondendo l'impiego di moderne tecniche di coltivazione a conoscenze tecnico-pratiche degli operatori sul ciclo di sviluppo e maturazione dei grappoli.

L'acino di *Vitis Vinifera*, come altri frutti, va incontro alla sindrome della maturazione che è il risultato dell'attivazione di un insieme di processi, spesso strettamente interdipendenti tra loro, controllati dall'interazione tra fattori genetici ed ambientali (inclusi quelli agronomici) (Dal Santo *et al.*, 2013).

La conoscenza delle caratteristiche strutturali dei frutti e del loro metabolismo durante l'intero ciclo di sviluppo, in particolare durante la fase di maturazione, è cruciale per capire e approfondire i meccanismi che influenzano la composizione e la qualità dei prodotti sia freschi che lavorati.

L'ottenimento di una produzione di qualità richiede la conoscenza dei processi metabolici che avvengono durante la crescita e maturazione della bacca. Attualmente, grazie allo sviluppo di tecniche di indagine biochimiche e molecolari, la conoscenza di tali processi ha subito un notevole avanzamento permettendo la messa a punto di strategie più efficienti per loro modulazione.

La struttura e la composizione dell'acino subiscono profondi cambiamenti durante il ciclo di sviluppo, a partire dalle prime fasi post-allegagione fino alla maturazione e alla sovra-maturazione; questi cambiamenti sono strettamente associati alle caratteristiche del vino e costituiscono importanti indicatori per il monitoraggio della maturazione della bacca oltre che definirne l'epoca ottimale di vendemmia.

La ricerca vitivinicola ha posto in evidenza che la massima efficienza del vigneto può essere raggiunta solo attraverso un appropriato equilibrio vegeto-produttivo e che questo dipende, in ogni ambiente e per ogni vigneto, da idonee scelte

d'impianto, gestione della chioma, disposizione e caratteristiche del grappolo, rispetto alle quali poi si devono specificare gli altri elementi della tecnica colturale.

A livello mondiale i produttori di vino continuano ad aumentare e, in particolare, nei paesi emergenti a livello viticolo come Argentina, Cile, Australia, Sud-Africa e Nuova Zelanda, sono in grado di produrre vini il cui rapporto qualità prezzo risulta largamente competitivo su tutti i mercati internazionali. In questo contesto Italia, Francia, Spagna e Portogallo, si difendono dalle realtà emergenti solo attraverso la grande qualità del prodotto finale, infatti il mondo vitivinicolo italiano è costellato da innumerevoli "chicche enologiche" grazie ad un patrimonio di vitigni autoctoni unici al mondo (<http://www.oiv.int/oiv/cms/index>). La strategia, perciò, è quella di riuscire a sfruttare al massimo il patrimonio genetico di ogni varietà utilizzando le tecniche agronomiche innovative. In tal senso, risultati interessanti sono stati ottenuti dall'impiego della "Doppia Maturazione Ragionata" (Cargnello *et al.*, 2006) che verrà descritta in dettaglio in questo lavoro di tesi.

1.2 MORFOLOGIA E COMPOSIZIONE DELLA BACCA D'UVA

La bacca d'uva comprende il raspo (ossatura del grappolo) e gli acini (frutti carnosì). Gli acini a loro volta sono costituiti da buccia (epicarpo), polpa (parte carnosa) e semi (vinaccioli). Il raspo è la struttura di sostegno di un'infiorescenza a grappolo (insieme di racemi) ed è quindi ramificata. La ramificazione più lunga forma l'asse principale dell'infiorescenza (rachide), mentre le ramificazioni più corte sostengono l'acino (pedicelli). I pedicelli terminano con un allargamento sul quale si inserisce l'acino (cercine). Le dimensioni di queste ramificazioni danno al grappolo una forma più o meno compatta (Colette Navarre, 1991).

L'acino (Figura 1.1) è formato in superficie dalla buccia (epicarpo), che è costituita dai seguenti tessuti: l'epidermide (strato ricoperto dalla cuticola sulla quale si forma la pruina che da un aspetto vellutato all'acino) e l'ipodermide (costituito da strati di cellule con elevati contenuti di pigmenti ed aromi). La buccia rappresenta l'8-20% del peso del frutto e contiene acidi organici (acido tartarico in particolare), composti fenolici (antociani, flavoni e tannini) e aromi (Colette Navarre, 1991). Sotto la buccia l'acino è composto dal mesocarpo e dall'endocarpo che insieme costituiscono la polpa, corrispondente al 75/85% del

peso del frutto. I costituenti essenziali della polpa sono gli zuccheri (glucosio e fruttosio) e gli acidi (malico e tartarico), ma presenta anche costituenti pectici e sostanze minerali. Nella parte interna dell'acino vi sono i vinaccioli, elementi piriformi dal tegumento duro e lignificato che proteggono l'embrione; i vinaccioli sono ricchi di tannini che possono causare un'eccessiva astringenza e possiedono alcuni oli che conferiscono caratteristiche indesiderate al vino (Colette Navarre, 2004).

Il vino è elaborato a partire da una materia prima eterogenea che presenta una parte solida, costituita dai tessuti a forte concentrazione cellulare, e una fase liquida (mosto), corrispondente al succo secreto dai tessuti. Riducendo o prolungando il contatto parte solida-mosto, il vinificatore può realizzare differenti tipi di vino a partire dalla stessa tipologia d'uva.

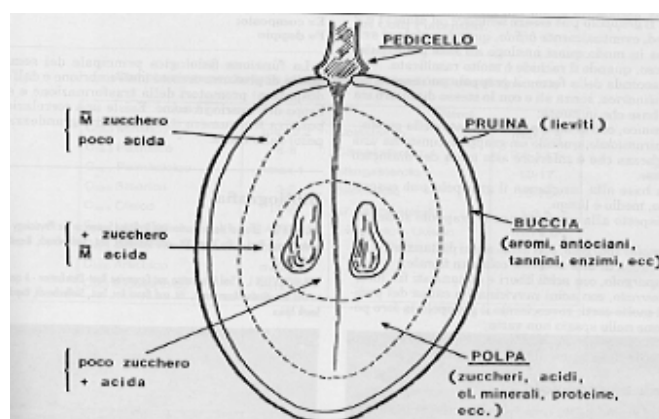


Figura 1.1: Schema di un acino e distribuzione di alcuni composti nei vari tessuti. (Fregoni, 1998).

1.3 SVILUPPO E MATURAZIONE DELL'ACINO D'UVA IN *Vitis vinifera*.

Dopo la fioritura, grazie alla fecondazione e ai relativi stimoli ormonali, inizia l'allegagione, caratterizzata da un'elevata divisione cellulare ed accrescimento dell'ovario. Dall'allegagione fino alla maturazione, e anche oltre se si attende la sur-maturazione, l'uva passa attraverso diversi stati fenologici che segnano fasi di evoluzione corrispondenti a variazioni di composizione chimica (Colette Navarre *et al.*, 1991). Questi cambiamenti avvengono con alto livello di eterogeneità, non solo tra differenti piante, ma anche tra grappoli della stessa pianta e addirittura tra acini appartenenti allo stesso grappolo (May, 2000).

Con l'allegagione le bacche che costituiscono il grappolo iniziano ad accrescersi seguendo un andamento a doppia sigmoide (Figura 1.2), sulla quale sono state individuate tre fasi principali:

- 1) Fase erbacea
- 2) Fase translucida e di invaiatura
- 3) Fase di maturazione

Le tre fasi durano circa da 50 a 120 giorni a seconda del vitigno, del portainnesto e dell'ambiente pedo-climatico (Fregoni, 2005).

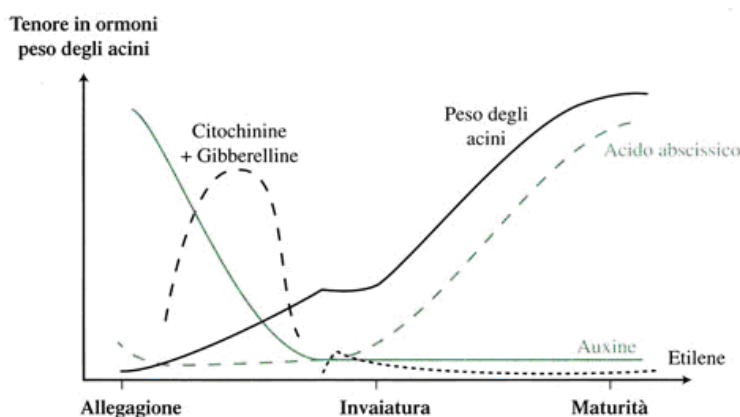


Figura 1.2: Evoluzione del peso degli acini. (Champagnol, 1984).

1.3.1 FASE ERBACEA

Durante la fase erbacea l'accrescimento della bacca avviene sia per divisione che per distensione cellulare: inizia 8 giorni dopo la fioritura (GDF) e finisce 30-40 GDF. Questa fase di crescita porta alla sintesi e immagazzinamento nei vacuoli di una grande quantità di acidi organici, in particolare acido malico e tartarico (Ollat *et al.*, 2002).

Questo momento è determinante per definire il volume finale dell'acino, poiché nelle fasi successive la dimensione della bacca dipenderà dal riempimento e dalla distensione cellulare più che dalla divisione cellulare (Ollat e Gaudillere, 1998).

Per quanto riguarda gli ormoni vegetali, gibberelline (GA) e auxine (IAA in particolare) sono accumulate in grande quantità nella prima fase di crescita delle bacche immature. Infatti, molti studi hanno rilevato un elevato livello di auxine durante lo sviluppo precoce della bacca, che poi decresce fino a quantità molto basse in fase di post invaiatura (Coombe e Hale 1973; Inaba *et al.*, 1976, Cawthon and Morris 1982, Zhang *et al.*, 2003, Baydar and Harmankaya 2005; Detieux-

Belleau *et al.* 2007; Bottcher *et al.*, 2010). Symons *et al.* (2006), invece, ipotizzano che i livelli di auxine durante lo sviluppo della bacca siano costanti, con differenze non rilevanti fra le fasi di pre e post invaiatura. Le motivazioni di questi dati discordanti non sono al momento conosciute (Davies 2009), ma l'ipotesi di una quantità costante di ormone è in contrasto anche con uno studio condotto su fragola (un falso frutto avente una fisiologia di maturazione simile a quell'uva) in cui si è dimostrato che la maturazione non inizia fino a quando l'IAA non scende sotto ad un certo livello. (Given *et al.*, 1988, Daminato *et al.*, 2013).

La sintesi e l'accumulo degli acidi organici (in particolare acidi tartarico e malico) sono tra i processi più importanti che caratterizzano la fase erbacea della bacca. L'acido malico e tartarico rappresentano il 70-90% dell'acidità totale della bacca e svolgono un'importante ruolo nel determinare le proprietà organolettiche dell'uva e la stabilità fisica e biologica del vino; infatti acidi e zuccheri dell'uva sono i principali costituenti del gusto dell'uva e del vino. Nell'acino troviamo anche una quantità minore di altri acidi, quali acido isocitrico, fumarico, gluconico, glucuronico, succinico, lattico, aconitico, quinico, shikimico e altri ancora che sono sempre presenti in piccole quantità (Ruffner, 1982). L'acido tartarico è sintetizzato nelle bacche giovani a partire dall'acido ascorbico ed accumulato molto rapidamente dopo l'allegagione.

L'acido malico è sintetizzato nel citoplasma e accumulato nei vacuoli durante la fase erbacea dove raggiunge la massima concentrazione all'invaiatura (fino a 15 mg su grammo di peso fresco) dove si osserva un pH vacuolare di 2.3-2.7. L'acido malico è sintetizzato dall'attività di due enzimi, la fosfoenolpiruvato carbossilasi (*PEPC*) e la malato deidrogenasi (*MDH*) (Terrier e Romieu, 2001).

Oltre agli acidi organici, anche la concentrazione di potassio concorre alla definizione dell'acidità dell'uva, questo elemento ha infatti un ruolo importante nell'osmoregolazione delle cellule e nel trasporto di cationi, anioni e zuccheri. Si è visto che elevati livelli di potassio possono avere effetti negativi sulla stabilità dei vini poiché determinano un innalzamento del loro pH (Davies *et al.*, 2006). Il potassio tende a diminuire la concentrazione di acido tartarico nella bacca e nel mosto con la formazione di bitartrato di potassio che è poco solubile, mentre aumenta la concentrazione di acido malico (Terrier e Romieu, 2001).

La maggior parte degli zuccheri (fruttosio e glucosio) sono rapidamente metabolizzati all'interno della bacca fino all'invaiatura. L'accumulo degli zuccheri

nei vacuoli delle cellule della polpa avviene attraverso la via simplastica e apoplastica una coordinata attività di invertasi e di trasportatori di saccarosio e di esosi (Boss e Davies, 2001). In particolare, nelle bacche in fase erbacea sono significativamente espressi tre geni che codificano per trasportatori di saccarosio (*VvSUC11*, *VvSUC12* e *VvSUC27*) e monosaccaridi (*VvHT1* e *VvHT2*) (Boss e Davies, 2001). Ci sono evidenze sperimentali che dimostrano come alcuni geni codificanti per trasportatori di zuccheri vengano espressi in base ai livelli di zuccheri nella pianta, dimostrando un feedback dipendente dalla concentrazione di zucchero nella pianta (Rolland *et al.*, 2002).

La biosintesi dei polifenoli è un altro importante processo metabolico che interessa la prima fase di crescita del frutto dopo l'allegagione; i principali metaboliti che vengono sintetizzati in questa fase sono proantocianidine e flavonoli.

Precursore principale della maggior parte dei fenoli è la fenilalanina (Figura 1.3) che viene sintetizzata dalla via dell'acido skichimico. A partire dalla fenilalanina viene sintetizzato, grazie agli enzimi *C4H* e *4CL*, il p-cumaril CoA, dal quale si svilupperanno le vie biosintetiche dei composti polifenolici e dei composti stilbenici (Boss e Davies, 2001). Infatti la condensazione di una molecola di p-cumaril CoA con tre molecole di malonil CoA porta alla sintesi di diversi composti, nello specifico calcone/tetraidrossicalcone o composti stilbenici a seconda che la reazione venga catalizzata dall'enzima calcone sintasi (*CHS*) (Boss e Davies, 2001) o dall'enzima stilbene sintasi (*STS*) (Bavaresco e Fregoni, 2001).

I principali geni coinvolti nelle pathway biosintetiche dei flavonoidi sono (Figura 1.3): *VvF3H* (*Flavanone-3-hydroxylase*), *VvF3'H* (*Flavonoid 3'hydroxylase*), *VvF3'5'H* (*Flavonoid 3'5' hydroxylase*), *VvFLS* (*Flavonol synthase*), *VvLDOX* (*Leucoanthocyanidin dioxygenase*), *VvDFR* (*Dihydroflavonol reductase*), *VvLAR2* (*Leucoanthocyanidin reductase 2*), *VvANR* (*Anthocyanidin reductase*), *VvUFGT* (*UDP glucose: flavonoid 3-o-glucosyltransferase*), *VvCHS* (*Chalcone synthase*) e *VvCHI* (*Chalcone isomerase*) (Bonera, 2011). La reazione che dal tetraidrossicalcone porta alla formazione di naringerina, che rappresenta il precursore di flavonoli, flavanoli, leucoantocianine, antocianine e antocianidine, è catalizzata dall'enzima calcone isomerasi (CHI). Il gene *VvF3'H* codifica per l'enzima flavanone-3-idrossilasi, il quale è coinvolto nel primo passaggio della via biosintetica che porta alla formazione dei flavoni. A questo punto intervengono

anche i geni F3'H e F3'5'H che codificano per gli enzimi flavanone -3'e -3',5'-idrossilasi la cui funzione è quella di aggiungere un singolo gruppo ossidrilico (-OH) in posizione 3 oppure due gruppi idrossili nelle posizione 3' e 5' della molecola diidrokampferolo e/o diidroquercetina. Una volta convertiti nelle molecole 3'-diidroquercetina o 3',5'-diidromyricetina, questi composti partecipano ad altre reazioni che portano alla formazione di altri composti polifenolici, quali leucoantocianine, catechine, proantocianine e tannini a seconda dei diversi stadi di sviluppo, i quali sono tutti segnati dall'espressione di determinati geni che codificano per enzimi che catalizzano i processi di evoluzione delle bacche di *Vitis vinifera*. Nello specifico, i flavonoli si originano dalla conversione dei diidroflavonoli mediante l'enzima flavonol sintasi (codificato dal gene *VvFLS1*) che origina importanti copigmenti che si ritengono essere stabilizzatori dei pigmenti antocianici all'interno del vino. Questi ultimi corrispondono a quercetine, kampferoli e myricetine (Simonetti *et al.*, 1997). Questi composti non sono localizzati in un tessuto specifico, infatti sono presenti in buccia, polpa e semi. Per quanto riguarda le proantocianidine sono ormai noti anche gli enzimi leucoantocianidine-riduttasi (LAR) e antocianidine riduttasi (ANR) che danno origine rispettivamente a catechine e epicatechine; questi composti, definiti tannini, vengono principalmente formati nei semi (Downey *et al.*, 2003). Nei passaggi finali che portano alla biosintesi di cianidine/delfinidine e antociani intervengono rispettivamente i geni *ANS* (antocianidina sintasi) e *LDOX* (leucoantocianidina di ossigenasi).

Polpa e semi accumulano principalmente proantocianidine e catechine, mentre la buccia accumula proantocianidine, responsabili del viraggio colorimetrico durante l'invasatura, nelle cellule tra il tegumento esterno e interno dei semi e nelle cellule dell'ipoderma della buccia.

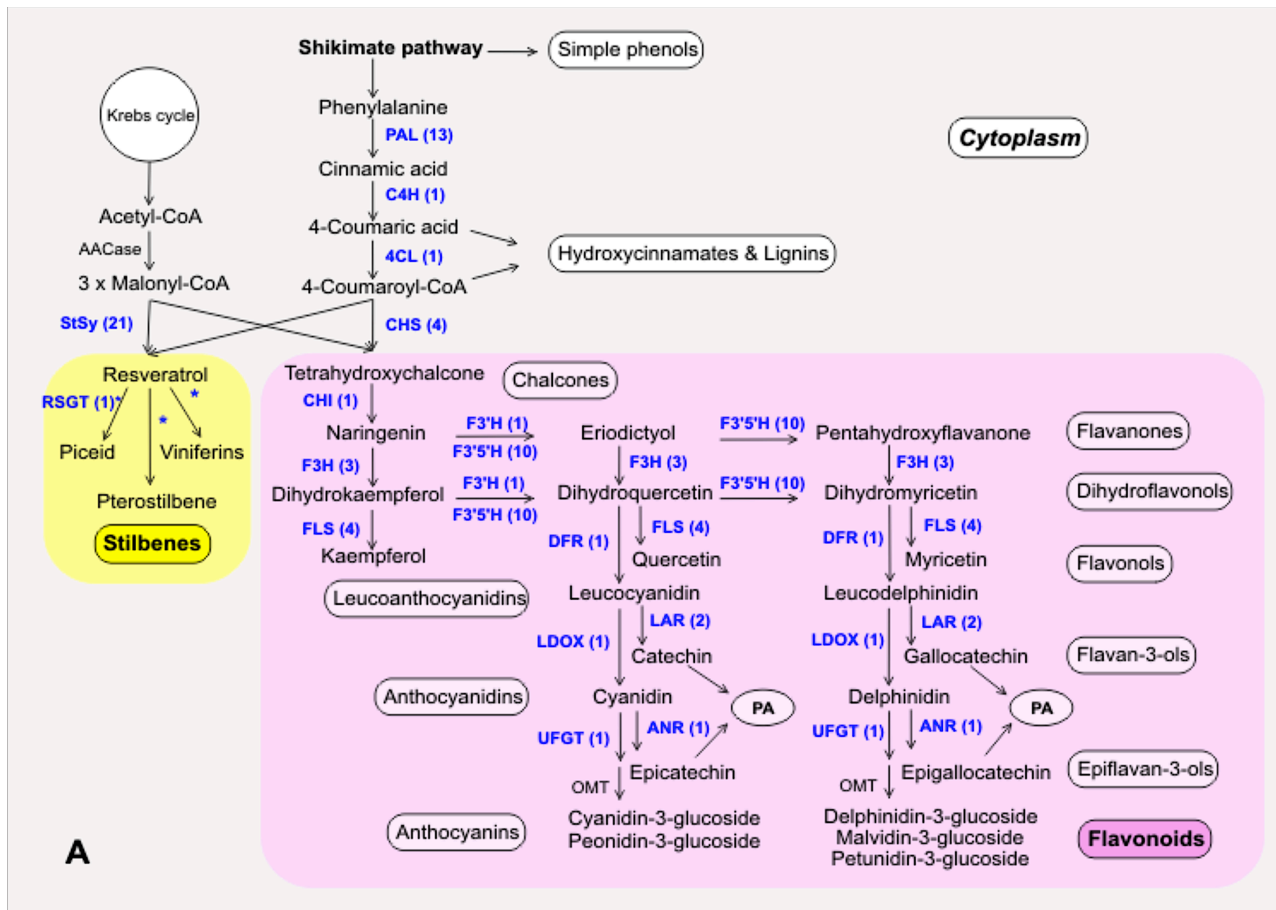


Figura 1.3: Via metabolica per la biosintesi dei polifenoli. (Velasco *et al.*, 2007)

1.3.2 INVAIATURA E SINDROME DI MATURAZIONE

La seconda fase di sviluppo/maturazione delle bacche coincide con il periodo di stasi della curva a doppia sigmoide e, più precisamente, con il fenomeno della diminuzione di clorofilla e dell'assunzione di un aspetto translucido della bacca, che termina con l'invaiatura (Fregoni, 2005). Le bacche assumono progressivamente la colorazione tipica della cultivar, ossia dal verde si passa al giallo (pigmenti flavonici) nelle uve bianche e al rosso più o meno intenso in quelle nere (antociani). In questa fase cala sensibilmente il metabolismo fotosintetico e aumenta la biosintesi di aromi, polifenoli e altre componenti strettamente correlate alle caratteristiche genetiche della cultivar che raggiungeranno il loro apice di intensità durante la fase di maturazione (Fregoni, 2005).

L'acino che ha completato la fase transitoria di invaiatura, durante la quale ha subito un rallentamento della crescita, entra nella fase di maturazione dove

riprende ad aumentare le sue dimensioni mediante processi di distensione cellulare (non più divisione come nella fase erbacea) e la sua composizione chimica si modifica. La maturazione è una sindrome fisiologica complessa, caratterizzata da processi chimico-fisici quali l'aumento del grado zuccherino, la diminuzione dell'acidità, il rammollimento della polpa, lo sviluppo del colore e/o delle componenti aromatiche, caratteri che in linea generale aumentano il grado di appetibilità e sono strettamente connessi al genotipo della cultivar ed influenzati dall'ambiente di coltivazione.

Successivamente all'invasatura gli zuccheri (glucosio, fruttosio e saccarosio) vengono accumulati all'interno delle cellule dell'acino, mentre nelle fasi precedenti questi sono completamente metabolizzati. La bacca si comporta da sink e richiama i prodotti della fotosintesi esportandoli dalle foglie (source) principalmente per via floematica (Ollat et al., 2002). Per mezzo di trasportatori di glucosio avviene lo scaricamento degli zuccheri per via apoplastica mediante la membrana plasmatica, come proposto da Cheng e Breen (1991) e confermato da Terrier *et al.* (2001) e Zhang *et al.* (2006). Nella vite il saccarosio è il più importante carboidrato trasportato a lunga distanza. Questo disaccaride, dopo aver raggiunto le bacche per via floematica, viene portato all'interno del mesocarpo per via apoplastica. Nel citoplasma delle cellule del mesocarpo il saccarosio e gli zuccheri esosi sono trasportati nei vacuoli attraverso trasportatori tonoplastici. Sono stati individuati quattro geni codificanti per trasportatori di saccarosio chiamati *VvSUC11/VvSUT1*, *VvSUC12*, *VvSUC27* e *VvSUT2*, (Davies *et al.*, 1999 e Manning *et al.*, 2001). In vite, l'espressione dei geni che codificano per i trasportatori degli zuccheri, avviene in modo differente nei diversi organi della pianta, come mostra la Figura 1.4.

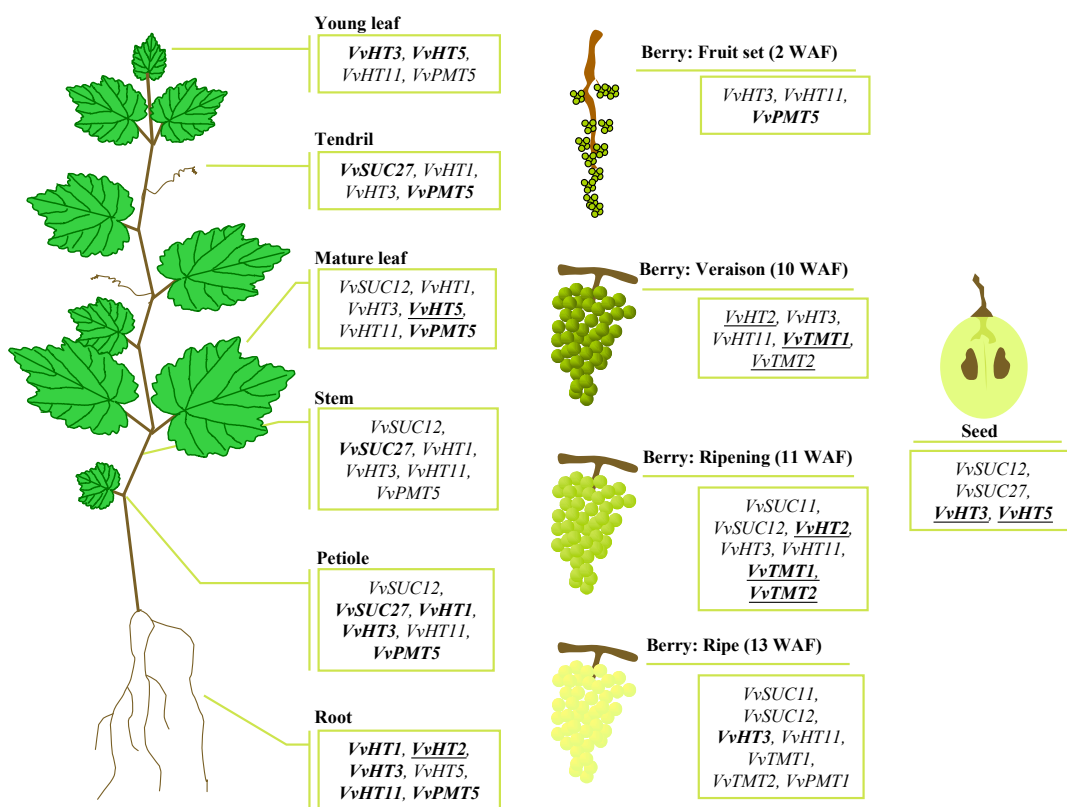


Figura 1.4: Rappresentazione schematica di espressione preferenziale di geni trasportatori di zuccheri in *Vitis vinifera* L. nei diversi organi vegetativi durante il riempimento degli acini. I geni in neretto sono quelli più espressi negli organi indicati, mentre quelli sottolineati mostrano un'espressione preferenziale o indotta durante lo sviluppo degli organi considerati (Afoufa-Bastien et al., 2010).

Contemporaneamente all'accumulo di zuccheri, si assiste anche ad un aumento della deformabilità della bacca causato dal cambio della composizione e della struttura della parete conseguentemente a una depolimerizzazione della pectina e degli xiloglucani e diminuzione delle emicellulose e cellulose (Yakshiji *et al.*, 2001). Tra gli enzimi coinvolti nella modificazione della parete cellulare sono presenti le xiloglucan endotransglicosilasi (*XET*) e le poligalatturonasi (*PG*) i quali sono indotti in fase di maturazione (Nunan *et al.*, 2001).

Un'altra importante modificazione chimica che avviene durante la sindrome di maturazione è la degradazione del contenuto di acidi organici (tartarico e malico principalmente). L'acido tartarico diminuisce lievemente per un effetto diluizione

dovuto all'accumulo di soluti che portano ad un aumento del volume generale. Nell'uva è stato osservato che, nel corso della maturazione, elevate quantità di acido malico vengono rilasciate dal vacuolo e dirette verso i mitocondri per mantenere la respirazione e sostenere la produzione di ATP mediante il ciclo di Krebs (Bonghi *et al.*, 2012). Durante la maturazione della bacca le condizioni ambientali influenzano fortemente la concentrazione di acidi organici, in particolare del malato; infatti elevate temperature inducono una maggiore respirazione e aumentano l'attività dell'enzima malico citoplasmatico (NADP-ME) responsabile della decarbossilazione dell'acido a piruvato (Bonghi *et al.*, 2012). Nell'uva in maturazione l'acido malico viene anche trasformato in zuccheri mediante gluconeogenesi attraverso l'attivazione di specifici enzimi quali la piruvato ortofosfato dichinasi (*PPDK*) e la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (*PEPCK*); Questo processo ha un ruolo molto importante nella diminuzione dell'acidità finale della bacca, inoltre un'eccessiva quantità di quest'acido nelle uve è sintomo di scarsa maturazione (Bonghi *et al.*, 2012).

L'accumulo vacuolare di antociani nella buccia delle bacche è responsabile della pigmentazione delle cultivar rosse/blu. La sintesi degli antociani ha inizio durante la fase di distensione cellulare e termina poco prima della raccolta. L'espressione del profilo dei geni strutturali e dei fattori trascrizionali ha assegnato il ruolo maggiore di tutta la biosintesi al gene *UFGT*, codificante per un UDP-glucosio: flavonoidi 3-O-glucosiltransferasi e il suo gene regolatore *VvMybA*. Le antocianine cianidin-derivate e delphinidin-derivate differiscono tra loro per il numero di gruppi sostituiti sull'anello B dello scheletro dei flavonoidi (due o tre rispettivamente) e da ciò derivano le loro proprietà cromatiche. La proporzione dei due tipi di antociani è largamente sotto controllo genetico e determina la variazione di colore fra rosso, viola e blu delle varietà delle bacche della vite, influenzando sul colore finale del vino. Oltre a i fattori genetici, l'intensità della colorazione antocianica dei frutti a maturazione è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali; escursioni termiche pronunciate fra giorno e notte nella fase di maturazione associate ad elevate intensità luminose consentono di ottenere frutti con una più marcata colorazione antocianica. In vite la delezione di un *Myb* nel corredo genomico delle uve rosse ha portato alla comparsa del fenotipo con bacca bianca; indicativamente gli elementi che determinano il colore delle bacche bianche/gialle sono i pigmenti flavonici ed in particolare i flavanoli (Bonghi *et al.*, 2012).

1.4 COMPONENTI AROMATICHE VARIETALI DELL'UVA

Durante la maturazione si osserva anche una modificazione del profilo aromatico che porta ad uno sviluppo di un bouquet caratteristico delle diverse tipologie di frutto, si parla principalmente di composti volatili come monoterpeni e sesquiterpeni, responsabili della cosiddetta aromaticità che pochi vitigni possiedono in maniera marcata e distinguibile.

Le bucce dell'acino d'uva sono ricche di sostanze odorose, che conferiscono caratteristiche aromatiche peculiari al vino. In uve di varietà aromatiche, come il moscato, anche la polpa è in grado di arricchire di aromaticità l'uva (Colette Navarre et al., 1991). Il più delle volte gli aromi varietali sono legati a molecole di zucchero, per questo definiti glicosilati, e non riescono a stimolare il nostro olfatto. Durante la fermentazione gli aromi glicosilati vengono scissi dai lieviti che utilizzano lo zucchero come substrato di fermentazione e liberano quindi gli agliconi odorosi per fenomeni idrolitici che diventano percettibili al nostro olfatto (Mateo *et al.*, 1997). L'idrolisi dei composti glicosilati può portare alla liberazione di agliconi volatili oppure sostanze che fungono da precursori di altri composti aromatici (*e.g.* agliconi C13 norisoprenoidi). Quindi, durante la vinificazione uno o più enzimi sono responsabili dell'idrolisi di precursori glicosidici e del conseguente rilascio di composti volatili. I precursori comprendono monoglucosidi, in cui lo zucchero è il -D-glucosio, e precursori diglucosidici, in cui al glucosio è legata una seconda unità glucidica come -L-arabinofuranoside, -L-ramnospiranoside, -D-apiofuranoside (Pogorzelski et al., 2007).

I composti aromatici dell'uva sono localizzati nella buccia ed iniziano ad essere sintetizzati solo dopo l'invasatura e aumentano parallelamente agli zuccheri nel corso della maturazione. Il bouquet aromatico di un vino dipende principalmente dalla varietà e può interessare l'attività dei lieviti, ossia la fermentazione alcolica, e infine possono derivare dall'invecchiamento e dall'affinamento. I metaboliti secondari responsabili degli aromi nell'uva e nel vino sono centinaia e in accordo con le loro origini, viene fatta una suddivisione in aromi primari e secondari. In viticoltura le cultivar aromatiche come Moscato e Malvasia sono caratterizzate da un alto contenuto di composti odorosi di aromi (aglycon-free). Nell'uva, si possono individuare monoterpeni liberi, poli-idrossilati e glicosidici. I principali composti terpenici liberi sono gli alcoli come il linalolo, il geraniolo e il nerolo,

insieme alle forme furaniche e piraniche degli ossidi del linalolo, il citronellolo, l' α -terpineolo, l'HO-trienolo, gli ossidi del nerolo, il mircenolo e aldeidi ed idrocarburi. Nei vini, inoltre, sono stati trovati parecchi eteri ed esteri. Le forme poli-idrossilate dei monoterpeni o polioli inodori (come il 3,7-dimetil-1-octen-3,6,7-triolo, il 3,7-dimetil-2-octen-1,7-diolo) possono dare origine, per idrolisi in ambiente acido, a monoterpeni volatili piacevoli e "intensi". Ad esempio dal diendiolo (3,7-dimetil-octa-1,5-diene-3,7-diolo) si può liberare l'ossido del nerolo e dell'HO-trienolo. Le forme glicosilate dei monoterpeni sono complesse e si differenziano per la struttura dell'aglicone costituita principalmente dai terpenoli, ma anche dagli ossidi del linalolo, dai dioli terpenici ed dai trioli (Figura 1.5). I glicosidi sono, nella maggior parte delle uve, più abbondanti delle corrispondenti forme libere. I risultati delle ricerche condotte sull'argomento hanno messo in evidenza che la quantità e la qualità dei terpeni glicosilati dipendono dalla cultivar dell'uva (Bayonove et al., 1993).

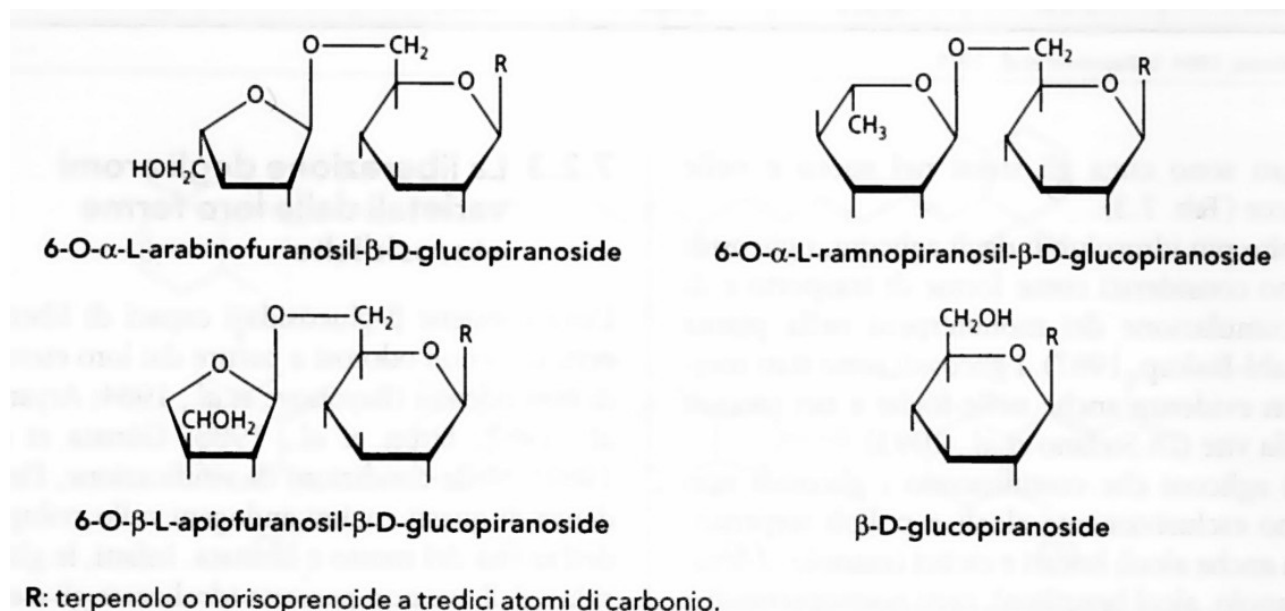


Figura 1.5: Le differenti forme dei glicosidi terpenici riscontrati nell'uva (Fanara, 2010)

I Terpeni sono oltre 4000 ma quelli odorosi sono quelli a 10 atomi di C (monoterpeni) e quelli a 15 atomi di C (sesquiterpeni). I nor-isoprenoidi derivano dalla degradazione ossidativa dei carotenoidi (terpeni a 40 atomi di C) e quelli più odorosi sono i C13-nor-isoprenoidi tra i quali il beta-damascone fornisce i sentori

esotici.

I terpeni sono idrocarburi costituiti da due o più molecole di isoprene e caratterizzati dalla formula bruta C_5H_8 . I monoterpeni sono i principali componenti degli olii essenziali e vengono distinti in Terpeni Olefinici, Terpeni Monociclici e Terpeni Biciclici. Dalle classi sopra indicate si possono sviluppare derivati ossigenati aventi funzioni alcoliche, aldeiche, chetoniche e ossidriliche. Tra i derivati dei terpeni olefinici sono presenti gli alcoli: citronellolo, geraniolo, linalolo, nerolo, tra i derivati dei terpeni monociclici vi sono alcoli monovalenti quali: terpineolo, mentolo; infine tra i derivati biciclici vi sono: pinene, borneolo. Nelle uve vi sono circa 40 molecole terpeniche; i monoterpeni con la soglia di percezione più bassa sono il linalolo (rosa), l'alfa-terpenolo (canfora), il nerolo (rosa), il geraniolo (rosa), il citronello (limone) e l'hotrienolo (tiglio). Questi alcoli monoterpenici sono caratteristici dei Moscati (specie il linalolo), delle Malvasie (specie il geraniolo), del Traminer, del Riesling renano, dello Chardonnay (Fregoni *et al.*, 2005).

Il substrato iniziale per la biosintesi di più di 25000 terpeni sono unità semplici di C_5 -isopentil pirofosfato e il suo isomero dimetilallil pirofosfato (DMAPP), i quali sono prodotti da due vie metaboliche distinte: la prima è la pathway "MEP/DOXP" che avviene nei plastidi, la seconda è la *pathway* dell'acido mevalonico che avviene nei citosol e nelle perossisomi (Lichtenthaler 1999; Spair-Mir *et al.* 2008). Le piante sintetizzano i terpenoidi mediante il metabolismo della HMG-CoA riduttasi, attraverso il quale nel citoplasma, si formano a partire dall'acetil-CoA gli isoprenoidi isopentil pirofosfato (IPP) e dimetilallil pirofosfato (DMAPP), ma in contrasto con il metabolismo dell'acido mevalonico, le piante possono anche produrre isoprenoidi (terpenoidi) attraverso un metabolismo "non mevalonico" che avviene nei plastidi; il metabolismo "non mevalonico" produce isopentil pirofosfato (IPP) e dimetilallil pirofosfato (DMAPP) a partire da piruvato e gliceraldeide 3-fosfato. Mediante la 1-deossi-D-xilulose-5-fosfato sintasi, da piruvato e gliceraldeide 3-phosphate si forma 1-deossi-D-xilulose 5-fosfato; da questo metabolita si forma la 2-C-metil-D-eritriol 4-fosfato (MEP) attraverso l'enzima 1-deossi-D-xilulosio 5-fosfato riduttasi; i composti DMAPP e IPP vengono sintetizzati dall'enzima HDR 1-idrossi-2-metil- 2-(E)-butenil-4-difosfato riduttasi che da origine ai 2 composti utilizzando il substrato HMB-PP (E)-4-idrossi-3-metil-but-2-enil pirofosfato che prende origine da composti

intermedi del metabolismo MEP (Martin *et al.*, 2012; Styger *et al.*, 2011). L'attività di 3 preniltransferasi produce i diretti precursori dei terpeni, la geranil pirofosfato (GPP, C10), la farnesil pirofosfato (FPP, C15) e la geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C20) (Figura 1.6). Successivamente le terpene sintasi catalizzarono la reazione che porta alla formazione di emiterpeni (C₅), monoterpeni (C₁₀), sesquiterpeni (C₁₅) o diterpeni (C₂₀) dai rispettivi substrati DMAPP, GPP, FPP o GGPP (Tholl 2006). I composti terpenici formati dalle TPS, possono essere ulteriormente modificati dall'azione di varie classi di enzimi, tra cui ricordiamo il citocromo P450 idrossilasi, deidrogenasi, riduttasi, glicosil transferasi e metil transferasi (Lange et al. 2000).

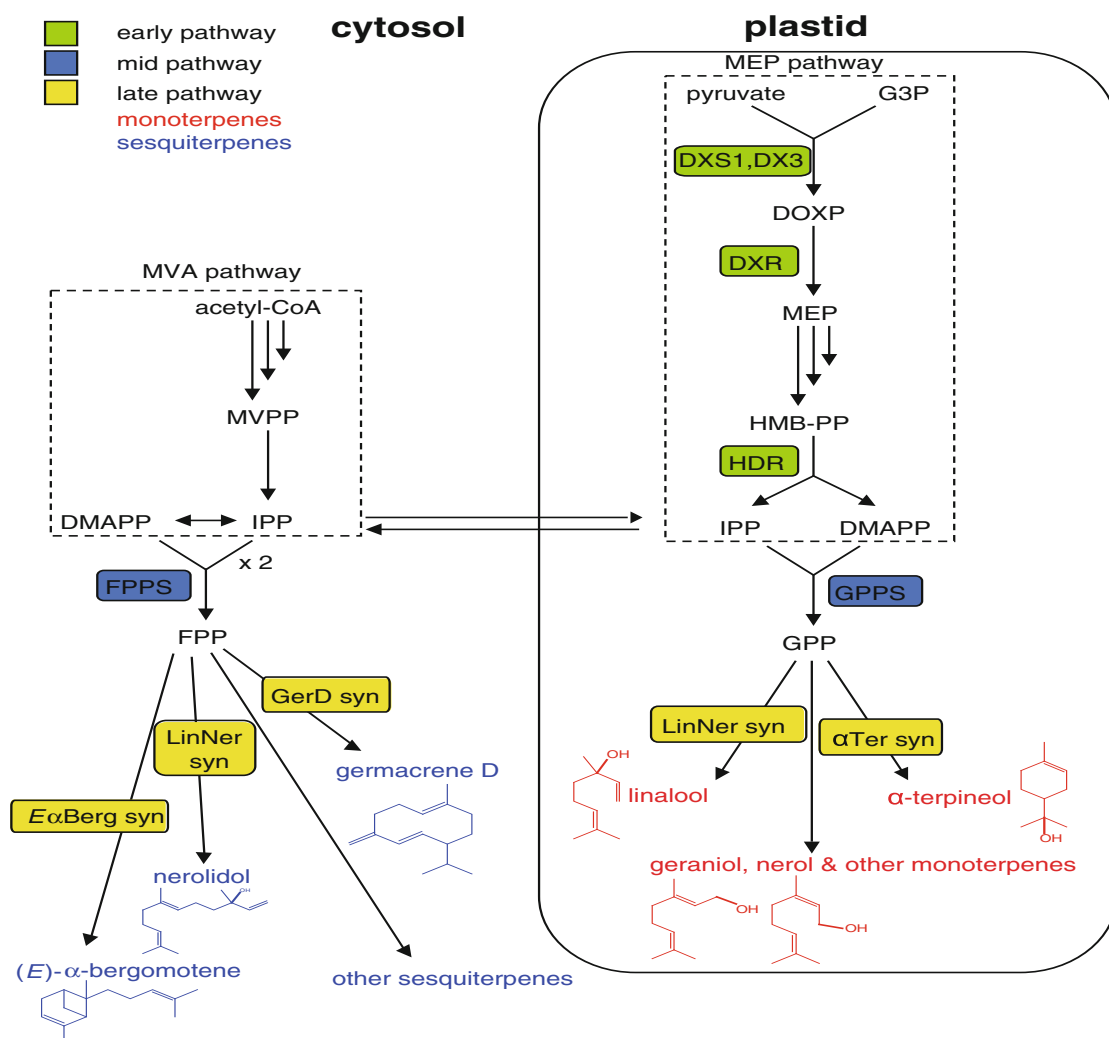


Figura 1.6: Schema della biosintesi dei monoterpeni e sesquiterpeni. (Martin *et al.*, 2012).

In vite, sono stati identificati 69 geni le cui proteine presentano il dominio proteico tipico delle terpene sintasi (VvTPS) (Martin et al., 2010), ma solo alcune di esse sono state caratterizzate dal punto di vista funzionale (Lück *et al.* 2004; Martin and Bohlmann 2004). È importante sottolineare che gli stessi enzimi che catalizzano le reazioni di biosintesi di monoterpeni e sesquiterpeni, siano anche coinvolti in produzioni di altre sostanze in cellule di tessuti diversi da quelle dell'acino, come ad esempio una sesquiterpene sintasi che, oltre a catalizzare la formazione di sesquiterpeni in Cabernet Sauvignon e Gewürstraminer, catalizza la reazione che porta alla formazione delle fragranze floreali nei fiori e il relativo gene viene espresso nelle antere dei fiori (Lück *et al.*, 2004 ; Martin *et al.*, 2009). Anche i carotenoidi giocano un ruolo importante come composti che concorrono a caratterizzare l'aroma di una determinata varietà. Gli isoprenoidi tetraterpeni originano dal composto precursore acido mevalonico, dove 5 unità carboniche sono condensate. L'ossidazione dei carotenoidi produce frammenti odorosi volatili e intensi conosciuti come C13-norisoprenoidi, tra i quali sono presenti il β -ionone (aroma di viola), il β -damascenone (aroma di frutti esotici), il β -damascone (aroma di rosa) e il β -ionolo (aroma di frutti e fiori).

Odor characteristic	Impact compounds	Cultivar
Floral	Linalool	Muscat
Citrus, floral	Geraniol	Muscat
Citrus, floral	Nerol	Muscat
Geranium oil	Tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-2,5- <i>cis</i> -2H-pyran (<i>cis</i> -Rose oxide)	Gewurztraminer
Kerosene	1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	Riesling
Bell pepper	3-Isobutyl-2-methoxypyrazines	Sauvignon blanc
Coconut, woody, sweet	3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-3H-1-benzofuran-2-one	Gewurztraminer
Black currant	4-Methyl-4-mercaptopentan-2-one	Sauvignon blanc
Grapefruit, citrus peel	3-Mercapto-1-hexanol (<i>R</i> isomer)	Sauvignon blanc
Passion fruit	3-Mercapto-1-hexanol (<i>S</i> isomer)	Semillon
Black pepper	Rotundone	Shiraz

Figura 1.7: Composti odoranti contribuente agli aromi varietali dei vini derivanti da vitigni aromatici. (Styger *et al.*, 2011)

1.4.1 VITIGNI AROMATICI: IL CASO DEL MOSCATO

I vitigni che più si distinguono per l'originalità e l'intensità del profumo sono

quelli definiti aromatici, come moscati, malvasie, brachetti e gewürztraminer. I vitigni moscato sono numerosi, ma il più conosciuto è quello bianco, il cui vino è caratterizzato da aromi di pesca bianca, rosa, salvia e muschio che sono le note caratteristiche di uno tra i più famosi spumanti dolci. Meno famoso è il moscato giallo, le cui uve sottoposte a vendemmia tardiva vengono utilizzate per produrre dei vini passiti in Trentino e Alto Adige. A sud troviamo, invece, la terra dello zibibbo o moscato di Pantelleria con cui si producono dei vini passiti con profumi di miele e uva passa, agrumi canditi e frutta sciropata, albicocche e fichi secchi. I moscati sono una grande famiglia di vitigni antichi e prestigiosi, diffusamente coltivati già nel Medio Evo in tutto il bacino del Mediterraneo e indicati quasi sempre come Moscatelli o simili (Costacurta, 2013). Le indagini concordano nel raggruppare quasi tutti i Moscati coltivati in poche famiglie che hanno come capostipiti il Moscato Bianco, il Moscato Giallo e il Moscato di Alessandria (Costacurta, 2013). Il legame di parentela tra i tre vitigni sopra citati sembra essere molto stretto, e ci permette di formulare l'ipotesi nella quale il Moscato Giallo ha un ruolo di assoluto rilievo nell'origine e diffusione dei Moscati.

I vitigni che producono uve aromatiche rappresentano una classe estremamente varia dal punto di vista dei profili dei terpenoli liberi e glicosilati che, tuttavia, possono essere riferiti a due gruppi a caratteristiche affini: a prevalenza di linalolo o geraniolo e dei loro derivati (Di Stefano, 2013). La distinzione fra uve aromatiche e non aromatiche è relativa solo ai loro caratteri sensoriali e al loro contenuto assoluto in terpenoli liberi e glicosilati, poiché anche le uve non aromatiche sono dotate di profili terpenici riferibili ai tre gruppi sopra menzionati (Di Stefano, 2013). In enologia è particolarmente importante conoscere il tipo di profilo terpenico delle varietà poiché vi è un diverso comportamento delle uve a prevalenza di linalolo, geraniolo e derivati nei riguardi dell'attività dei lieviti e di conseguenza delle tecniche da adottare per la loro vinificazione. I dati relativi al profilo dei terpenoli delle uve del vitigno Moscato Giallo coltivato in zone climatiche notevolmente diverse, ha evidenziato la presenza di un elevato numero di terpenoli liberi e glicosilati (linalolo, trans piran linalol ossido e 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diolo) (Di Stefano, 2013). Le informazioni indirette sulle analisi dei mosti possono confermare che Moscato Giallo e Moscato Bianco sono vitigni con un profilo terpenico molto simile per la prevalenza dei terpenoli della classe del linalolo e dei suoi derivati polioidrossilati; tuttavia i due vitigni differiscono

sensibilmente per la quantità dei derivati della classe del linalolo e del geraniolo che potenzialmente possono sintetizzare.

1.5 DETERMINAZIONE DELLA MATURITÀ DELL'UVA E TECNICHE DI SURMATURAZIONE.

L'epoca di raccolta dell'uva varia in funzione degli obiettivi enologici, della varietà e del portinnesto utilizzato. I parametri che vengono utilizzati per determinare il momento ottimale di raccolta e quindi la giusta maturazione del prodotto sono molteplici, e possono essere legati a processi fisiologici e biochimici della bacca come consistenza della polpa, accumulo zuccherino, riduzione degli acidi, composizione polifenolica e sintesi degli aromi (Fregoni *et al.*, 2005). Nella fasi finali della maturazione della bacca cessa l'accumulo degli zuccheri, mentre gli acidi non sono stati ancora completamente catabolizzati, l'intensità aromatica dell'uva si attenua e i polifenoli si affinano; è per questo che possiamo parlare di maturazione differita e la data di vendemmia è decisa in funzione di questo. (Fregoni *et al.*, 2005).

I parametri utilizzati per definire la data di vendemmia possono essere empirici o scientifici. I metodi empirici sono fondati su osservazioni fenologiche, mentre i metodi scientifici sono basati sull'evoluzione d'indizi misurabili (indici di maturità): maturità tecnologica, maturità polifenolica, maturità aromatica (Fregoni *et al.*, 2005).

La determinazione dell'indice di maturità tecnologica è dato dal rapporto tra le concentrazioni di zuccheri e acidi, infatti la rilevazione periodica dell'incremento del titolo zuccherino è tra gli indici più utilizzati per determinare l'epoca della vendemmia. Misurando la concentrazione degli zuccheri durante lo sviluppo/maturazione della bacca si osserva una concentrazione elevata di glucosio all'invasatura, mentre alla maturazione tende a prevalere il fruttosio (Fregoni *et al.*, 2005), quindi l'indice di maturazione potrebbe essere determinato dal rapporto glucosio/fruttosio.

Per quanto attiene agli acidi organici, è interessante seguire l'evoluzione dei singoli acidi e i rapporti fra gli acidi stessi, soprattutto tra l'acido malico e tartarico che condizionano fortemente la durata di un vino poiché sono la spalla acida del prodotto enologico.

In relazione alla tipologia di vino che si vuole ottenere e al momento in cui si vuole estrarre il massimo del potenziale produttivo dalla pianta e dall'acino, un indice di estrema importanza è quello relativo alla maturità fenolica, che tiene conto dell'accumulo di antociani e tannini e della loro estraibilità; infatti più le uve sono mature e più sono in grado di rilasciare i polifenoli, che nel tempo daranno maggiore stabilità al colore e al gusto.

In uve aromatiche come Moscati e Malvasie, il rapporto fra i due più importanti terpeni (linalolo/geraniolo) può essere un utile indice di maturazione che i tecnici possono utilizzare per identificare l'epoca di vendemmia in relazione alle caratteristiche che si vogliono ottenere dal punto di vista aromatico nel vino.

Ciò che si evince dalla letteratura è che non esiste un indice di maturazione migliore di un altro, ma esistono diversi indici a disposizione dei tecnici che permettono, insieme alle tecniche di viticoltura, di ottenere dalla pianta e dai suoi frutti il giusto quantitativo di tutti i costituenti desiderati.

Per modificare la composizione delle uve e conseguentemente aumentare la qualità del vino, le strategie di viticoltura che possiamo adottare sono basate sul differenziamento della vendemmia ritardando la raccolta tradizionale o applicando tecniche di appassimento che permettono la concentrazione delle sostanze negli acini. In questo contesto, con il termine "appassimento" indichiamo una variabile e progressiva perdita di acqua da parte principalmente delle cellule parenchimatiche che compongono la polpa (meso ed endocarpo), mentre con il termine "surmaturazione" si definisce quello stadio di sviluppo che segue la maturazione fisiologica che nel metabolismo del frutto rappresenta la fase di senescenza dello stesso. La differenza che può esistere fra una situazione "in pianta" rispetto ad una "fuori pianta" è cruciale, poiché l'acino reagisce diversamente ad una situazione di stress come l'interruzione dei vasi linfatici rispetto ad una situazione in cui sono mantenute tutte le connessioni vascolari con il resto della pianta. L'evento principale dell'appassimento è rappresentato dal processo di disidratazione, mentre nella surmaturazione il frutto va incontro a cambiamenti metabolici non sempre accompagnati dalla perdita di peso fresco.

1.5.1 TECNICHE DI VENDEMMIA DIFFERITA

Nel caso di vendemmie differite si può decidere di lasciare l'uva in pianta per un periodo più lungo portandola alla sovramaturazione (Vendemmia Tardiva) oppure

si può applicare una la Doppia Maturazione Ragionata (DMR).

La vendemmia tardiva induce cambiamenti nei livelli di prolina, zuccheri, alcool e del contenuto di acidi organici nel mosto decantato e nella base vino (Guillaumie et al. 2011); dai dati sperimentali si evince che con la vendemmia tardiva gli acini tendono a perdere una leggera quantità di acqua, ma anche a consumare gran parte degli acidi organici (acido malico in particolare).

Accanto a queste tecniche, si è affermato anche l'uso della Doppia Maturazione Ragionata (DMR, Corso *et al.*, 2013), tecnica che consiste nel provocare due livelli di sovraturazione delle uve attraverso il taglio del tralcio della vite, eseguito in modo da lasciare metà dei grappoli a surmaturare in pianta e l'altra metà "recisa" ad iniziare un naturale processo di appassimento. Tagliando il tralcio si formano due popolazioni (Figura 1.8): quella sopra il taglio dove i collegamenti rimangono attivi, mentre la seconda sotto il taglio dove i collegamenti con il tronco sono interrotti. L'adozione della DMR consente l'aumento del tasso zuccherino delle bacche alla maturità polifenolica, pur permettendo di conservare ottimi livelli di pH, acidità titolabile, acido malico ed acido tartarico e, dunque, qualità sensoriale dei vini, nonché di migliorare lo stato sanitario delle uve ottenute da vitigni troppo vigorosi e produttivi, come il Raboso Piave (Carbonneau *et al.*, 2008).



Figura 1.8: Taglio del tralcio per la pratica della DMR su Moscato giallo.

Nella popolazione a monte del taglio, per la quale le connessioni vascolari sono mantenute, il comportamento dell'uva è simile a quello di una vendemmia tardiva, al contrario della seconda popolazione con i vasi interrotti dove avvengono significanti cambiamenti biochimici, legati alla perdita di acqua, una maggiore maturità fenolica e una spalla acida che rimane alta per un catabolismo malico e tartarico rallentato (Corso *et al.* 2013). Il mantenimento prolungato dei grappoli sulla pianta può sortire effetti diversi, a seconda del vitigno, sull'andamento dello stato di idratazione delle bacche (Figura 1.9).

La perdita di acqua delle bacche è strettamente collegata al genotipo della pianta, inoltre è fortemente condizionata dal metabolismo dei fenilpropanoidi (Versari *et al.*, 2001) e porta all'accumulo di fenoli che sembrano essere bio-marcatori del processo di appassimento (Zamboni *et al.*, 2008; Bonghi *et al.*, 2012). Indagini svolte sulla varietà Raboso hanno messo in evidenza che le bacche soggette a DMR, in comparazione con una vendemmia tradizionale e vendemmia tardiva, mantengono un'acidità elevata e mostrano una reiquilibratura del profilo polifenolico, legato ad una diminuzione dei tannini e un aumento dei flavonoli (Corso *et al.* 2013).



Figura 1.9: Tecnica della DMR eseguita su cv di Moscato Giallo. (Bonera, 2014)

1.5.2 TECNICHE DI APPASSIMENTO

I grappoli maturi possono essere destinati ad un appassimento naturale o ad un appassimento forzato. È possibile distendere al sole le uve raccolte dopo una normale vendemmia, affinché le uve vadano incontro ad un processo di disidratazione. Nelle uve sottoposte ad appassimento l'evaporazione dell'acqua è maggiore e quindi aumenta la concentrazione delle sostanze nella polpa e nella buccia degli acini. Talvolta le uve sono lasciate appassire *in planta* con un ritardo eccezionale della vendemmia come nel caso degli "Ice Wine" o per l'Aleatico di Gradoli per il quale si parla di appassimento naturale (Il mondo dei Sommelier, 2012), ma nella maggior parte dei casi, soprattutto per la produzione di vini passiti, l'appassimento viene eseguito ponendo le uve su stuoie collocate a terra quando le condizioni di insolazione sono buone, o vengono protette con l'ausilio

di teli nelle ore notturne o da improvvise piogge. Questa tecnica è applicata in ambienti caratterizzati da clima soleggiato e caldo nella fase post-vendemmia. Un esempio tipico è dato dal Moscato di Pantelleria o dal Greco di Bianco in Calabria oltre che pochissimi altri vini, dove la concentrazione zuccherina nelle uve sfiora il 40%. In altri casi l'appassimento naturale viene svolto in locali appositi dove le uve sono collocate su cassettoni di legno o di plastica (Figura 1.10) sovrapponibili tra loro in modo da garantire un buon ricircolo dell'aria. Questi locali sono denominati "fruttai" e devono essere mantenuti asciutti e ben ventilati per consentire un corretto appassimento delle uve e limitare l'insorgenza di marciumi che danneggerebbero il prodotto finale (Il mondo dei Sommelier, 2012). Un altro sistema è quello di collocare le uve su una parete verticale costituita da una rete di fili posti a distanza tra loro in modo tale da favorire il giusto arieggiamento, e di appendervi quindi i grappoli sui fili come avviene tuttora a Fregona per la produzione del famoso Torchiato di Fregona. Sicuramente questo tipo di ricovero delle uve, come anche nel caso dei fruttai, è più usato in zone con temperature più fresche (es. Valpolicella o Alto Adige) dove le uve appassiscono per tempi molto più lunghi, arrivando ad alcuni mesi (es. Amarone della Valpolicella).



Figura 1.10: Appassimento Moscato giallo in cassette di plastica. (Lavinium. Com)

Qualora si voglia ridurre il rischio di marciume dei grappoli o il periodo di appassimento delle uve, ottenendo però una concentrazione zuccherina sempre molto elevata, si interviene con l'appassimento artificiale o "forzato", che avviene in ambienti artificiali grazie all'ausilio di sistemi elettromeccanici di ventilazione,

di riscaldamento e di deumidificazione dell'aria. Questi sistemi accelerano il processo di disidratazione degli acini e determinano l'appassimento delle uve (Scienza, 2006). Risulta di primaria importanza analizzare il processo in termini di trasferimento di materia, ossia di acqua rimossa dall'uva, per capire in termini unitari la quantità d'acqua rilasciata dall'acino. In questo tipo di appassimento l'aria gioca un ruolo essenziale nell'essiccamento quale portatrice di calore ed asportatrice del vapore acqueo proveniente dall'acino. L'appassimento dell'uva è pertanto un'applicazione particolare delle tecnologie di essiccazione e gli aspetti fisici coinvolti sono quelli che caratterizzano i processi di disidratazione dei prodotti alimentari (Morale, 1998). Appaiono evidenti i vantaggi dell'utilizzo dei sistemi di forzatura nell'ottica del controllo sia dell'ambiente di appassimento, sia di fenomeni indesiderati, come lo sviluppo di patogeni, e della modulazione della velocità di traspirazione. Il deficit di pressione di vapore dell'acqua tra l'interno del frutto e l'ambiente che lo circonda definisce la velocità con cui l'acqua evapora. La velocità di disidratazione può influenzare importanti processi metabolici con conseguenze sulla composizione delle bacche e la qualità dei vini (Montaldo G., 2005). La temperatura condiziona i processi metabolici nell'uva posta ad appassire: l'attività respiratoria raggiunge la massima attività a 35°C, da ciò si può quindi intuire come le temperature elevate possano portare, oltre che un rapido appassimento, anche una maggiore attività respiratoria, che ha come effetto principale il consumo di alcuni substrati come zuccheri e l'acido malico (Bonghi et al., 2012). Temperature attorno ai 60°C possono inibire le reazioni che essi catalizzano. La ventilazione intesa come quantità d'aria in relazione con la temperatura può portare a risultati interessanti in base alla sua gestione: ad esempio a 20°C la variazione di ventilazione può portare notevoli modificazioni alla disidratazione, accelerandone il processo, mentre a 10°C anche raddoppiando la quantità di aria ventilata, le velocità di appassimento non subiscono variazioni.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi di laurea è di verificare se la tecnica DMR sia in grado di modificare il profilo aromatico delle uve Moscato giallo.

Le uve del Moscato giallo sono utilizzate per produrre il Fior d'Arancio dei colli euganei, che rappresenta nelle sue tre versioni (secco, spumante, passito) il fenomeno enologico più attuale nel panorama vitivinicolo del Veneto centrale. Il Fior d'Arancio ha ricevuto la D.O.C.G. nel vicino 2010, dopo aver ottenuto la D.O.C. nel 1994 (Borin *et al.*, 2013). Il vitigno dal quale si ricava questa chicca enologica è coltivato da moltissimo tempo nei colli euganei sotto nomi e sinonimi diversi (Moscato di Arquà, Moscato Sirio, Moscato Fior d'Arancio). Si ritiene sia stato importato e diffuso in Italia dai mercanti veneziani nel XIII° sec., quando il conte Pizzoni Ardemani commissionò al vivaista Agostino Martin la ricerca delle varietà più particolari di vite conosciute all'epoca, e questi propose il vitigno Moscato Giallo sostenendo che il profumo di quelle uve fosse simile a quello esalato dai fiori delle piante contenute nell'agrumeto del signor conte (Borin *et al.* 2013). Fu da allora che tale vitigno iniziò ad essere chiamato Fior d'Arancio in tutto il circondario dei colli euganei.

La resa massima dell'uva in vino non deve essere superiore al 65% per tutti i vini. Qualora la resa uva/vino superi i limiti di cui sopra, ma non il 75%, l'eccedenza non ha diritto alla denominazione d'origine. Oltre detto limite invece decade il diritto alla denominazione d'origine per tutta la partita. Per la tipologia "Colli Euganei Fior d'Arancio" o "Fior d'Arancio Colli Euganei" passito la resa massima dell'uva in vino non deve superare il 40 %. Il vino a denominazione di origine controllata e garantita "Colli Euganei Fior d'Arancio" o "Fior d'Arancio Colli Euganei" può essere elaborato nella tipologia passito purché le uve fresche siano sottoposte ad appassimento naturale fino a portarle a un titolo alcoolometrico volumico naturale minimo non inferiore al 15,50%. L'appassimento può essere condotto anche con l'ausilio d'impianti di condizionamento ambientale purché operanti a temperature analoghe a quelle riscontrabili nel corso dei processi tradizionali di appassimento. Il vino "Colli Euganei Fior d'Arancio" o "Fior d'Arancio Colli Euganei" passito non può essere immesso al consumo prima di un periodo di maturazione e affinamento di almeno un anno a decorrere dal 1° novembre dell'anno di produzione delle uve; durante tale affinamento, che precede la messa in bottiglia, il vino passito può compiere una lenta fermentazione che si

attenua nei mesi freddi. Per quanto riguarda la coltivazione particolari attenzioni sono prestate alla carica di gemme e alla vendemmia; la maturazione è attentamente monitorata dai tecnici del consorzio di tutela in funzione della tipologia di Fior d'Arancio che si vuole ottenere. In cantina molta cura viene prestata a diraspatura, a pigiatura e a pressatura, in quanto un approccio sbagliato verso il grappolo può portare ad un arricchimento di componenti vegetali che fuoriescono per rottura del rachide, per lacerazione della buccia e per la lesione della capsula gelatinosa dei vinaccioli (Borin *et al.*, 2013).

Considerando l'odierna importanza riservata alle varietà locali di vite, scopo della tesi è stato quello di analizzare i cambiamenti biochimici e molecolari a carico del profilo aromatico in bacche della cv. Moscato Giallo, registrati a seguito dell'applicazione della DMR in confronto a TH (Tecnological Harvest), VT (vendemmia Tardiva), dell'appassimento del 10 e del 30% e della combinazione DMR-appassimento per valutare, a livello molecolare e metabolico, gli effetti delle diverse tecniche di gestione delle uve sui processi metabolici responsabile dell'acquisizione delle caratteristiche qualitative ed organolettiche delle uve e dei vini.

La ricerca ha preso in considerazione la cv. Moscato Giallo (Fior d'Arancio DOCG), sia per le sue peculiarità olfattive, sia per la predisposizione all'applicazione di differenti tecniche tradizionali di gestione delle uve in vendemmia e post-vendemmia, al fine di modificare il tipico profilo olfattivo.

3.MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALE VEGETALE E TRATTAMENTI

Le prove sono state condotte nel 2013 presso l'azienda vitivinicola Veronese (Valnogaredo di Cinto Euganeo, Padova); il materiale vegetale utilizzato in questo studio è prelevato da piante di *Vitis vinifera* L. cv Moscato Giallo (con orientamento nord/sud) innestate sul portinnesto KOBER 5BB ed allevate secondo il modello Guyot arcato. L'esperimento è stato condotto su un totale di 360 piante, disposte in quattro filari da 90 piante ciascuno. I quattro filari sono stati divisi in 3 gruppi da 30 piante ciascuno, in modo da avere tre distinti pool di piante da cui prelevare il materiale da utilizzare per le repliche biologiche. I campionamenti sono stati effettuati con cadenza settimanale, a partire dal 28 Agosto 2013 fino alla raccolta della DMR il 2 Ottobre 2013. Le uve sono state raccolte suddividendole in quattro diverse tesi (Figura 3.1): 1) uve raccolte alla maturazione tecnologica (TH); 2) uve raccolte a maturazione tecnologica e portate in appassimento al 30% (APP); 3) raccolta DMR da viti sottoposte al taglio dei tralci dopo una perdita del 10% del loro peso e portate in appassimento fino al 30%; 4) raccolta DMR da viti sottoposte al taglio dei tralci fruttiferi. In ogni campionamento sono stati raccolti 15 grappoli, dai quali sono stati prelevati 100 acini per le analisi biochimiche e 50 per quelle molecolari, congelati e stoccati a -80°C dopo il campionamento. Sono stati inoltre raccolti 30 grammi di acini, dai quali sono state separate le bucce, per le analisi metabolomiche. Durante i vari campionamenti sono state eseguite le analisi sensoriali delle uve come strumento supplementare per seguire il profilo della dinamica di maturazione ed evidenziare differenze sostanziali. La tesi di controllo, la tesi DMR, la tesi di appassimento e la DMR+APP sono state portate a vinificazione per successiva analisi sensoriale e metabolomica.

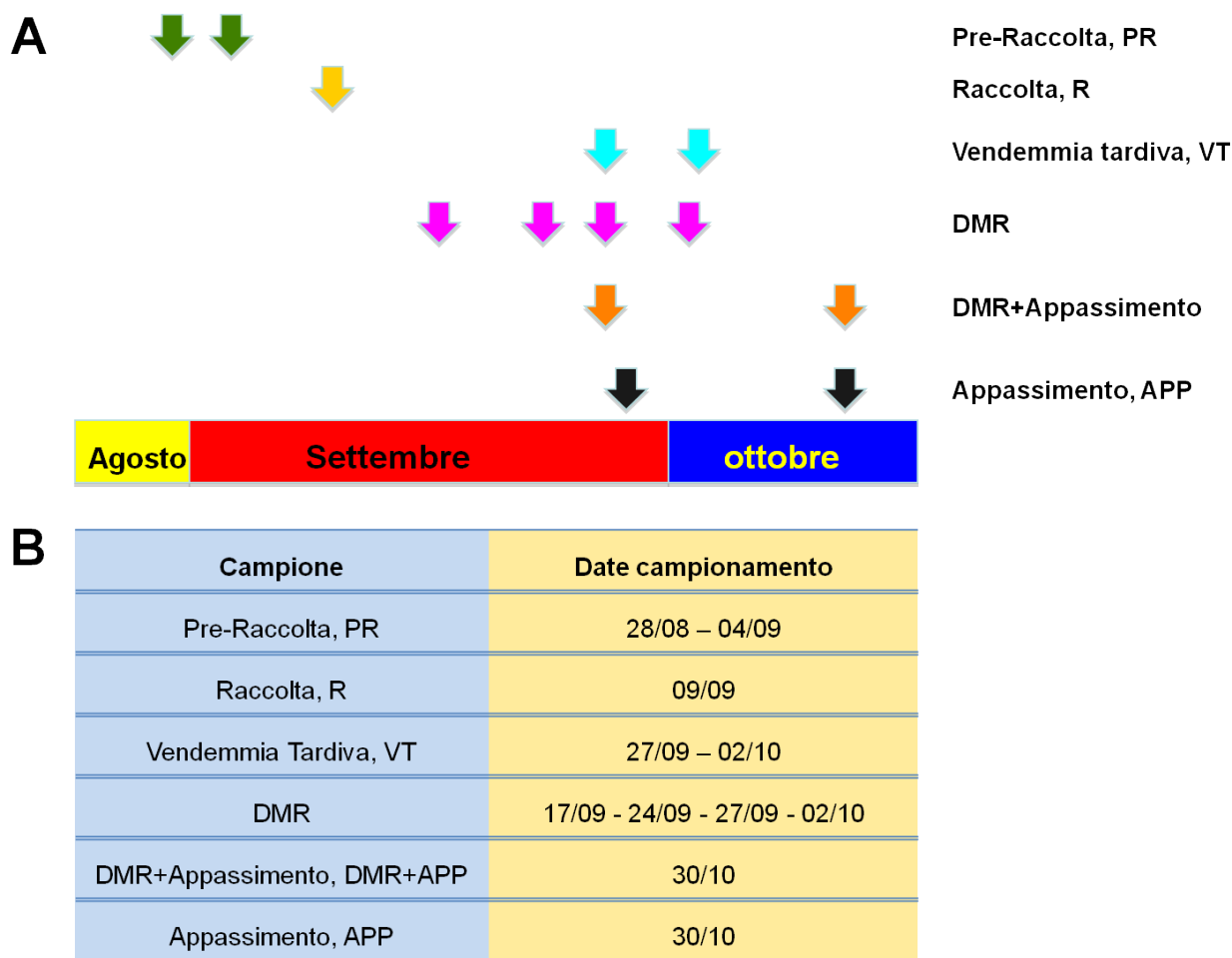


Figura 3.1 Rappresentazione schematica del piano sperimentale. A) rappresentazione cronologica dei campionamenti. B) Schematizzazione delle tesi considerate.

3.2 ANALISI BIOCHIMICHE E SENSORIALI SULLE UVE

I livelli di acidità titolabile, il grado zuccherino ($^{\circ}$ Brix) e il quantitativo di polifenoli totali sono stati ottenuti mediante lo strumento WineScanTMBasic (FOSS, Italia). L'analisi sensoriale, secondo il protocollo messo a punto da Cargnello (1993, 1997) sulle bacche in fase di maturazione e surmaturazione ha preso in considerazione le tre porzioni principali dell'acino, ovvero polpa, buccia e vinaccioli. La procedura, applicata su 3 acini prelevati da ogni campione analizzato, prevede che si parta dall'esame visivo e tattile: comprimendo l'acino tra le dita viene valutata la consistenza meccanica, che diminuisce con il procedere del processo di maturazione; si prende poi in esame il colore della buccia che

passa dal verde al giallo ambrato. Si passa quindi alla degustazione della polpa, che prevede la sua estrazione succhiando l'acino tra lingua e palato, separando la buccia e i vinaccioli che sono successivamente conservati; la polpa viene poi schiacciata con il fine di estrarne il succo, dal quale vengono valutate la dolcezza, l'acidità, gli aromi erbacei, floreali e fruttati (la cv di Moscato Giallo è molto ricca di terpeni che andranno a formare il bouquet di aromi primari nel vino). La degustazione della buccia prevede la sua masticazione compiendo un numero di movimenti mascellari compreso tra 10 e 15, successivamente viene valutata l'attitudine alla triturazione delle uve, che è maggiore nelle uve mature. L'analisi sensoriale si conclude con l'esame visivo e gustativo dei vinaccioli, la cui importanza non dev'essere sottovalutata, poiché dalla valutazione del loro colore possiamo percepire il loro stato di maturazione, mentre mordendoli si valuta la loro durezza, che è maggiore nei vinaccioli maturi.

3.3 ANALISI MOLECOLARI (ESTRAZIONE RNA, DNAsi e sintesi del cDNA)

L'RNA totale è stato estratto seguendo il protocollo descritto da Ziliotto *et al.*, (2012). Questo protocollo prevede la macinazione in un mortaio in presenza di azoto liquido di quattro bacche intere, dalle quali sono stati eliminati i semi. Il tessuto macinato è stato poi aggiunto a 20ml di tampone d'estrazione per l'RNA e il tutto mantenuto in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora. L'omogenato è stato poi filtrato con una siringa da 50 ml contenente uno strato di carta da filtro qualitativo per precipitati gelatinosi o pesanti (Whatmann 4) e uno strato con carta in fibra di vetro (Whatmann GF/B). Il filtrato ottenuto è stato posto in provette Corex da 30 ml alle quali è stato aggiunto un volume di isopropanolo freddo. La soluzione è stata posta a -20°C per 90 minuti al fine di permettere la precipitazione degli acidi nucleici. La soluzione è stata successivamente

centrifugato a 5500 rpm per 20 minuti a 4°C ed il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, asciugato sotto vuoto e risospeso in eppendorf da 2mL con 1 ml di 10 mM Tris-EDTA pH 7,6. La sospensione è stata incubata per 30 minuti in ghiaccio e quindi centrifugata per 20 minuti a 10000g a 4°C.

Il surnatante, una volta prelevato, è stato trasferito in nuove eppendorf da 1.5 mL, alle quali è stato aggiunto ½ volume di TBE e ½ volume di LiCl 8M. La soluzione è stata poi fatta precipitare a 4°C overnight. Il pellet, dopo una centrifugazione a 10000g per 30 minuti a 4°C è stato lavato con etanolo 70% a 4°C, asciugato e risospeso in 100 µl di acqua DEPC. Successivamente l'RNA totale è stato quantificato mediante lo strumento NanoDrop-ND 1000 e la qualità dell'estratto è stata controllata tramite corsa su gel di agarosio all'1%.

Per quanto riguarda la DNAsi, quaranta microgrammi di RNA totale sono stati trattati in un volume totale di 10 µl con una Unità di RQ1 RNasi-Free DNasi (Promega, Madison WI, USA), 4 Unità di rRNasin® RNasi inibitore (Promega, Madison WI, USA), in 1X Reaction buffer a 37°C per 15 minuti in un termociclatore Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

L'RNA è stato purificato dal mix di reazione con una precipitazione prima con cloroformio-alcool isoamilico (24:1) e poi con 1/10 di NaOAc 3M (pH 4,8) e ugual volume di isopropanolo e lasciando -80°C per 1 ora. Il pellet è stato lavato con ETOH 70% ed è stato risospeso in 50 µl di acqua RNasi-Free. La quantità di RNA totale è stata valutata mediante comparazione delle letture spettrofotometriche a 230, 260 e 280 nm. L'integrità dell'RNA e l'assenza di DNA genomico sono stati valutati mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%.

La sintesi del cDNA a singolo filamento è stata effettuata a partire da 1 µg di RNA precedentemente trattato con DNAsi, in un volume finale di 20 µl. La reazione è

stata condotta in presenza di 1 U di RNAsi (RNAsi inibitore) (Amersham), 200 U di M-MLV (Promega), tampone M-MLV (Promega) (1X), oligo-dT (2,5 μ M), dNTP (1 mM). Il profilo termico utilizzato prevede tre diversi stadi: il primo a 70° C per 5 minuti, il secondo a 37°C per 90 min e l'ultimo a 90 °C per 5 min.

3.3.2 Analisi dei trascritti attraverso RT-PCR

La quantificazione dei geni tramite real time-PCR è stata svolta in triplicato in un volume finale di 15 μ l usando il SYBR® Green RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) con 0.6 μ l di primers specifici (forward e reverse), 1 μ l di cDNA e 7,5 μ l di 2x SYBR Green RT-PCR Master mix. Il mix di reazione è stato amplificato con lo strumento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nelle seguenti condizioni: uno step di attivazione iniziale a 50°C per 2 minuti e a 95°C per 10 minuti, 40 cicli ognuno dei quali composto da 15 secondi di denaturazione a 95°C, 30 secondi di appaiamento a 64°C. Come gene di riferimento è stata utilizzata l'ubiquitina (UBI). I dati sono stati elaborati utilizzando il foglio elettronico di Excel Q-Gene progettato da Simon et al. (2003), modificato secondo il metodo del $\Delta\Delta$ Ct (Pfaffl et al., 2001).

3.4 ANALISI DEGLI AROMI

3.4.1 Estrazione e concentrazione dei componenti volatili di fermentazione e varietali

Ad un volume di vino di 50 ml sono stati addizionati 400 ml di una soluzione di 1-eptanolo 445 mg/l come standard interno ed il campione è stato estratto con 15 ml di diclorometano ripetendo l'estrazione per 3 volte. Le fasi organiche sono state riunite e lavate con una soluzione di sodio bicarbonato al 5%. La soluzione è stata disidratata mediante sodio solfato anidro, concentrata a 3 ml mediante

distillazione con colonna di Vigreux, infine portata a 0.5 ml mediante un flusso di azoto.

3.4.2 Analisi GC/MS

È stato utilizzato un sistema Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) costituito da gascromatografo HP 5890 equipaggiato con colonna in silice fusa HP Innowax (Supelco, Milano) (30 m × 0.25 mm; spessore film 0.25 mm) interfacciato ad uno spettrometro di massa HP5971A ed un autocampionatore 6890 Series Injector.

Condizioni sperimentali: temperatura dell'iniettore 200 °C; modalità di iniezione splitless; volume di campione iniettato 1 ml; temperatura transfer line 280 °C; gas di trasporto He a pressione costante 12 psi.

Programma di temperatura del forno per l'analisi dei composti volatili di fermentazione: 4 min a 38 °C, incremento di 5 °C/min fino a 180 °C, 10 °C/min fino a 230 °C, 10 min a 230 °C.

Programma di temperatura del forno per l'analisi dei composti volatili varietali: 1 min a 32 °C, 2 °C/min fino a 160 °C, 3 °C/min fino a 230 °C, 5 min a 230 °C.

L'identificazione dei composti è stata eseguita mediante confronto con gli spettri di frammentazione del database NIST98 (Versione 1.6) e del database ESTRATTI del laboratorio chimico CRA-VIT.

3.5 ANALISI SENSORIALI


I vini ottenuti dalle micro-vinificazioni sono stati degustati attraverso la scheda di degustazione messa a punto da Bonera, Cargnello, Teo e Tonelli (Fig. 3.1). Il panel di assaggiatori era composto da esperti e non esperti.

La scheda ha preso in considerazione tre diverse fasi di valutazione: 1) Profilo olfattivo, 2) Valutazione olfattiva, 3) Valutazioni generali

Ai fini di questa tesi sono stati presi in considerazione solo i primi due gruppi di parametri.

Nel primo punto della scheda sono stati presi in esame i descrittori più comuni per l'analisi sensoriale del profilo olfattivo di un vino, che sono l'aromaticità, il fruttato, il floreale, l'erbaceo, il fragrante e lo speziato; la scala di valutazione va da 1 a 10. Alla scheda sono stati aggiunti dei sentori specifici normalmente associati al Moscato Fior d'Arancio DOCG, tra questi ricordiamo uva moscata, limone, arancia, albicocca, ananas, banana, glicine, rosa, tiglio, vaniglia, cannella. Proseguendo si è svolta la "valutazione olfattiva" generale del vino, utilizzando parametri che riassumono la qualità del vino, quali intensità, complessità, qualità e livello edonico; la valutazione dei parametri è stata sempre fatta usando una scala da 1 a 10.

Nella terza ed ultima sezione della scheda l'analisi è stata estesa alla parte visiva e gusto-olfattiva prendendo in considerazione i parametri relativi a colore, gusto, maturità fenolica, persistenza retro-olfattiva, e dando un giudizio complessivo del prodotto in degustazione.

		UVE DI MOSCATO BIANCO (DPR 30.11.2011) SOTTOPOSTE A VARIE "DOPPIA MATURAZIONE RAGIONATA" (DMR) ED A VARI "APPASSIMENTI" IN FRUTTAIO		
SCHEDA DEGUSTAZIONE DESCRITTIVA¹				
PRODOTTO:		DATA:		
ASSAGGIATORE:				
PROFILO OLFATTIVO				
	1	5	10	NOTE
AROMATICITA'	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/> UVA MOSCATA <input type="checkbox"/> LIMONE <input type="checkbox"/> ARANCIA <input type="checkbox"/> ALBICOCCA <input type="checkbox"/> ANANAS <input type="checkbox"/> BANANA <input type="checkbox"/> GLICINE <input type="checkbox"/> ROSA <input type="checkbox"/> TIGLIO <input type="checkbox"/> VANIGLIA <input type="checkbox"/> CANNELLA
FRUTTATO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
FLOREALE (glicine, rosa)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
ERBACEO (tiglio, muschio)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
FRAGRANTE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
SPEZIATO (vaniglia, cannella)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
TIPICITA'	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
NOTE:				
VALUTAZIONE OLFATTIVA				
	1	5	10	NOTE
Intensità	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Complessità	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Qualità	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
LIVELLO EDONICO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
ALTRE VALUTAZIONI:				
	1	5	10	NOTE
Colore	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Gusto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Maturità fenolica	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Persistenza retro olfattiva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
GIUDIZIO COMPLESSIVO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
VALORE INTRINSECO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

¹Da Bonera, 2013-2014, modificata da Cargnello, Tonielli, Bonghi, Teo e Bonera, 2014

Figura 3.1: Scheda di degustazione per Moscato: la seguente scheda è stata utilizzata per le analisi sensoriali delle micro-vinificazioni svolte per il lavoro di analisi di variazioni del profilo aromatico in Moscato giallo.

4. RISULTATI

4.1 ANALISI BIOCHIMICHE

L'evoluzione della contenuto zuccherino (Figura 4.1) mostra un aumento in tutte le tesi considerate dopo la vendemmia tecnologica anche se con modalità differenti. Nel caso della vendemmia tardiva (VT), dopo l'aumento iniziale, i valori del secondo campionamento non si discostano significativamente da quelli del primo simili. Per quanto concerne i campioni sottoposti a DMR si osserva, invece, un progressivo aumento in tutti i prelievi effettuati. La DMR+APP 30% mostra una concentrazione di solidi solubili totali molto elevata, ma più bassa di quella osservata nella tesi APP 30%: Per quest'ultima sono stati osservati i valori più elevati di questo parametro.

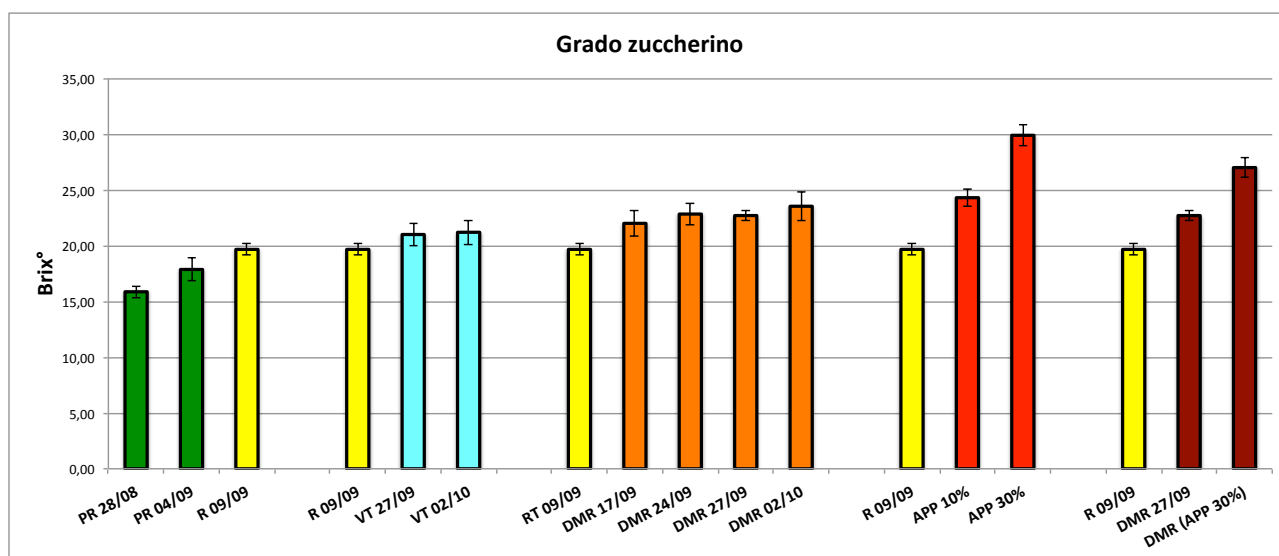


Figura 4.1: Effetto delle diverse tecniche applicate sul contenuto zuccherino della bacca di Moscato Giallo. Le barre indicano il quantitativo in Brix° di solidi solubili presenti in concentrazione nelle bacche misurato su tre repliche. Sull'asse delle ascisse, accanto ad ogni campione analizzato, è indicata la data di campionamento; PR (Pre Raccolta), R (raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

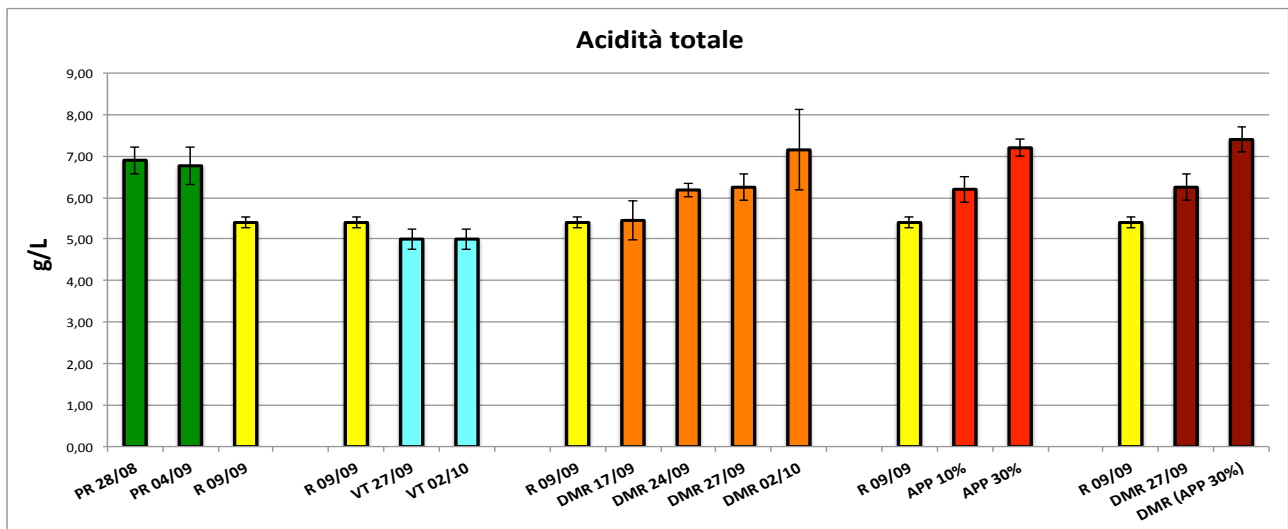


Figura 4.2: Effetto delle diverse tecniche applicate sul contenuto di acidità titolabile della bacca di Moscato giallo. Le barre indicano il quantitativo in grammi su litro di acidi totali in concentrazione nella bacca misurato su tre repliche. Sull'asse delle ascisse, accanto ad ogni campione analizzato, è indicata la data di campionamento; PR (Pre Raccolta), R (raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

Il grafico relativi all'acidità totale (Figura 4.2) mostra una sua diminuzione significativa dalla fase di pre-raccolta (PR) alla Raccolta (R). Si osserva, invece, un significativo aumento del suo contenuto nelle uve raccolte a varie fasi della DMR e in quelle sottoposte ad appassimento, che presentano valori più elevati rispetto a quelle della tesi R e VT.

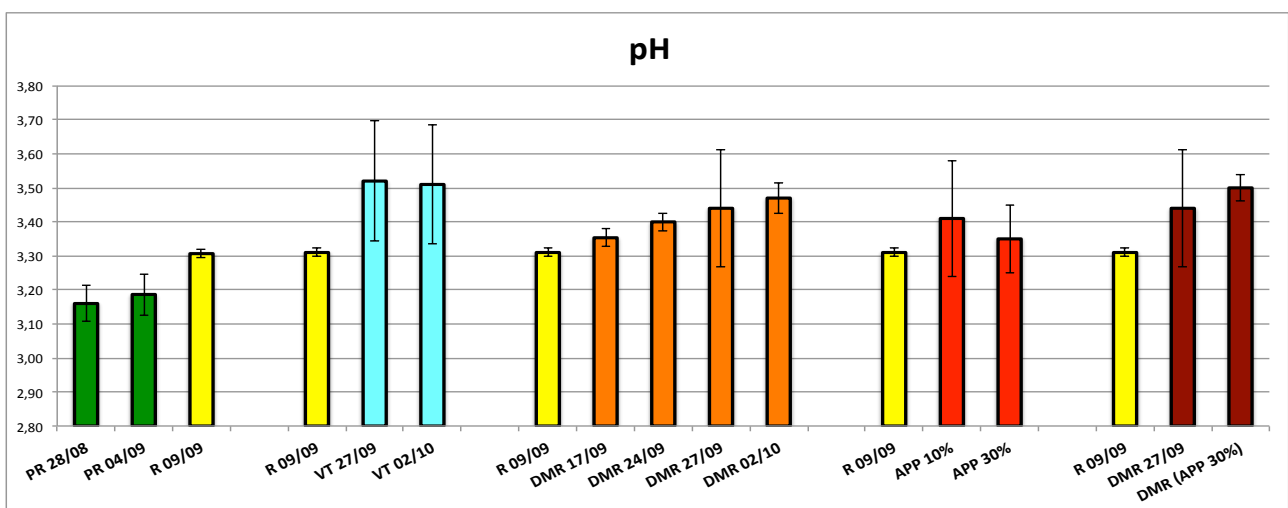


Figura 4.3: Effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di pH della bacca di Moscato giallo. Le barre indicano il livello di pH all'interno degli acini misurato su tre repliche. Sull'asse delle ascisse, accanto ad ogni campione analizzato, è indicata la data di campionamento; PR (Pre Raccolta), R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

Il livello di pH (Figura 4.3) dalla fase di pre-raccolta mostra un andamento crescente in tutti i campioni. L'aumento più considerevole è stato registrato nella tesi VT, nonostante la deviazione standard sia particolarmente elevata. Il campione sottoposto ad appassimento mostra valori di pH inferiori, in particolare negli ultimi due campionamenti, se confrontato con quelli dei campioni sottoposti a VT e DMR. Il valore di pH del campione DMR+APP 30%. è risultato particolarmente elevato.

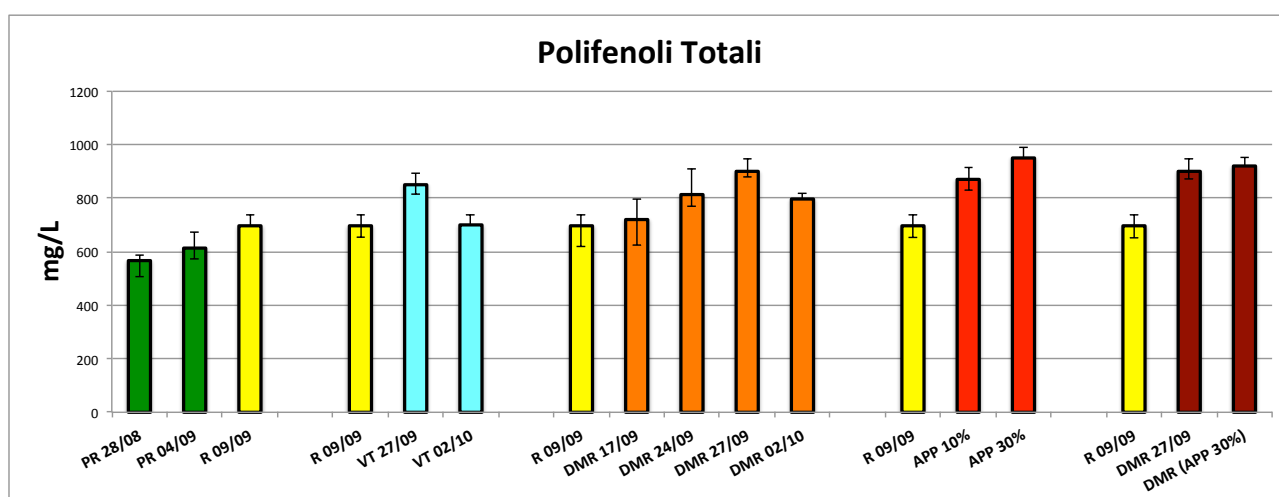


Figura 4.4: Effetto delle diverse tecniche applicate sul contenuto di polifenoli totali della bacca di Moscato giallo. Le barre indicano il contenuto in milligrammi su litro di polifenoli totali presenti nelle bacche misurato su tre repliche. Sull'asse delle ascisse, accanto ad ogni campione analizzato, è indicata la data di campionamento; PR (Pre Raccolta), R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

Il contenuto dei polifenoli totali (Figura 4.4) stato mostra un andamento crescente dalla fase di PR fino al momento della raccolta. Per quanto attiene alla VT, il primo campionamento ha mostrato un nuovo aumento dei polifenoli totali, mentre nel secondo campione il loro quantitativo diminuisce a un livello pari a quello osservato nel campione di R. Nelle bacche soggette a DMR si osserva un aumento costante della contenuto di polifenoli totali nelle prime tre settimane di campionamento, per poi mostrare una diminuzione nell'ultimo campionamento. L'appassimento al 10% presenta valori molto alti di polifenoli totali che si

avvicinano a quelli osservati nelle bacche DMR campionate il 27/09. L'appassimento al 30% mostra di avere il valore più elevato di polifenoli totali, e molto vicino come valore possiamo notare anche la DMR+ Appassimento al 30%.

4.2 PROFILI DI ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NEI METABOLISMI DI ZUCCHERI, ACIDI E TERPENI.

Le analisi real-time PCR sono state condotte su geni coinvolti nella biosintesi (*VvGLU-INV*) e nel trasporto (*VvSW10-like*) degli zuccheri, nel metabolismo dell'acido malico (*VvME* e *VvPEPC*) e nella biosintesi dei terpeni (*VvDXS1*, *VvFPPS* e *VvGPPS*)..

Per le analisi dei trascritti coinvolti nel trasporto degli zuccheri sono stati presi in considerazione i geni *VvGLU-INV* e la *VvSW10-like*; il gene che codifica per la glucosio invertasi (*VvGLU-INV*, Figura 4.5), importante enzima che regola l'accumulo degli esosi nella bacca (citazione), viene significativamente indotto nei campioni DMR 17/09, mentre negli altri campioni mostra valori di espressione inferiori.

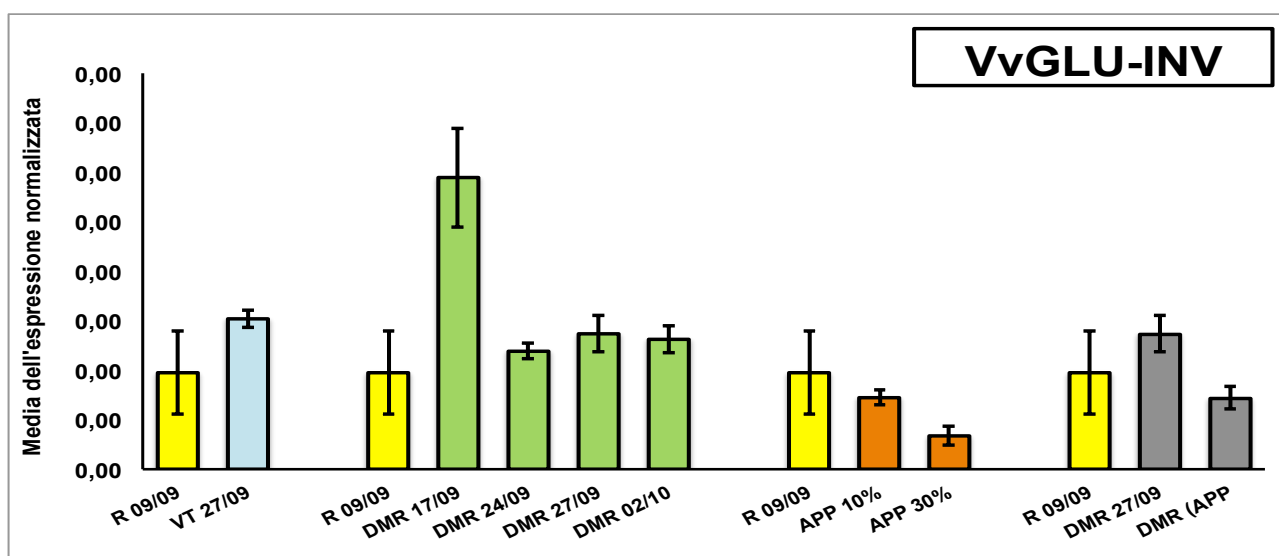


Figura 4.5: Effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di trascritti di *VvGLU-INV* in bacche di Moscato giallo. Le barre rappresentano la media dell'espressione normalizzata dei trascritti, svolta su tre repliche biologiche; R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

Nella Figura 4.6 è riportato il livello di espressione del gene *VvSW10-like*, il cui trascritto è accumulato in modo significativo solo nel campione alla raccolta. Infatti, nei campioni sottoposti ai vari trattamenti testati l'espressione diminuisce in maniera drastica fin dal primo campionamento (riduzione di 8 volte) per poi rimanere pressoché costante.

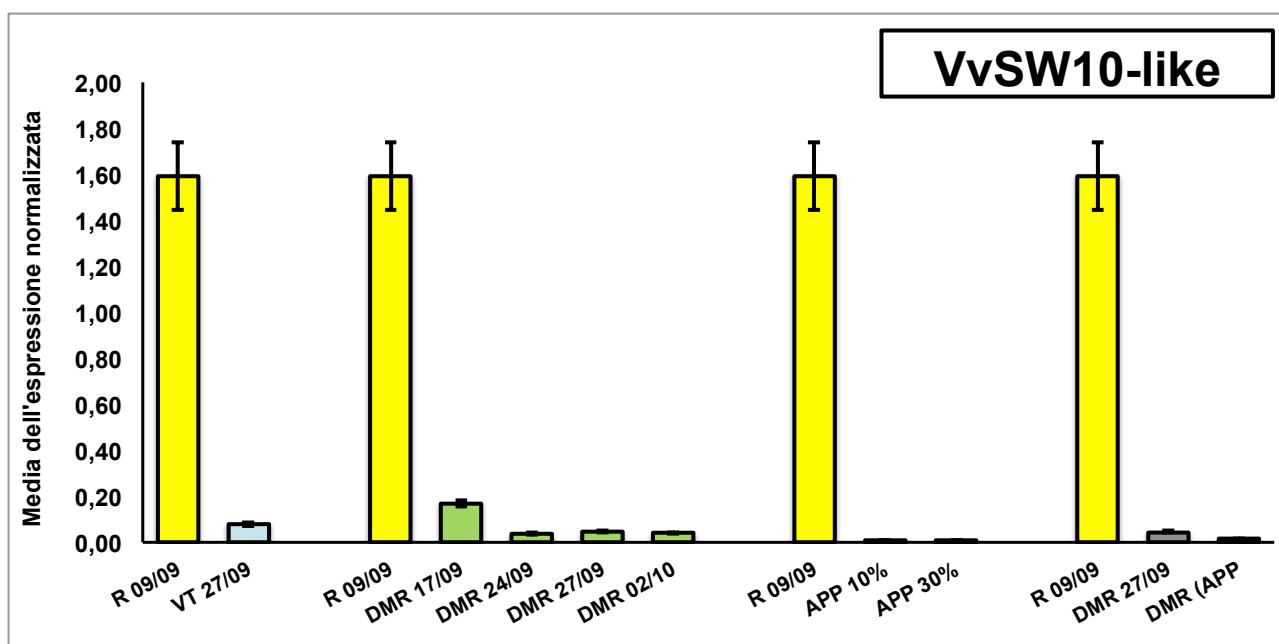


Figura 4.6: effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di trascritti di *VvSW10-like* in bacche di Moscato giallo. Le barre rappresentano la media dell'espressione normalizzata dei trascritti, svolta su tre repliche biologiche; R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

Per quanto riguarda i metabolismi legati agli acidi organici dell'acino, i due geni considerati sono stati quelli che codificano per l'enzima malico (*VvME*; Figura 4.7) e per la fosfoenolpiruvato-decarbossilasi (*VvPEPC*; Figura 4.8).

Il maggiore accumulo dei trascritti di *VvME* è stato registrato al momento della raccolta. In seguito all'applicazione della DMR si assisteva ad una diminuzione progressiva che veniva interrotta da un aumento transiente nel secondo

campionamento. Nelle uve in appassimento si osservava un trend decrementale, anche se di entità maggiore di quello osservato nelle uve sottoposte a DMR.

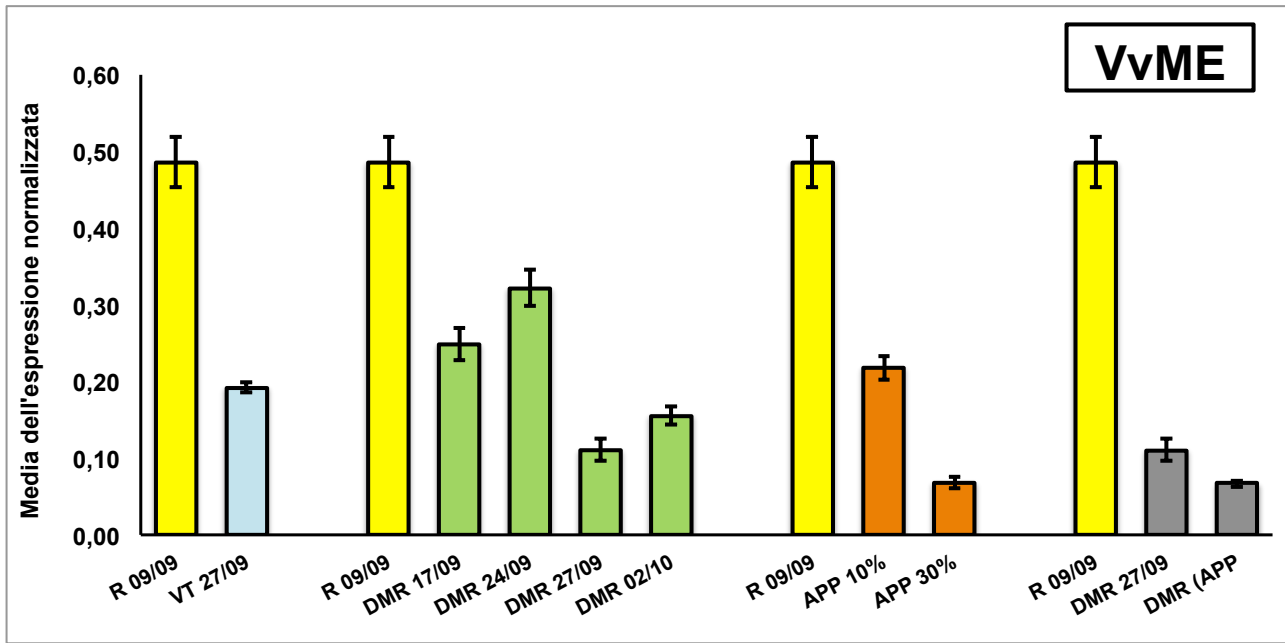


Figura 4.7: Effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di trascritti di *VvME* in bacche di Moscato giallo. Le barre rappresentano la media dell'espressione normalizzata dei trascritti, svolta su tre repliche biologiche; R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

Il gene *VvPEPC* (Figura 4.9) mostra valori elevati di espressione nei campioni R e in quelli relativi ai primi due campionamenti della DMR. Nei campionamenti DMR del 27/09 e 02/10, così come per quelli soggetti a vendemmia tardiva ed appassimento, l'espressione del trascritto *VvPEPC* risultava essere inferiore.

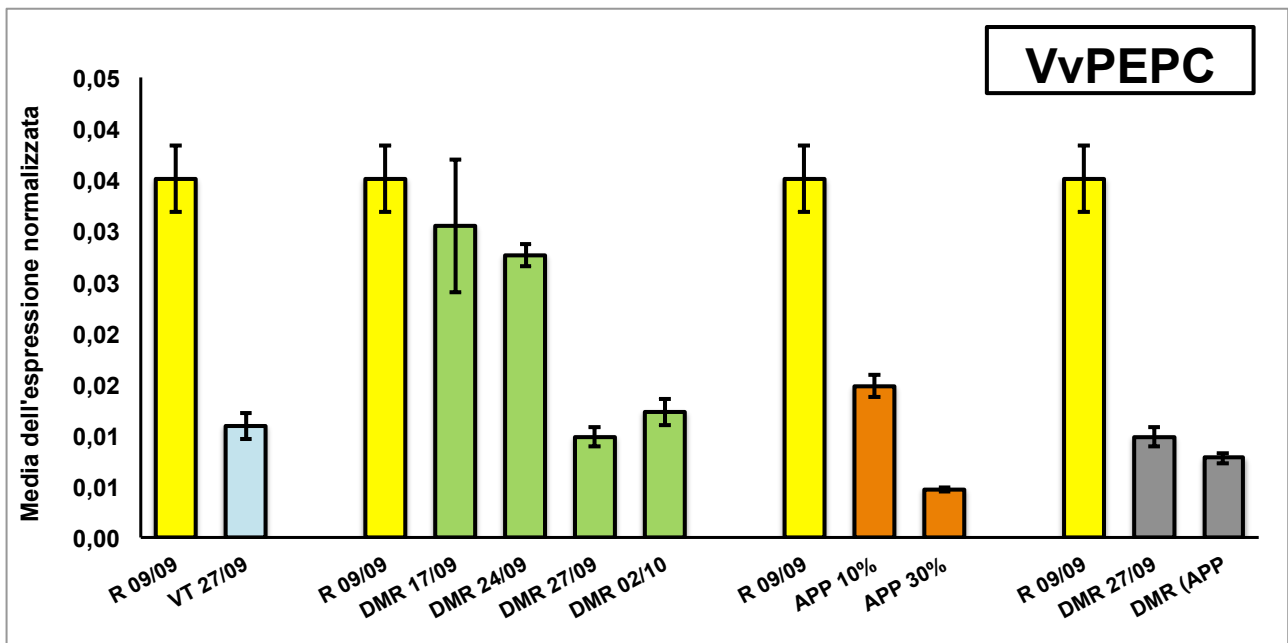


Figura 4.8: Effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di trascritti di *VvPEPC* in bacche di Moscato giallo. Le barre rappresentano la media dell'espressione normalizzata dei trascritti, svolta su tre repliche biologiche; R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

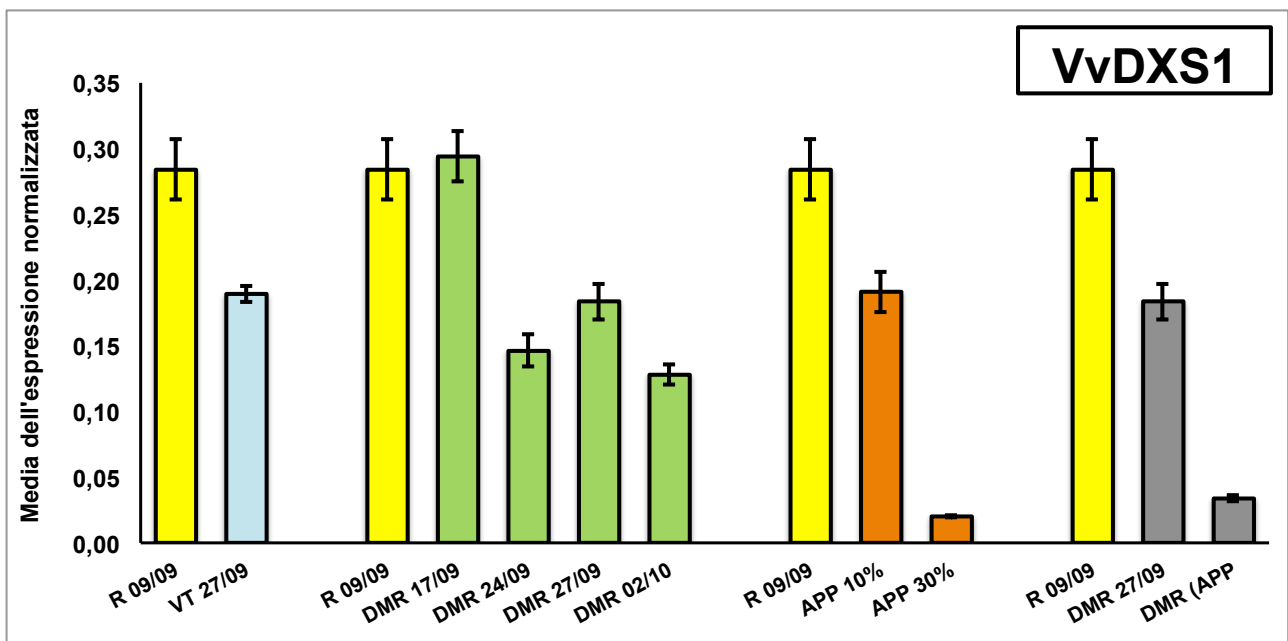


Figura 4.10: Effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di trascritti di *VvDXS1* in bacche di Moscato giallo. Le barre rappresentano la media dell'espressione normalizzata dei trascritti, svolta su tre repliche biologiche; R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

In figura 4.9 viene mostrato l'andamento di espressione del gene *VvDXSI*, coinvolto nelle fasi iniziali della biosintesi degli isoprenoidi. I dati di espressione mettono in evidenza che la DMR, a differenza della VT e dell'APP, manteneva il livello, seppur in modo transiente, dei trascritti osservati alla raccolta. Successivamente anche in DMR si assisteva ad una caduta pressoché continua della trascrizione di *VvDXSI* che comporta, alla fine della fase sperimentale, livelli di trascritto paragonabili tra DMR e APP.

La cinetica di espressione del gene *VvFPFS* viene riportata nella Figura 4.10. Il grafico mostra un'induzione dei livelli di espressione del gene nei campioni DMR raccolti il 17/09, rispetto a quanto osservato per tutte le altre tesi analizzate. Nei campionamenti DMR successivi si osserva una significativa diminuzione dei livelli di espressione del trascritto. La vendemmia tardiva mostra anche in questo caso valori di espressione del gene più elevati rispetto agli appassimenti e alla DMR+ appassimento 30%, ma comunque inferiori alla DMR del primo campionamento.

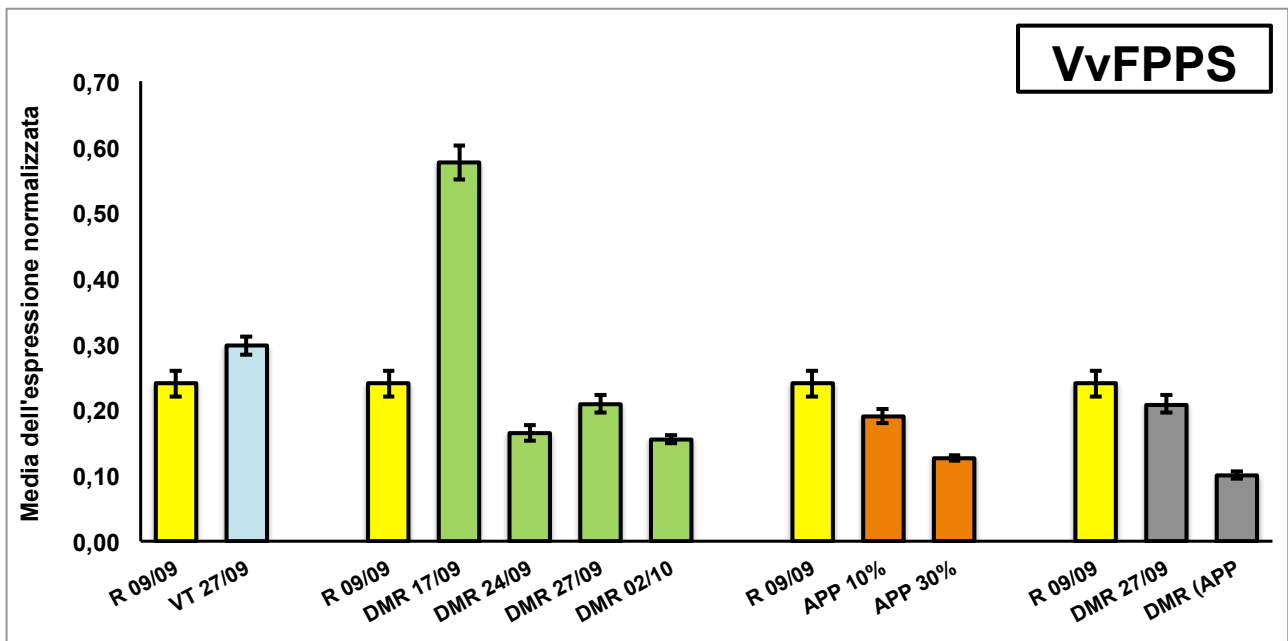


Figura 4.10: Effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di trascritti di *VvFPPS* in bacche di Moscato giallo. Le barre rappresentano la media dell'espressione normalizzata dei trascritti, svolta su tre repliche biologiche; R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

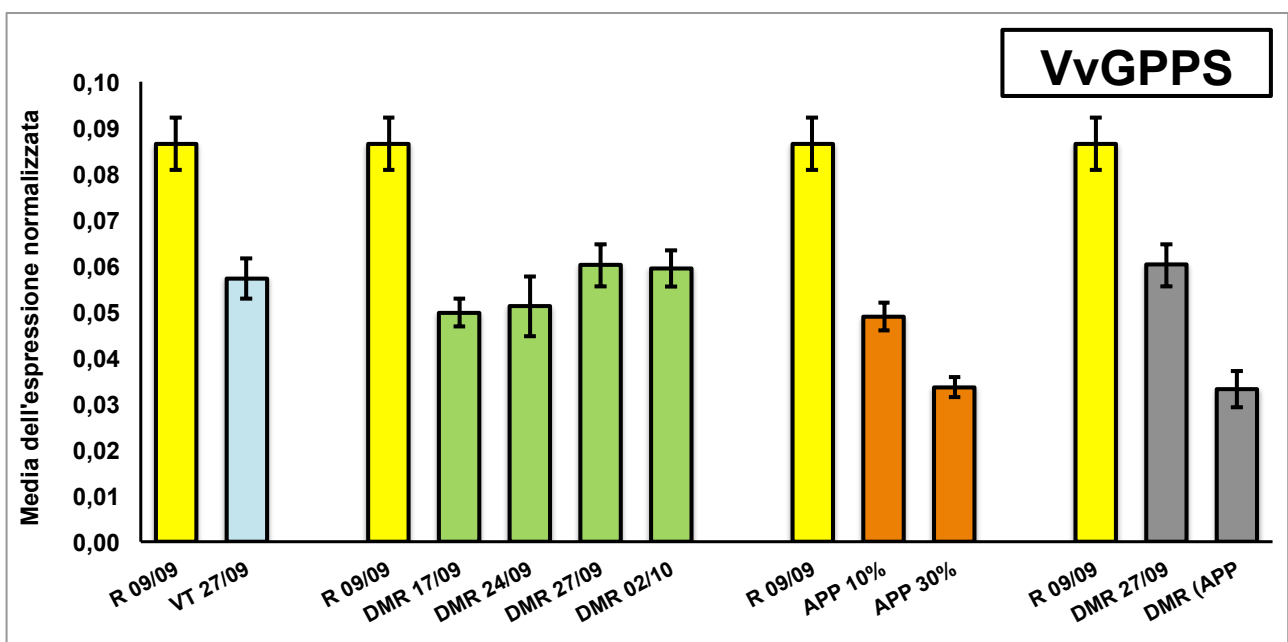


Figura 4.11: Effetto delle diverse tecniche applicate sul livello di trascritti di *VvGPPS* in bacche di Moscato giallo. Le barre rappresentano la media dell'espressione normalizzata dei trascritti, svolta su tre repliche biologiche; R (Raccolta), VT (Vendemmia Tardiva), DMR (Doppia Maturazione Ragionata), APP (Appassimento).

I livelli di espressione più elevati del gene *VvGPPS* si osservano nei campioni alla raccolta, mentre i valori più bassi sono stati riscontrati nei campioni di appassimento al 30% e DMR+appassimento al 30%. I campioni di DMR mostravano livelli di espressione costanti del trascritto, anche se con un lieve aumento tra il campionamento del 24/09 e il 27/09.

4.3 ANALISI DEI METABOLITI AROMATICI SUI VINI

Le analisi metabolomiche condotte sui vini (Figura 4.12) hanno messo in evidenza una diversa influenza delle tecniche applicate sulla concentrazioni totali dei metaboliti appartenenti alle classi di terpeni, norisoprenoidi e benzoidi. In particolare nei vini soggetti DMR, APP e DMR+APP si osservano valori più elevati dei metaboliti rispetto a quanto osservato per la raccolta tradizionale.

Per quanto riguarda i terpeni, si osserva una concentrazione significativamente maggiore di questi metaboliti nei campioni DMR, se confrontati con quelli della R. I campioni sottoposti ad appassimento e DMR + appassimento mostrano concentrazioni di terpeni totali considerevolmente superiori rispetto alle altre tesi e, anche in questo caso, i campioni DMR + APP mostrano valori superiori rispetto a quelli posti in appassimento classico.

La classe dei benzoidi rispetto alla raccolta tradizionale, mostra un aumento in tutte le tesi trattate, con un picco di presenza che si colloca nella tesi di Appassimento.

I norisoprenoidi mostrano invece un andamento più simile alla classe dei terpeni, infatti anche in questo caso le tesi trattate a DMR ci mostrano una maggior produzione di questa classe aromatica rispetto alla tesi di Controllo e di

Appassimento. La DMR ha valori d norisoprenoidi più alti della raccolta tradizionale, mentre la DMR+ Appassimento ha valori più alti rispetto al solo Appassimento.

NB: AGGIUNGERE LE CONSIDERAZIONI RELATIVE ALLE ALTRE DUE CLASSI DI COMPOSTI CONSIDERATE, IL GRAFICO PCA CON LE DESCRIZIONI E LA TABELLA GENERALE (QUEST'ULTIMA LA METTEREI ALL'INIZIO, PRIMA DELL'ISTOGRAMMA ELLA FIG 4.13)

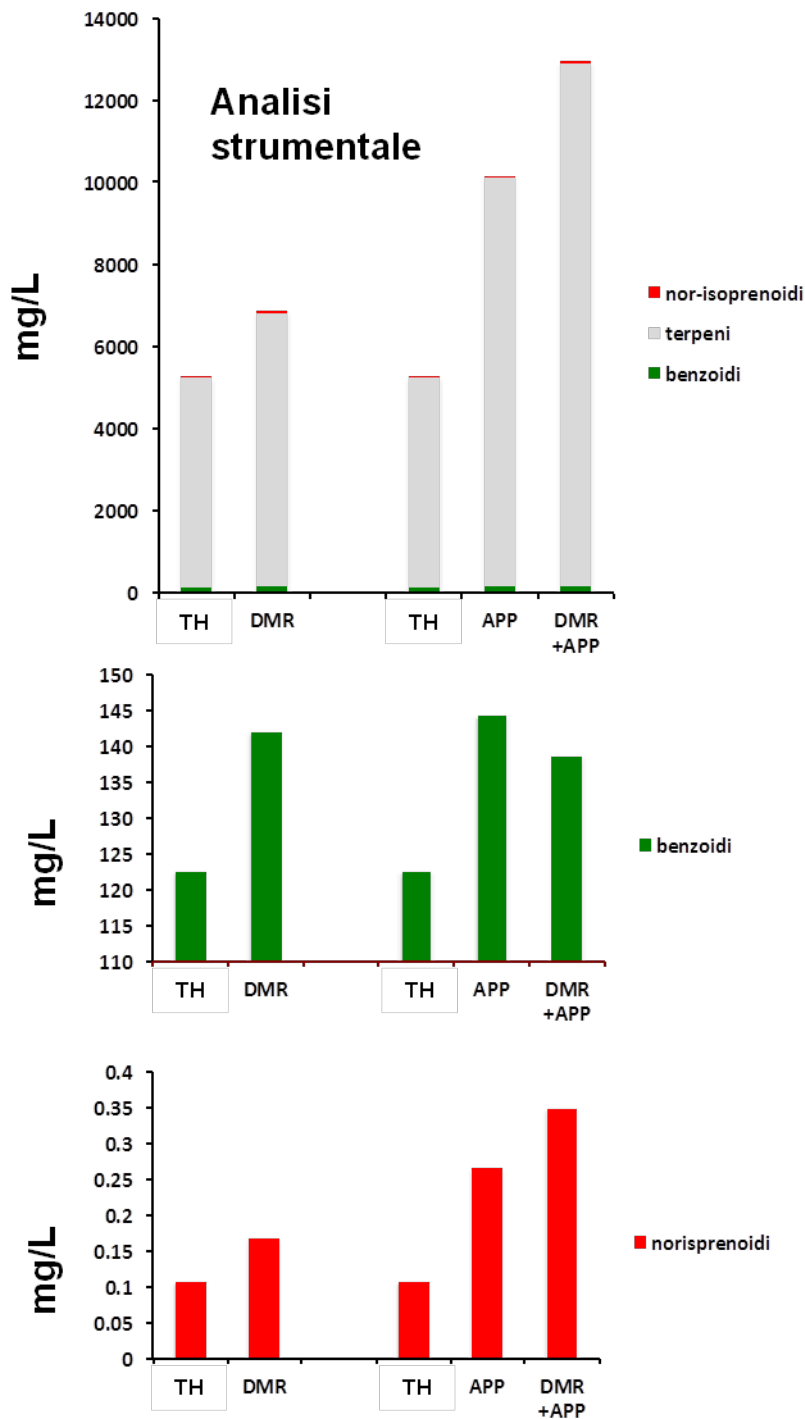


Figura 4.12: Effetto delle diverse tecniche applicate sul quantitativo finale di aromi nel vino, con particolare focus su norisoprenoidi, terpeni e benzoidi. Le barre indicano il quantitativo in milligrammi su litro di costituenti delle varie classi all'interno delle vinificazioni; TH (RACCOLTA TRADIZIONALE), DMR (DOPPIA MATURAZIONE RAGIONATA), APP (APPASSIMENTO).

4.4 ANALISI SENSORIALI

4.4.1 ANALISI DEL PROFILO AROMATICO

Le schede di degustazione sono state analizzate e riassunte in diagrammi a radar (Figure 4.13; 4.14; 4.15;4.16). I quattro campioni sono stati analizzati a coppie, seguendo lo schema riportato di seguito: 1) Campione 1 di Raccolta tradizionale (TH) con il Campione 2 DMR; 2) Campione 3 APPASSIMENTO con il Campione 4 DMR+APPASSIMENTO.

Il CONTROLLO, rappresentato dal vino ottenuto dai campioni R, è stato usato come parametro di confronto per analizzare le differenze olfattive con il campione sottoposto a DMR.

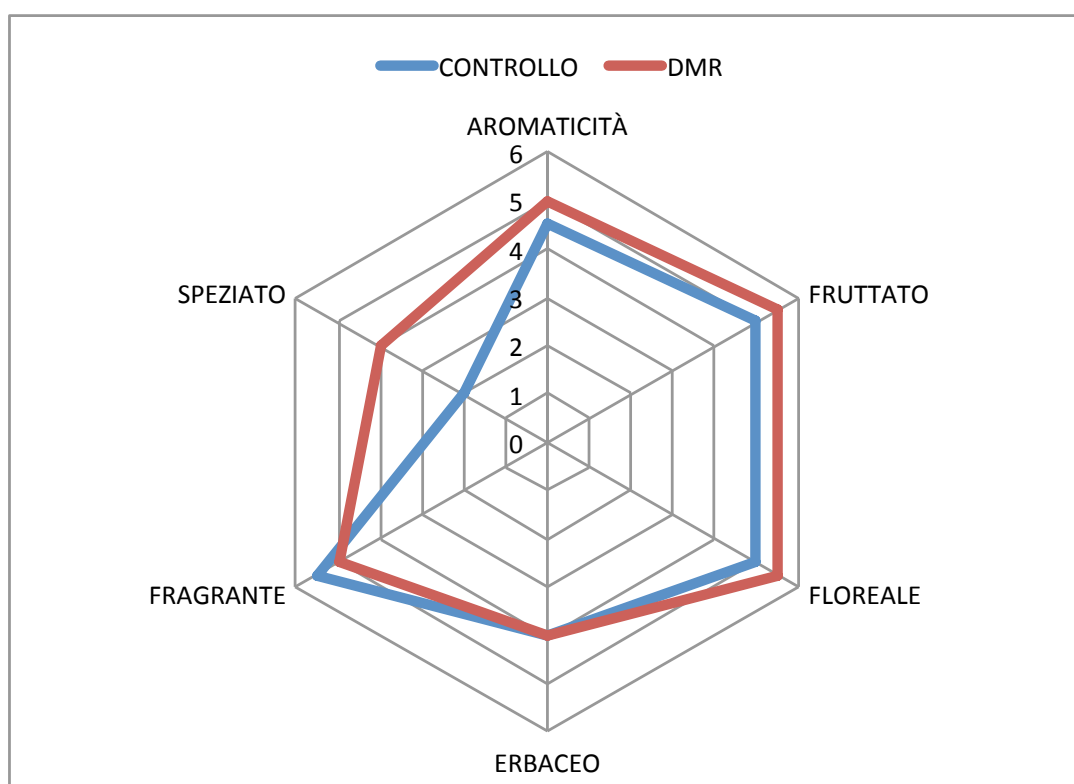


Figura 4.13: Grafico a radar di confronto del profilo olfattivo tra vinificazione di CONTROLLO e DMR.

Dal grafico a radar relativo al primo confronto (controllo vs DMR) si evince che il vino DMR mostri punteggi medi superiori rispetto a quelli del vino di controllo

per tutti i descrittori relativi a “aromaticità, fruttato, floreale, erbaceo e speziato”, con la maggiore differenza per il descrittore dello speziato (vaniglia, cannella) (Figura 4.13). Per quanto riguarda il descrittore “fragranza” il campione di controllo mette in evidenza valori leggermente superiori rispetto al vino DMR, dovuto probabilmente ad una più marcata sensazione speziata del campione DMR.

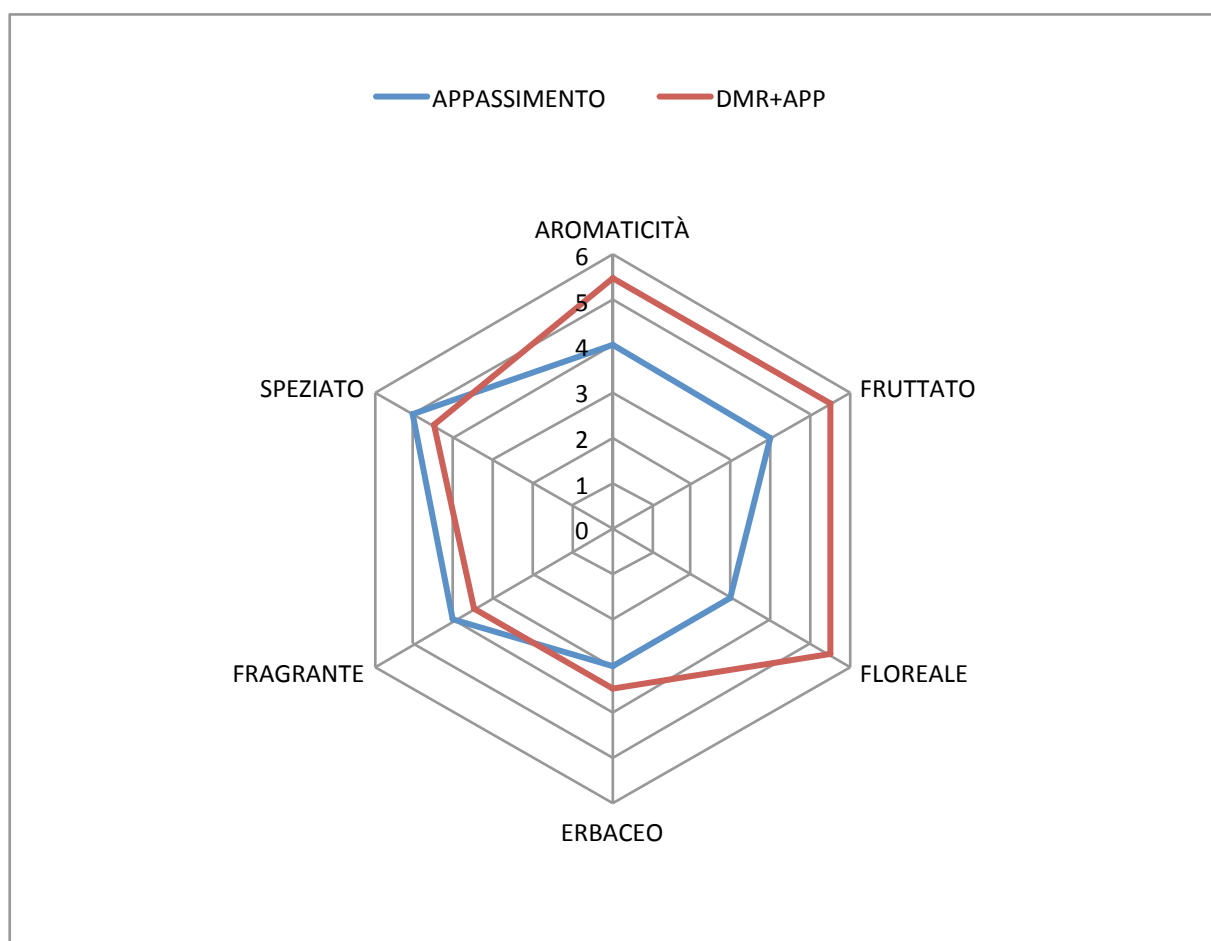


Figura 4.14: Grafico a radar di confronto del profilo olfattivo tra vinificazione del campione APPASSIMENTO e il campione DMR + APPASSIMENTO.

Il grafico di confronto tra il campione 3 (appassimento) e il campione 4 (DMR+APPASSIMENTO) (Figura 4.14), per il quale vengono presi in considerazione i descrittori “aromaticità, fruttato, floreale, erbaceo, fragrante e speziato”, presenta una situazione nella quale il campione DMR+APPASSIMENTO mostra un’aromaticità, una nota fruttata, una nota floreale ed erbacea nettamente

superiori rispetto all'altro vino; il campione 3 rimane, invece, superiore per i descrittori “speziato” e “fragrante” (Figura 4.15).

4.4.2 ANALISI QUALITÀ OLFATTIVA

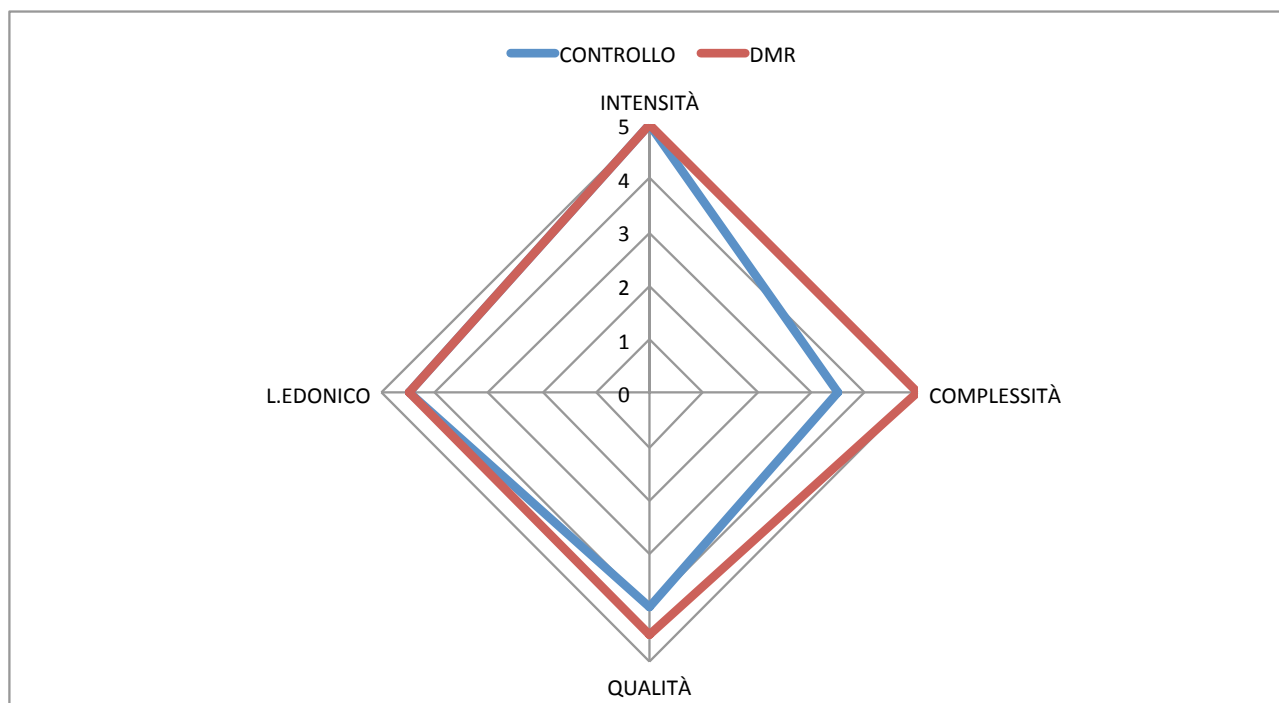


Figura 4.15: Grafico a radar di confronto della qualità olfattiva dei campioni di vinificazione di CONTROLLO e DMR. Indicare il numero di osservazioni complessive

Il grafico (Figura 4.15) relativo alle analisi sensoriali condotte su descrittori relativi alla qualità olfattiva, che prende in considerazione i parametri di intensità, complessità, qualità e di livello edonico, mette in evidenza una preferenza del campione DMR rispetto al campione di CONTROLLO. Le differenze più significative si osservano principalmente per il parametro “complessità olfattiva”, legato ad una maggiore qualità complessiva.

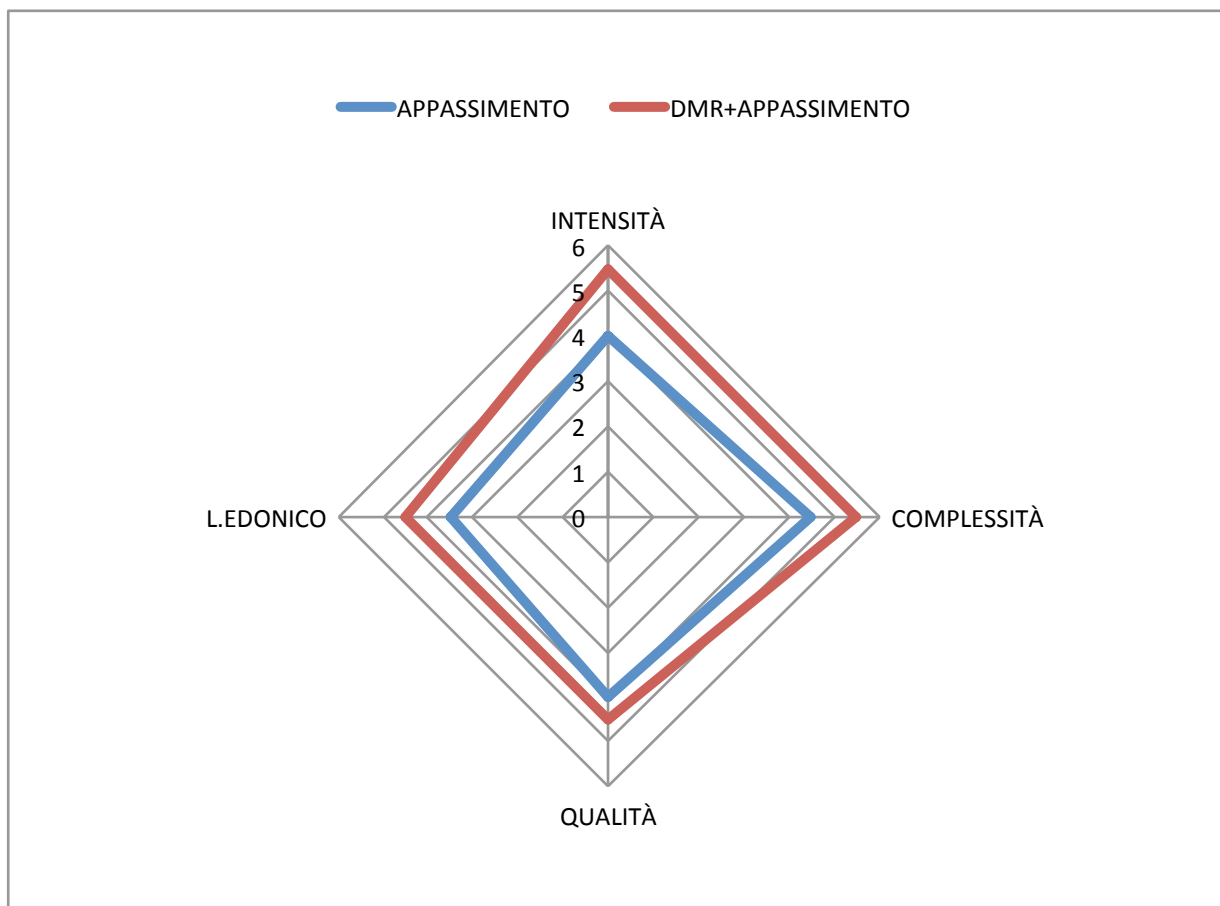


Figura 4.16: Grafico a radar di confronto della qualità olfattiva tra i campioni di APPASSIMENTO e di DMR + APPASSIMENTO. Indicare il numero di osservazioni complessive

I descrittori della qualità olfattiva evidenziano differenze marcate tra i campioni “APPASSIMENTO” e “DMR+APPASSIMENTO” (Figura 4.16) per tutti i descrittori qualitativi. Infatti il campione DMR+APP mostra valori più elevati per tutti i parametri, in particolare per quanto riguarda l’intensità aromatica.

7. BIBLIOGRAFIA

AFOUFA-BASTIEN D., MEDICI A., JEAUFFRE., COUSTOS-THEVENOT P., LEMOINE R., ATANASSOVA R. e LALOI M. (2010). The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC Plant Biology*, 10:245.

ANGELINI P., BOCCARDI E., LEGNANI G., MARCONI M., PICCIONI B., ROMANI R., TAMAGNINI P., ZANGRANDO T. (2012). Il mondo dei Sommelier; Didattica di Associazione Italiana Sommeliers.

BAVARESCO L., FREGONI C. (2001). Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Molecular biology and biotechnology of grapevine*, 1st edn. Kluwer, Dordrecht, 153-182.

BAYDAR NG., HARMANKAYA N., (2005). Changes in Endogenous Hormone Levels during the Ripening of Grape Cultivars Having Different Berry Set Mechanisms. *Turk J Agric For* 29 (2005) 205-210 © TÜBİTAK

BAYONOVE C. In *Les Acquisitions Recentes en Chromatographie du Vin*, (ed. B.Doneche). Lavoisier, Paris;1993.

BONERA, (2011). Relazione sugli aspetti genetico-molecolari della maturazione delle bacche in *Vitis vinifera* L.

BONGHI C., RAMINA A., TONUTTI P. (2012) Ciclo ontogenetico dell'albero: Maturazione; Pag 167-180; COSTA G., GUCCI R., INGLESE P., RAMINA A., XILOYANNIS C.; *Aboricoltura generale*; Patron Editore- Bologna.

BORIN G. ZAMORANI A., GIULIVO C. (2013). IL FIOR D'ARANCIO DEI COLLI EUGANEI DOCG. *Accademia della vite e del vino*.

BOSS P.K., DAVIES C. (2001). Sugars and anthocyanins in grape berries. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Molecular biology and biotechnology of the grapevine*, 1st edn. Kluwer, Dordrecht, 1-34.

BÖTTCHER C, BOSS P, DAVIES C. (2011). Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. *Journal of Experimental Botany* 62, 4267–4280.

CARBONNEU A., CARGNELLO G., MURISIER F. (2008). Double whitening on vine: an innovating technique for reasoning maturation, useful for Sustainable Viticulture, an alternative to sugar adding. 1-12.

CARGNELLO G. (1993): Prime ricerche sulla valutazione sensoriale dell'uva. Un Vigneto chiamato Friuli, 1-2, pp. 38-39.

CARGNELLO G. (1997): Guida all'analisi sensoriale dell'uva. Atti PRAL. Assessorato dell'Agricoltura, Regione Lazio, pp. 1-46.

CARGNELLO G., L. PEZZA, G. GALLO, T. CAMATTA, S. COCCATO, G. PASCARELLA, R. Di GAETANO, G. CASADEI, A. LA TORRE, G. SPERA, M. SCAGLIONE, S. MORETTI, A. GAROFALO, (2006) D.M.R. (“Double Reasoned Maturing”): innovative technique of agronomic eco-logic control of grey mould on grapevine. Trials and various considerations, Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 71 (2006) 1055–1061.

CAWTHON DL, MORRIS JR. Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormonal changes, and uneven ripening of Concord (*Vitis labrusca* L.) grapes. Journal of the American Society for Horticultural Sciences 1982;107:1097-1104.

CHAMPAGNOL F., (1984). Elements de physiologie de la vigne et de viticulture generale. Pub. Dell'autore Montpellier.

CHENG GW, BREEN PJ: Activity of phenylalanine ammonia-lyase(PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics indeveloping strawberry fruit. J Am Soc Hortic Sci 1991,116:865-869.

COLETTE NAVARRE (1991). Enologia; Editore Urlico Hoepli Milano (Italy).

COOMBE B. G., HALE C.R., (1973). The Hormone Content of Ripening Grape Berries and the Effects of Growth Substance Treatments; Plant Physiol. (1973) 51, 629-634

CORSO M., ZILIOFFO F., RIZZINI F.M., TEO G., CARGNELLO G., BONGHI C. (2013). Sensorial, biochemical and molecular changes in Raboso Piave grape berries applying “Double Maturation Raisonnée” and late harvest techniques. Plant Science 208 (2013) 50–57

COSTACURTA A., (2013). Il Moscato giallo nella grande famiglia dei Moscati. Accademia italiana della vite e del vino.

DAL SANTO S.,TORNIELLI B. G., ZENONI S., FASOLI M., FARINA L.,ANESI A., GUZZOF., DELLEDONNE M., PEZZOTTI M. (2013). The plasticity of the grapevine berry transcriptome. Genome Biology 2013, 14:r54

DAMINATO M, GUZZO F, CASADORO G. (2013). A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. J Exp Bot 64: 3775–3786

DAVIES C., BOTTCHEER C., 2009. Hormonal control of grape berry ripening. Grapevine and molecular physiology & biotechnology, 229-261.

DAVIES C, WOLF T, ROBINSON SP: Three putative sucrose transporters are

differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Sci* 1999, 147:93-100.

DAVIES C., SHIN R., LIU W., MARK R., THOMAS., SCHACHTMAN D.P., (2006). Transporters expressed during grape berry (*Vitis Vinifera* L.) development are associated with an increase in berry size and berry potassium accumulation. *J. Exp. Bot.* 57, 3209-3216.

DEYTIEUX-BELLEAU C, GAGNE S, L'HYVERNAY A, DONÉCHE B, GENY L. (2007) Possible roles of both abscisic acid and indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *Journal International des sciences de la vigne et du vin* 2007;41:141-148.

DI STEFANO R. (2013) Gli aromi dei moscati con particolare riferimento a quello del Moscato giallo. *Accademia italiana della vite e del vino*.

DOWNEY M.O., HARVEI J.S., ROBINSON S.P. (2003). Synthesis of flavonol and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) *Aust. J. Grape Wine Res.*, 110-121.

FANARA C. (2010). Evoluzione dei composti polifenolici in vini bianchi della sardegna durante la conservazione in bottiglia e caratterizzazione aromatica. *Biotechnologie Microbiche Agroalimentari*.

Fregoni M., (1998). "Viticoltura di qualità". Ed. l'Informatore Agrario 1998, Verona.

FREGONI M., FREGONI C., FERRARINI R., SPAGNOLLI F. (2005). *Chimica viticolo-enologica*. Reda; Torino.

GIVEN N.K., VENIS M.A., GIERSON D. (1988). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*. Volume 174, Issue 3, pp 402-406

<http://www.lavinium.com>

<http://www.oiv.int/oiv/cms/index>

INABA A, ISHIDA M, SOBAJIMA Y. Changes in endogenous hormone concentrations during berry development in relation to ripening of Delaware grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 1976;45:245-252.

TILBROOK, S.D. Tyerman, (2009) Hydraulic connection of grape berries to the vine: varietal differences in water conductance into and out of berries, and potential for backflow, *Funct. Plant Biol.* 36 (2009) 541–550.

LANGE B.M., M.R WILDUNG, E.J STAUBER, C SANCHEZ, D POUCHNIK, R CROTEAU (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Volume 65, Issue 9, May 2004, Pages 1223–1229*

LICHTENTHALER HK (1999) The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of

isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 47–65. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.47

LÜCKER J., BOWEN P., BOHLMANN J. (2004). *Vitis Vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry* 65, 2649-2659.

MANNING K., DAVIES C., BOWEN H.C. , WHITE P.J. (2001). Functional Characterization of Two Ripening-related Sucrose Transporters from Grape Berries; *Oxford Journals; Life Sciences; Annals of Botany; Volume 87, Issue 1; Pp. 125-129*

MARTIN D.M., CHIANG A., LUND S.T., BOHLMANN J. (2012). Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpenol glycoside accumulation in Gewurztraminer grapes. *Planta* (2012) 236:919–929

MARTIN DM, TOUB O, CHIANG A, Lo BC, OHSE S, LUND ST, BOHLMANN J (2009) The bouquet of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) flowers arises from the biosynthesis of sesquiterpene volatiles in pollen grains. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7245–7250

MATEO JJ, GENTILINI N, HUERTA T, JIMÉNEZ M, Di STEFANO R (1997) Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *Journal of Chromatography. A* 778, 219–224. doi:10.1016/S0021-9673 (97)00566-9

MAY P. (2000). From bud to berry, with special reference to inflorescence and bud morphology in *Vitis vinifera*. L. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 6, 82-98.

MONTALDO G. (2005). Appassimento, da necessità a virtù. *VQ* 4, 85-91.

MORALE S., (1998). Caratteristiche di due vini friulano tipici : Picolit e Ramandolo. Tesi di laurea Università di Udine.

NUNAN K.J., DAVIES C., ROBINSON S.P., FINCHER G.B., (2001). Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during berry development. *Planta* 214, 257-264.

OLLAT N., DIAKOU-VERDIN P., CARDE J-P., BARRIEU F., GAUDILLERE J-P., MOING A. (2002). Grape berry development: a review. *J. Sci. Vigne vin* 36:109-131.

OLLAT N., GAUDILLERE J-P. (1998). The effect of limiting leaf area during stage I of berry growth on development and composition of berries of *Vitis vinifera* L., cv Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:251-258.

POGORZELSKI E., WILKOWSKA A. (2007) Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages:

a review. Volume 22, Issue 4; Pages 243–345

ROLLAND F, WINDERRICKX J, THEVELEIN JM. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2(2):183-201.

RÜFFNER H.P. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review. Part A. *Vitis* 21,247-259

S. GUILLAUMIE, R. FOUQUET, C. KAPPEL, C. CAMPS, N. TERRIER, D. MONCONBLE, J. DUNLEVY, C. DAVIES, P. BOSS, S. DELROT. (2011) Transcriptional analysis of late ripening stages of grapevine berry, *BMC Plant Biol.* 11 (2011) 165.

SAPIR-MIR M, METT A, BELAUSOV E, TAL-MESHULAM S, FRYDMAN A, GIDONI D, EYAL Y (2008) Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiology* 148, 1219–1228. doi:10.1104/pp.108.127951

SCIENZA A. (2006). *Atlante dei vini passiti italiani*. Edn Gribaudo.

SIMONETTI P., PIETTA P., TESTOLIN G. (1997) Polyphenol content and total antioxidant potential of selected italian wines.

STYGER G., PRIOR B., BAUER F. F. (2011) Wine flavor and aroma; *J Ind Microbiol Biotechnol* (2011) 38:1145–1159

SYMONS GM, DAVIES C, SHAVRUKOV Y, DRY IB, REID JB, THOMAS MR. (2006). Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol*, 140:150-158.

TERRIER N., ROMIEU C. (2001). Grape berry acidity. In: Raubelakis-Angelakis KA (ed) *Molecular biology and biotechnology of the grapevine*, 1st edn. Kluwer, dordrecht, 35-57.

TERRIER N., SAUVAGE FF.X., AGEORGES A., ROMIEU C., (2001) Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* 213, 20-28.

THOLL D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Plant Biology* 2006, 9:297–304

VELASCO R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo

VELASCO R, ZHARKIKH A, TROGGIO M, CARTWRIGHT DA, CESTARO A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Dematte L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2:e3107

VERSARI A, PARPINELLO GP, TORNIELLI GB, FERRARINI R, GIULIVO C. (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J Agric Food Chem*, 49:5531-5536.

YAKSHIJI H., SAKURAI N., MORINAGA. (2001). Changes in cell-wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. *Physiol. Plantarum* 111, 188.195.

ZAMBONI A., L. MINOIA, A. FERRARINI, G.B. TORNIELLI, E. ZAGO, M. DELLEDONNE, M. PEZZOTTI. (2008) Molecular analysis of post-harvest withering in grape by AFLP trans- criptional profiling, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 4145–4159.

ZHANG X-Y, WANG X-L, WANG X-F, XIA G-H, PAN Q-H, FAN R-C, WU F-Q, YU X-C, ZHANG D-P. (2006) A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiol*, 142:220-232.

ZHANG XR, LUO GG, WANG RH, WANG J, HIMELRIC DG. Growth and developmental responses of seeded and seedless grape berries to shoot girdling. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 2003;128:316-323.

ZILIOFFO F. ,M.CORSO, F.RIZZINI, A.RASORI, A.BOTTON, C.BONGHI. (2012) Grapeberryripen- ing delay induced by a pre-véraison NAA treatment is paralleled by a shift in the expression pattern of auxin- and ethylene-related genes, *BMC Plant Biol.* 12 (2012) 185.