



Miglioramento genetico in ambito vitivinicolo



In ambito vitivinicolo il **miglioramento genetico** è utilizzato per migliorare la produttività dei vitigni, la qualità della produzione, la diversificazione delle caratteristiche qualitative, la resistenza ai parassiti e alle difficili condizioni climatiche e del terreno.

Il **miglioramento genetico** comprende tutte le attività volte a modificare la composizione delle popolazioni agendo direttamente o indirettamente sul loro patrimonio genetico.

Le sperimentazioni biotecnologiche hanno le potenzialità per selezionare piante più resistenti a determinate infezioni e quindi con minore necessità di somministrazione di fitofarmaci.
Anche in cantina le biotecnologie sono utilizzate per esempio per selezionare microrganismi in grado di produrre le migliori fermentazioni.



Biotecnologie "buone" in viticoltura



Mentre una ventina di anni or sono l'impiego di **biotecnologie** in agricoltura fu salutato come un evento di grande portata ai fini dello sviluppo e del progresso del comparto, capace di dare avvio ad una seconda e più efficace "rivoluzione verde", la contrarietà di molti in merito agli organismi geneticamente modificati ha raffreddato gli entusiasmi.

Ma non tutte le biotecnologie, in realtà, sono finalizzate alla produzione di OGM. Per quanto riguarda la vite, in particolare, tecniche che non comportano alcun trasferimento genico sono applicate per esplorare il genoma o il proteoma della pianta, oppure per ottenere materiale di propagazione esente da virus (risanamento).



Miglioramento genetico della vite: cenni storici



Inizia con la cura delle viti spontanee che portavano frutti più abbondanti e più zuccherini e con le prime viti messe in coltura dai primi agricoltori.

L'opera di selezione empirica continua fino alla prima metà dell'Ottocento prima dell'arrivo in Europa delle avversità biotiche provenienti dall'America: oidio, fillossera e peronospora.

Inizia intenso lavoro di ibridazione tra viti europee, portatrici dei caratteri di qualità dell'uva, e viti americane resistenti o tolleranti ai patogeni ma in seguito a risultati non soddisfacenti si optò per

piante bimembri: viti europee innestate su viti americane con grandi cambiamenti nella piattaforma ampelografica.



Difficoltà tecniche del miglioramento genetico della vite



La vite è altamente eterozigote: nel suo genoma le coppie di geni, presenti in corrispondenza dello stesso locus genico nei cromosomi derivanti dai due parentali, sono spesso alleli diversi tra loro.

Cosa comporta in termini pratici: anche in caso di autofecondazione è difficile che i semenzali siano molto simili al genitore. Nel caso di fecondazioni incrociate il risultato è in certa misura imprevedibile.

Molti caratteri di grande importanza sono poligenici: sono conseguenza dell'azione e interazione di un certo numero di geni mentre pochi caratteri importanti sono controllati da geni singoli con alleli dominanti.

Specie poliennale: entra in piena produzione dopo il terzo anno di coltura nel caso di piante propagate per innesto o talea anche più tardi se ottenute da seme.
PER QUESTI MOTIVI

L'ottenimento di nuovi validi genotipi di vite tramite incrocio o ibridazione è un processo lungo complesso e costoso.
Appetito peculiare nel migl. Gen. delle cultivar da vino: difficoltà di introduzione e affermazione di nuovi vitigni a causa dei limiti legali e della tradizione che spinge il consumatore ad accettare con difficoltà nuove proposte

Prospettive del miglioramento genetico della vite Vignevini 2003

In generale il miglioramento genetico ha lo scopo di migliorare le piante coltivate per quanto concerne la resa, la qualità del prodotto, le resistenze specifiche.

Per la vite oggi occorre fare alcune considerazioni: vitigni come i Pinot, lo Chardonnay, il Cabernet Sauvignon sono già di eccellente qualità purché coltivati e vinificati in modo adeguato

Il miglioramento Genetico delle uve da vino interessa caratteristiche viticole diverse da qualità e produzione.

Altre caratteristiche devono essere migliorate come la resistenza, soprattutto contro le malattie fungine (**mal dell'esca**) perché le uve richiedono programmi di difesa molto impegnativi e rigorosi.



Grandi opportunità per le biotecnologie



Limiti delle metodologie tradizionali per il miglioramento genetico:

- ◊ Dispendio di tempo
- ◊ Mancanza di conoscenze sul genoma

Moderni metodi biotecnologici

- ◊ **Marker molecolari**: consentono di individuare importanti caratteri (resistenza alle malattie) sin dalle prime fasi della selezione. Inoltre i loci che codificano per la resistenza possono essere identificati nel genoma di *Vitis* e grazie all'uso dei **marker** possono essere seguiti per ulteriori lavori di breeding.

Analisi proteomica

Trasferimento di geni per la resistenza ai patogeni.



Miglioramento genetico dei portinnesti



◊ **Innesto**: pratica agronomica impiegata fin dall'antichità. Per la vite fu utilizzata a seguito della diffusione in Europa della fillossera.

Inizio dell'invasione dell'afide risale al 1868 ma solo dopo alcuni anni si comprese che l'innesto su alcune viti americane resistenti era la via più soddisfacente per risolvere il problema

Molte cultivar portinnesto sono state ottenute: principalmente mediante l'ibridazione di *V. berlandieri* x *V. riparia* o *V. rupestris*

V. riparia o *V. rupestris* presentano **Clorosi da ferro** su terreni calcarei: ibridi tra *Vitis vinifera* (tollerata i terreni calcarei) e *Vitis riparia* o *rupestris* al fine di risolvere il problema della tolleranza al calcare. Questi ibridi portinnesti non ebbero successo per la sensibilità alla fillossera di *Vitis vinifera*.

Da un'area calcarea in Texas *Vitis berlandieri* per risolvere il problema del calcare.

Oggi i portinnesti più diffusi: ibridi tra *V. berlandieri* e *V. riparia* o *rupestris*.

Problema dei nematodi che trasmettono virus responsabili delle virosi: necessità di portinnesti.

Prezzi elevati dei terreni coltivati a vite. Mancanza di riposo dopo l'estirpazione prima di un nuovo impianto. Questo favorisce lo sviluppo di nuove razze di nematodi più aggressivi.

Necessità di nuovi portinnesti a resistenza più ampia e duratura.

O39-16 è un portinnesto resistente ottenuto in California (1991) come ibrido tra *V. vinifera* X *Muscadinia rotundifolia*. E' abbastanza resistente all'attacco di *Xiphinema index* (trasmette il GFLV - Grapevine fanleaf Virus, arricciamento fogliare) ma è sensibile ai nematodi endoparassiti galligeni.



Evoluzione di portinnesti segue....

Crescita della popolazione umana: l'agricoltura dovrà adattarsi ad una minore qualità e quantità di acqua.

Necessità di portinnesti che tollerino la **siccità**, con radici che si accrescono molto alla ricerca di acqua. *V. monticola* in Texas cresce su affioramenti rocciosi e può essere considerata tollerante la siccità. Fornisce germoplasma utile per i programmi di miglioramento genetico.

Diminuzione della qualità dell'acqua.

Maggiore **salinità**. Specie del Sud-Ovest americano sono probabili candidate per la tolleranza a suoli alcalini o salini.

Suoli troppo umidi per la viticoltura che favoriscono lo sviluppo del marciume radicale causato da *Phytophthora*. Solo *V. palmata* cresce con le radici immerse in aree paludose.

I **suoli acidi** sono il risultato di un eccesso di fertilizzanti a base di ammonio e sono diffusi in aree ad elevata piovosità. Nel sud Est degli Stati Uniti il pH del suolo ha un valore da basso a molto basso e le specie di vite che vi crescono tollerano molto bene questa situazione. La genetica della tolleranza all'acidità del suolo è quasi sconosciuta ma sarebbe opportuno studiare a fondo questo germoplasma e caratterizzarne la tolleranza.



Obiettivi

Molti problemi della viticoltura potrebbero essere risolti grazie all'ottenimento di nuovi portinnesti.

Occorre che i breeders di portinnesti siano in grado di comprendere in anticipo le necessità future, data la notevole lunghezza del processo di miglioramento genetico e di selezione.

I progressi nel campo della genetica molecolare stanno fornendo gli strumenti adatti per accelerare fortemente il processo di miglioramento genetico.

I marcatori del DNA possono essere correlati ai caratteri di resistenza o tolleranza e possono essere utilizzati per valutare popolazioni di semenzali allo stadio di giovani piante.



L'obiettivo della **genomica** e **proteomica** è quello di identificare i geni e capirne l'espressione, dopodiché potrebbero essere utilizzati i geni della resistenza delle varie specie di vite per trasformare portinnesti in modo tale da integrare i caratteri multipli con le caratteristiche desiderate in un tempo più breve rispetto ai classici metodi di miglioramento genetico.

Occorrerà un po' di tempo prima che ciò si realizzi.

Nel frattempo è necessario promuovere i metodi classici di miglioramento genetico. Il germoplasma necessario per risolvere i problemi di cui si è discusso esiste ed occorre insistere con le ricerche per caratterizzare la resistenza ai parassiti e la tolleranza agli stress abiotici.

L'impegno per trovare soluzioni ai problemi prima elencati deve proseguire avvalendosi di tutte le prospettive possibili, dal breeding classico alla genetica molecolare (Genomica e Proteomica).



Miglioramento genetico della vite assistito da marcatori molecolari

Miglioramento genetico della vite con metodi tradizionali:

incroci e ibridazioni per creare nei discendenti nuove combinazioni del DNA posseduto dai genitori.

Insieme al gene di interesse viene trasferita una grande quantità di materiale genico indesiderato. Tentativo di ridurre i tratti indesiderati con successivi reinocchi.

Vite: processo lento e costoso per i lunghi tempi di generazioni, per gli spazi necessari alla coltivazione e per le spese per valutare le caratteristiche di prole numerose.



Tecniche di biologia molecolare

OGM
(inserimento diretto
di un nuovo carattere)



Marcatori del DNA

Da utilizzare per seguire il movimento di geni nelle popolazioni derivanti da incrocio e per selezionare precocemente gli individui con i tratti genetici desiderati.

Identificazione di un marcatore associato ad un carattere importante
(marcatori molecolari associati alla resistenza)

Metodo per la selezione precoce dei semenzali



Selezione clonale



la scelta di vitigni che nel corso di un anno hanno prodotto un tipo di uva di qualità e quantità superiore rispetto alla stessa varietà presa in considerazione: con la propagazione per via vegetativa otteniamo una popolazione con caratteristiche identiche.

In pratica, nella selezione clonale si individua la zona tipica, si scelgono, nell'ambito dei migliori vigneti, i ceppi migliori, si effettuano i controlli agronomici e sanitari.

Si sviluppano inoltre le "microvinificazioni": queste ultime vengono effettuate per verificare se alle caratteristiche agronomiche corrispondono adeguate qualità enologiche e, come esprime il termine, rappresentano la riproduzione del processo di vinificazione, attuata in versione "lillipuziana" con apparecchiature piuttosto complesse.



Cultivar particolarmente soddisfacenti riprodotte per via vegetativa. **VANTAGGI:**

- Si evitano cambiamenti nel genoma della cultivar fatto inevitabile se le piante si riprodussero per via sessuale.
- Produzione di nuove piante con maggiore rapidità: una pianta da fiore può impiegare anni prima di fiorire ma se ottenuta per via asessuale può bastare anche una sola stagione.



L'obiettivo è quello di sfruttare l'insieme delle risorse genetiche disponibili nell'ambito della specie *Vitis vinifera* attraverso varie metodiche di selezione e, tra queste, merita di essere ricordata la **micropropagazione**:

con la **micropropagazione** è possibile ottenere da un solo individuo un elevato numero di individui uguali alla pianta madre, partendo da piccole parti di piante e utilizzando la caratteristica della "totipotenza".

La metodica prende avvio con il prelievo di gemme, porzioni di foglia, apici vegetativi e il successivo loro posizionamento in laboratorio su un adeguato substrato: lo sviluppo e la collocazione all'aperto costituiscono, in sintesi, le tappe successive.



COLTURE CELLULARI "IN VITRO" OVVERO LE PIANTE IN PROVETTA



L'insieme delle tecniche che consentono di coltivare parti di vegetali su idonei mezzi di coltura in condizioni di sterilità ed in ambiente controllato.
La totipotenza cellulare è il presupposto di base per lo sviluppo di questa tecnica.

La totipotenza è una proprietà peculiare delle piante per cui tutte le cellule prese da un qualsiasi organo della pianta (cellule somatiche e germinali) sono in grado di originare in opportune condizioni una pianta intera.

Nel 1958 prima dimostrazione che singole cellule somatiche di carota erano in grado di sviluppare in vitro embrioni dai quali si potevano ottenere piante intere.
Solo grazie a nuove informazioni sugli ormoni vegetali, con la scoperta delle citochinine si aprì definitivamente la strada verso le moderne biotecnologie vegetali.

GLI ORMONI VEGETALI

La forma e la funzione di piante e animali multicellulari dipendono dalla comunicazione fra le cellule che costituiscono gli organismi.
La comunicazione intercellulare nelle piante superiori (come negli animali) è mediata dall'azione di messaggeri chimici chiamati ormoni.

Nelle cellule gli ormoni interagiscono con proteine specifiche definite recettori.

Gli ormoni vegetali sono raggruppati in cinque classi:
[auxine](#), [gibberelline](#), [citochinine](#), [etilene](#) e [acido abscissico](#).

Tutti questi ormoni vegetali sono delle molecole relativamente piccole che vanno dalla grandezza dell'etilene (28 Da) a quella delle gibberelline (346 Da).

Come gli ormoni animali essi sono efficaci a concentrazioni molto basse.

L'**auxina** esercita una vasta gamma di effetti sull'accrescimento e sulla morfogenesi vegetale

Stimolazione della distensione cellulare in fusti

Aumento dell'estensibilità della parete cellulare nei giovani fusti in via di sviluppo

Regolazione dell'accrescimento nelle radici e nelle foglie

Tropismi (Le auxine sono in grado di mediare gli effetti della luce e della gravità sull'accrescimento vegetale)

Inibizione della crescita delle gemme laterali

Nella maggior parte delle piante superiori la gemma apicale in accrescimento inibisce, in diversa misura, l'accrescimento delle gemme laterali (ascellari), un fenomeno definito dominanza apicale.

Ruolo sulla crescita radicale

Inibizione dell'abscissione fogliare

Regolazione dello sviluppo dei frutti (Esistono molte prove che dimostrano il diretto coinvolgimento dell'auxina nella regolazione dello sviluppo dei frutti.

L'auxina viene prodotta nel polline e nell'endosperma e nell'embrione di semi in via di sviluppo e lo stimolo iniziale per la crescita del frutto può risultare dall'impollinazione.

Effetti delle Gibberelline

Allungamento del fusto in piante nane

Allungamento dello stelo florale in piante longidiurne

Modificazione della giovinezza: Numerose piante perenni legnose non fioriscono fino a quando non hanno raggiunto un determinato stadio di maturità; fino a quel momento vengono definite giovanili.

L'applicazione delle gibberelline può regolare questa giovinezza in entrambe le direzioni a seconda delle specie, in quanto la GA3 può causare la conversione dallo stadio maturo a quello giovanile.

Fruttificazione e accrescimento del fiore

Induzione alla germinazione del seme:

Alcuni semi hanno bisogno di luce e di freddo per essere indotti alla germinazione. In questi semi si può interrompere la dormienza, senza luce o freddo, mediante l'applicazione di gibberellina.

Il ruolo biologico delle Citochinine

Il rapporto auxina/Citochinina regola la morfogenesi nelle colture di tessuti.

Le citochinine ritardano la senescenza e stimolano la mobilitazione delle sostanze nutritive.

Le citochinine promuovono la maturazione dei cloroplasti.

Le citochinine possono stimolare l'allargamento cellulare.

L'etilene causa numerosi effetti su specie vegetali e su organi differenti

Maturazione dei frutti

Abscissione (La caduta di foglie, frutti, fiori e altri organi vegetali è definita abscissione)

Accrescimento delle pianticelle (L'etilene cambia i modelli di accrescimento delle pianticelle riducendo la velocità di allungamento e aumentando l'espansione laterale. Il tipico accrescimento orizzontale che si verifica dopo l'esposizione a etilene può avere un ruolo importante durante la germinazione).

Dormienza dei semi e delle gemme

L'etilene quando viene applicato a semi di cereali interrompe la dormienza e dà inizio alla germinazione, promuovendo in numerose specie anche la velocità di germinazione dei semi.

Le risposte fisiologiche all'ABA

L'ABA causa numerose risposte fisiologiche nelle piante superiori:

Dormienza delle gemme: inibitore di accrescimento

Dormienza dei semi: L'ABA inibisce la sintesi di enzimi idrolitici che sono fondamentali per la degradazione di sostanze di riserva del seme.

Accrescimento: L'ABA blocca la distensione della cellula.

Stress e chiusura degli stomi: Il ruolo dell'ABA negli stress da freddo, da sale e idrici ha portato alla caratterizzazione dell'ABA come ormone da stress. L'ABA è molto efficace nel causare la chiusura degli stomi ed il suo accumulo in foglie sotto stress gioca un ruolo importante nella riduzione della perdita dell'acqua dovuta alla traspirazione in condizioni di stress idrico.

Assorbimento dell'acqua: L'applicazione di ABA a tessuti radicali stimola il flusso idrico e quello ionico, indicando che l'ABA regola il turgore non solo diminuendo la traspirazione, ma anche aumentando il flusso di acqua dentro le radici.

Abscissione e senescenza: In origine l'Acido Abscissico fu isolato come fattore che causava la senescenza. Comunque, si è subito capito che l'ABA stimolava l'abscissione di organi solo in alcune specie e che il principale ormone responsabile era l'etilene.

Bioteecnologie vegetali (risultato della cooperazione tra scienze biologiche e ingegneria):

Micropropagazione per coltura di meristemi apicali

Callogenesi e Organogenesi

Embriogenesi somatica

Androgenesi

Protoplasti (ibridazione somatica)

Microspore embryogenesis

Tecniche del DNA ricombinante

Finalità:

1. Mantenere costante il patrimonio genetico e riprodurre in tempi brevi, con condizioni controllate e non dipendenti dall'ambiente esterno le piante (micropropagazione per coltura in vitro di meristemi apicali)
2. Risanare le piante da virus e micoplasmi ossia batteri privi di parete cellulare (micropropagazione per coltura in vitro di meristemi apicali)
3. Creare nuovi genotipi altamente produttivi in grado di resistere ai parassiti o tollerare condizioni ambientali estreme (tecniche dell'embriogenesi somatica, androgenesi, fusione dei protoplasti, DNA ricombinante).

I mezzi di coltura rappresentano la fonte principale dalla quale gli espianti traggono tutto il loro nutrimento. Essi consistono in soluzioni acquose o agarizzate contenenti tre gruppi fondamentali di sostanze: elementi minerali, sostanze organiche, e regolatori di crescita.

I germogli "in vitro" sono eterotrofi, traggono zuccheri direttamente dal substrato e fissano solo in minima parte la CO₂.





Coltura di meristemi apicali

Tecnica di propagazione agamica ormai diventata per molte specie un sistema di moltiplicazione alternativo alle tecniche tradizionali di propagazione. L'obiettivo di tale metodologia è quello di ottenere in tempi brevi ed a costi contenuti, un grande numero di piantine, identiche sia genotipicamente che fenotipicamente alla pianta di partenza precedentemente selezionata per caratteristiche fisiologiche e produttive di pregio.

Essa consiste nell'allevare meristemi apicali (massa di cellule in divisione presenti negli apici vegetativi molto stabili dal punto di vista genetico) su idonei mezzi di coltura addizionati di ormoni vegetali in maniera tale da esaltare al massimo la produzione di nuovi germogli (**micropropagazione**).

Le piante ottenute con questa tecnica sono uguali alla "madre" e per questo **cloni** della pianta che ha donato il tessuto. Nel processo di micropropagazione distinguiamo le seguenti fasi:

1. Induzione e stabilizzazione delle colture in ambiente asettico.
2. Promozione dell'attività rigenerativa e moltiplicazione dei nuovi germogli.
3. Induzione e sviluppo di nuove radici alla base dei germogli.
4. Trapianto ed acclimatazione.



Segue meristemi

Tecnica che consente di ottenere **piante esenti da virus e micoplasmi**: i meristemi sono tessuti generalmente non attaccati da questi parassiti che sono un grave problema per le colture.

Conservazione del germoplasma:

esistono banche dati in cui è conservato il germoplasma di molte varietà coltivate, generalmente costituito dal seme, ma anche collezioni in campo o colture di tessuti. Difficoltà nel conservare il germoplasma come seme: i semi vengono deumidificati e Conservati a -20°C . Alcuni semi perdono la germinabilità dopo un po' di tempo, alcune piante non producono semi.

E' possibile conservare a bassa temperatura (in N liquido a -196°C) i meristemi apicali per ottenere da questi nuove piante. La crioconservazione preserva gli apici per lungo tempo senza danneggiarli o indurre loro cambiamenti genetici.



Meristemi apicali e Risanaento da virus

L'ottenimento di piante indenni da malattie è un altro grande vantaggio dell'approccio tramite colture sterili di tessuti. Prima di essere trasferiti in un mezzo per coltura di tessuti, i meristemi vengono accuratamente sterilizzati per uccidere qualsiasi batterio o fungo presente sulla superficie esterna del tessuto.

Il vero vantaggio della coltura di meristemi è che produce materiale di impianto esente da virus.

I virus vivono all'interno delle cellule vegetali e vengono trasmessi da una generazione all'altra.



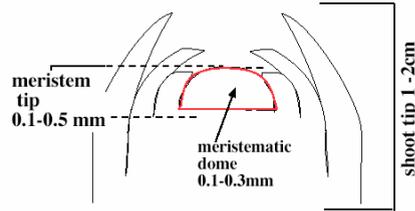
Le virosi delle piante sono un gruppo di affezioni molto temute in agricoltura.

I virus si possono trasmettere da pianta a pianta, per contatto, per seme, per polline, per propagazione vegetativa, per mezzo di funghi e per vettori animali. Non essendo le malattie virali curabili con trattamenti in campo, l'unico modo per controllarle rimane la prevenzione. Il risanamento di piante infette prevede essenzialmente due tecniche: la termoterapia e la coltura di meristemi.

La prima consiste nel sottoporre la pianta ad una temperatura di 36°C - 38°C per 4-6 settimane in modo da inattivare gli agenti virali sensibili al calore.

La seconda, si basa sul fatto che le particelle virali sono assai rare o disturbate nel loro metabolismo nei meristemi apicali. Essa consiste nel prelevare un apice vegetativo ed allevarlo "in vitro" in questo modo si otterrà l'intera pianta risanata.

Ovviamente la sua condizione viene confermata da saggi virologici.



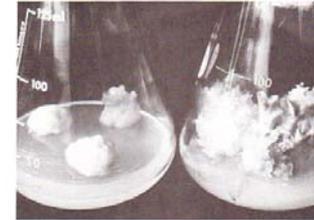
Terapia termica e coltura di meristemi possono essere associati



Callogenesi, organogenesi, embriogenesi somatica

Callo: massa disorganizzata e indifferenziata di grandi cellule in divisione con un grosso vacuolo. Può essere ottenuto da tutte le piante e da qualsiasi parte della pianta.

Come si ottiene un callo? Espianto vegetale su apposito substrato. In presenza di ormoni (auxine e citochinine) le cellule dell'espianto proliferano producendo il callo (callogenesi).



Explant

Cell, tissue or organ of a plant that is used to start in vitro cultures.

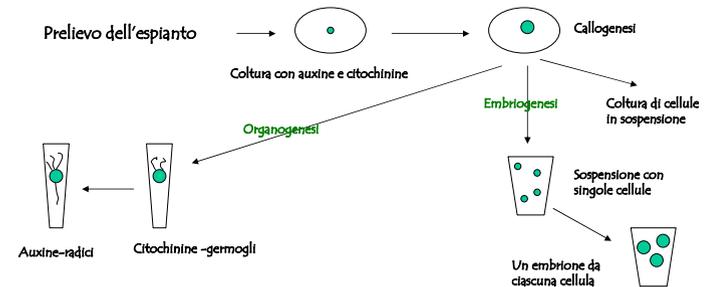


Tre destini diversi per il callo:

Organogenesi, formazione di germogli e di radici indotte dal trattamento del callo rispettivamente con citochinine e auxine (i primordi di foglie e radici sono unipolari).
Da ogni callo si origina una nuova piantina;

Embriogenesi somatica, ottenuta dissociando il callo in singole cellule, da ciascuna delle quali si origina un embrione somatico;

Coltura di cellule in sospensione, i calli sono dissociati in singole cellule da coltivare su mezzo liquido.



EMBRIOGENESI SOMATICA



Il fenomeno dell'**embriogenesi somatica** osservato per la prima volta nel 1958 in colture "in vitro" di carota è ormai diventato per numerose specie il sistema sperimentale più perseguito per la produzione su vasta scala.

Mediante tale processo l'embrione si sviluppa a partire da **cellule somatiche** precedentemente differenziate. Si verifica una riprogrammazione dell'espressione genica e si innescano cambiamenti strutturali **simili** a quelli trovati in un normale embrione zigote.

Tale processo implica la formazione di embrioni somatici che sono bipolari provvisti cioè di un asse per le radici e per i germogli indispensabili al normale sviluppo di questi organi in vitro e quindi della plantula. A partire dallo stadio globulare, è possibile osservare la progressione della polarità attraverso uno stadio a cuore, a torpedino fino alla formazione dei cotiledoni e la completa differenziazione della plantula.

Tale fenomeno può essere indotto sia direttamente, in cellule appartenenti ad una struttura differenziata (foglie, stelo, radici, cotiledoni ecc.) sia indirettamente in calli allevati su un mezzo agarizzato o in sospensioni cellulari.



Le cellule si suddividono in **somatiche** e **germinali**. Le cellule **somatiche** costituiscono il "soma", ossia il corpo della pianta e crescono e muoiono con essa; le cellule **germinali** consentono la sua riproduzione e quindi il mantenimento della specie.

Con il processo di **embriogenesi somatica** si descrive la capacità che cellule vegetali differenziate (ottenute ad es. da pezzi di foglie, fiori, steli....) hanno di diventare embriogenetiche, dando origine a veri e propri embrioni **simili** nel loro sviluppo a quelli ottenibili attraverso il processo sessuale. Questo sistema è stato utilizzato quale metodo di micropropagazione in quanto permette di ottenere un enorme numero di individui geneticamente identici senza intervenire con le diverse manipolazioni che si rendono necessarie per indurre la formazione *in vitro* di germogli e/o radici.



Embriogenesi somatica



Variazioni somaclonali

La variazione somaclonale è la variabilità genetica che si verifica durante la "tissue culture".

Alcune variazioni si manifestano come mutazioni ereditabili e si presentano nella popolazione vegetale anche dopo il trasferimento in campo.

Possono essere attribuite sia a variazioni pre-esistenti nelle cellule somatiche dell'espianto, sia a variazioni generate spontaneamente durante il "tissue culture".

- Possono verificarsi per
- ◊Aberazioni cromosomiche
 - ◊Amplificazione del DNA
 - ◊Elementi trasponibili
 - ◊Mutazioni puntiformi

Vantaggi: selezione di caratteri di interesse agronomico (resistenza a stress biotici e abiotici, come resistenza a patogeni, erbicidi, freddo, salinità)

Mutazioni e mutagenesi nella vite

Nei vitigni coltivati si sono accumulate mutazioni spontanee avvenute nel tempo: oggi la variabilità intravarietale è esplorata e sfruttata su basi scientifiche mediante la selezione clonale.
Non sono rari casi di mutazioni con cambiamento fenotipico importante e stabile da considerare il nuovo genotipo come una nuova cultivar.

Pinot nero $\xrightarrow{\text{Mutazioni spontanee}}$ P. bianco, P. grigio

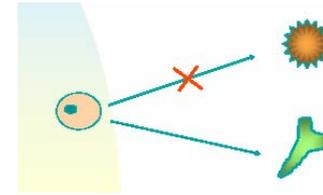
Mutagenesi: induzione artificiale di mutazioni per mezzo di trattamenti fisici, (raggi γ e χ) o di agenti chimici (Anni 1950-1960).

No risultati commerciali apprezzabili

Altra fonte di variabilità: **variazioni somaclonali**

Selezioni somaclonali per la resistenza a tossine di funghi o ad alte concentrazioni di sale non hanno dato buoni risultati.

In tempi recenti maggior interesse per tecniche di ingegneria genetica.



Microspore Embryogenesis

La riprogrammazione dello sviluppo delle microspore aploidi porta alla formazione di un embrione.
Si coltivano le antere o direttamente le microspore su un mezzo opportuno fino ad ottenere le piante.

Vantaggi:

Generare un largo numero di piante aploidi
Esporre tratti recessivi normalmente mascherati dagli alleli dominanti

Gli individui aploidi che si ottengono sono però sterili. Si può indurre la duplicazione del materiale genetico trattando la pianta aploide o l'embrione androgenico con sostanze come la colchicina che inibisce la formazione del fuso mitotico così che sono prodotte cellule con due corredi cromosomici (diploidi o doppio aploide o diploidi omozigoti) in grado di riprodursi



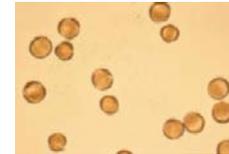
Si selezionano i fiori con le antere contenenti le microspore aploidi.

Distruzione delle antere e isolamento delle microspore

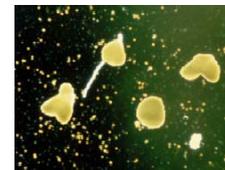
Coltura di microspore in sospensione e trattamento in condizioni specifiche per l'induzione dell'embriogenesi (solitamente shock termico).

In alcune piante l'embriogenesi può essere indotta in modo irreversibile elevando la temperatura delle microspore in coltura da 18 a 32°C per almeno 8 ore.

La coltura delle microspore a 18°C comporta il normale sviluppo del polline.



Microspore in sospensione



Embrioni di 7-10 giorni



Embrioni di 21 giorni



Embrioni maturi



Piantine su petri

PROTOPLASTI

Le cellule delle piante vengono private della loro parete (trattamento con cellulasi e pectinasi) e trasformate in protoplasti, neoformazioni molto delicate da mantenere in vita.

Sono in grado di ricostituire una parete cellulare, riprodursi dando origine ad ammassi cellulari e, quindi, a piante rigenerate e micropropagate.

I Protoplasti hanno un'importante caratteristica:

possono fondersi in seguito a trattamento con agenti chimici con altri protoplasti anche di specie o generi diversi originando ibridi somatici (ibridi somatici poliploidi) che possiedono le caratteristiche di entrambe le cellule originali.

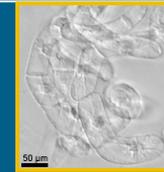
Da questi si ottengono i calli da cui per organogenesi si svilupperanno nuove piantine.

Tecnica molto vantaggiosa per ottenere nuove varietà di piante coltivate e come alternativa al DNA ricombinante per il trasferimento di caratteri.
Es. Gene per la resistenza al diserbante atrazina trasferito dalla specie resistente *Solanum nigrum* alla comune patata (*S. tuberosum*).

Normal gravity conditions: protoplasts regenerate into plants.



Protoplasts
1. Plant cells with cell wall artificially removed



2. regeneration into intact cells with cell wall



3. Callus formation



4. Plant regeneration starts in tissue culture from callus



5. Plant from tissue culture



6. New tobacco plant

CONSERVAZIONE DEL GERMOPLASMA

Le tecnologie "in vitro" offrono dei metodi complementari o alternativi alla conservazione del germoplasma.

Distinguiamo due principali metodi di conservazione: la conservazione per crescita minima e la crioconservazione.

La conservazione per crescita minima consiste nel rallentare la crescita degli espianti in maniera tale da allungare la durata di ciascuna subcoltura da circa 30 giorni ad almeno un anno. Tale scopo viene raggiunto agendo sulle condizioni fisiche, nutrizionali o mediante l'aggiunta di particolari regolatori di crescita.

La crioconservazione rappresenta il principale strumento per la conservazione a lungo termine e la costituzione di banche di geni per lo scambio internazionale. Essa si basa sulla riduzione ed il successivo arresto delle funzioni metaboliche del materiale biologico, conservandone la piena vitalità.

Tale scopo viene raggiunto portando gli espianti a valori di temperatura ultra bassa (-80°C) o preferibilmente sfruttando le proprietà dell'azoto liquido (-195°C).



Coltura *in vitro* della Vite

Le biotecnologie in questa pianta sono state sviluppate per superare alcune limitazioni che ostacolano il miglioramento genetico basato su tecniche tradizionali e in particolare sull'incrocio:

- Ciclo vitale della pianta particolarmente lungo
- Elevata eterozigosi
- Notevole bagaglio di alleli recessivi per caratteri deleteri.

I primi lavori sulla coltura *in vitro* di questa pianta risalgono agli anni '40. Tuttavia la vite è ancora considerata una delle piante difficili da manipolare *in vitro*.

La **micropropagazione** per la vite viene effettuata per:

- conservare germoplasma,
- ottenere piante virus- esenti

Possono essere utilizzate gemme apicali e ascellari o apici frammentati. Tra i numerosi vantaggi di questa tecnica ricordiamo la possibilità di moltiplicare, rapidamente e indipendentemente dai ritmi stagionali un gran numero di individui che costituiscono una popolazione di cloni geneticamente omogenea.



Tecniche largamente impiegate sono la **coltura degli ovuli fecondati** e degli **embrioni zigotici immaturi**.

Mentre la rigenerazione da **protoplasti** è la tecnica meno sviluppata e le colture da queste cellule sono state utilizzate principalmente per studi di tipo fisiologico



Come altre specie di interesse agrario, la vite può essere infetta da virus che, pur raramente provocando la morte della pianta, ne alterano la morfologia e ne disturbano la fisiologia con effetti spesso gravi su aspetti quantitativi e qualitativi dello sviluppo e della produzione.

Non essendo le malattie virali curabili con trattamenti in campo, l'unico modo per controllarle rimane la prevenzione, ovvero l'impianto di materiale di **propagazione sano**.

Numerosi cloni risanati da virus di varie cultivar sono stati ottenuti negli ultimi anni, frutto dell'impiego di **biotecnologie** (es. **Test per individuare la presenza di Fitoplasmii - eubatteri privi di parete cellulare, Termoterapia - colture in vitro di apici meristemati**).

E' possibile risanare da accartocciamento fogliare dovuto a virus floematici (Closterovirus) trasmessi da vettori coccidi, le piante infette mediante coltura in vitro di apici meristemati e termoterapia, da soli o in combinazione tra loro.

La termoterapia in vivo si è dimostrata efficace in misura variabile dal 20 al 50% verso GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3, mentre risultati più favorevoli, con percentuali di risanamento fino al 100%, sono stati ottenuti con trattamenti su materiale in vitro.

Anche con la sola coltura in vitro di apici meristemati si sono ottenuti risultati confortanti, con percentuali di piante risanate talvolta prossime al 100%.

Tra le tecniche di rigenerazione, per le prospettive di studio e per fini applicativi, **l'embriogenesi somatica** rappresenta anche per la vite uno degli aspetti più importanti delle colture in vitro.

Questa via morfogenica è definita come:
"l'induzione da tessuti somatici di embrioni analoghi ai corrispondenti embrioni zigotici di cui vengono ripercorsi gli stessi stadi di sviluppo" (Ammirato 1983).

Questi studi nella vite hanno cominciato a svilupparsi negli anni '70



Le prime germinazioni da embrioni somatici sono state ottenute nell'ibrido Gloryvine (*V. vinifera* X *V. rupestris*).

Nel 1977 sono state rilasciate in campo (Maryland, USA) le prime piante da embrioni somatici di una cultivar di interesse commerciale.

Nel 1985 è stato rilasciato un brevetto americano relativo ad un protocollo per ottenere embriogenesi somatica in vite a partire da tessuto di antere.

Da allora sono riportati in letteratura ulteriori successi di germinazione di piantule *in vitro*, ed embriogenesi somatica è stata ottenuta:

- in varie specie quali *V. riparia*, *rotundifolia*, *rupestris*,
- in ibridi interspecifici (incroci tra *V. rupestris* X *V. vinifera*)
- in alcune cultivar di *V. vinifera* (Cabernet sauvignon, Chardonnay, Sultana moscato)



Scopi dell'Embriogenesi somatica nella vite

L'embriogenesi somatica nella vite è stata utilizzata soprattutto per risanare virusi e recentemente per realizzare semi artificiali per la conservazione del germoplasma.

L'approccio biochimico e molecolare per comprendere i meccanismi che determinano l'embriogenesi somatica della vite è stato preso in considerazione in vari studi.

Uno dei primi studi in tal senso è stato effettuato in *V. rupestris* in cui sono stati caratterizzati i cambiamenti biochimici associati alle principali tappe morfogenetiche nello sviluppo da callo a piantula mediante analisi elettroforetica bidimensionale delle proteine totali (Martinelli et al. 1993).

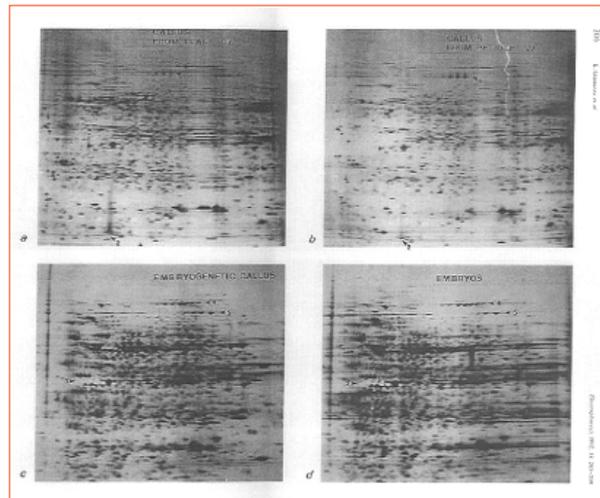
La conoscenza degli eventi morfogenici è importante anche al fine di superare i vari ostacoli che rendono difficile la rigenerazione *in vitro* di questa pianta.



In particolare, nell'ambito di programmi di ricerca con il principale obiettivo di stabilire le condizioni ottimali per la rigenerazione *in vitro* delle diverse specie di *Vitis*, il riconoscimento di distinti polipeptidi che possano essere messi in relazione con i passaggi da callus indifferenziato a embrione e da embrione a plantula potrebbe permettere un precoce riconoscimento, mediante marcatori Biochimici, di un cambiamento nel corso del differenziamento.

ES.

Se tra 100 micropropagazioni solo 30 arrivano a generare nuove plantule, grazie all'uso di tali markers biochimici potremmo essere in grado di individuare precocemente i fattori proteici responsabili del mancato differenziamento.



Da Giannazza et al. 1992., *Electrophoresis* 13: 203-209



Annals of Botany 78: 23-28, 1996

(Faure et al.)



Ontogenesis, Differentiation and Precocious Germination in anther-derived Somatic Embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): proembryogenesis

Nella vite l'embriogenesi somatica può essere iniziata da vari tipi di espianti come le foglie, gli ovuli, o gli embrioni zigotici immaturi ma il metodo più comunemente utilizzato è basato sulla coltura di antere (comprendono quindi tessuti sporofitici e gametofitici).

Gli embrioni ottenuti dalla coltura *in vitro* di antere derivano principalmente da cellule diploidi del tessuto connettivo e sono quindi di origine somatica.

I calli derivati dalle antere possono essere mixoploidi e contenere due popolazioni cellulari una diploide di origine somatica, e l'altra aploide che deriva dal polline ma non capace di dare embrioni vitali.

Dimostrazione senza ambiguità che *in vite* gli embrioni somatici derivati da antere sono principalmente di origine somatica e non derivano dalle microspore.



Am. J. Enol. Vitic. 55(4):427-430 (2004) Abstract



**Somatic Embryogenesis from Grapevine Anthers:
The Optimal Developmental Stage for Collecting Explants**
Ivana Gribaudo,^{1*} Giorgio Gambino,² and Rosalina Vallania¹

Abstract: In grapevine, anther culture is often used to obtain somatic embryos.

We identified the best developmental stage to initiate immature anther culture, in relation to the microsporogenesis and the outward appearance of anthers and flowers.

Three grape genotypes were observed for common features.

Six individual stages were identified, from when the pollen mother cells were in premeiotic phase, the inflorescence was compact, and the anthers were translucent green, to the stage when anthers were opaque yellow and uninucleate pollen had been formed.

Optimal somatic embryogenesis was obtained for *Vitis vinifera* L. cvs. Chardonnay and Barbera when explants were collected at early stages.

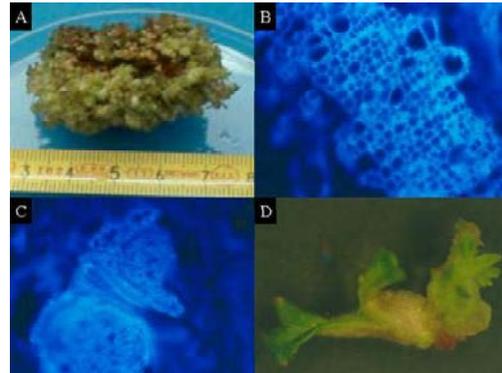


Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis
Mezzetti et al. 2002

Masse meristematiche (aggregati cellulari con elevata capacità di rigenerazione) formate in vitro a partire da foglioline embrionali.



Induzione per organogenesi allo sviluppo di gemme avventizie.



Mezzetti et al. 2002

- A: masse meristematiche in vitro. Stadio di proliferazione
- B: sezione interna che mostra un iper accrescimento delle cellule del parenchima*
- C: nodulo da cui si svilupperà la gemma avventizia
- D: Gemme avventizie

* Parenchima: Tessuto adulto, definitivo, ove hanno sede le funzioni vegetative più importanti della pianta e che costituisce l'apparato corporeo dell'organismo. Vengono distinti in base alla funzione svolta diversi tipi di parenchima tra cui: parenchima clorofilliano, parenchima di riserva, parenchima conduttore ecc.



La vinificazione avviene grazie alla complessa azione dei lieviti che trasformano lo zucchero in alcol, provocando la cosiddetta **fermentazione alcolica**.

Durante questa azione avvengono migliaia di processi chimici che danno origine alla complessa struttura del vino.

Sebbene la fermentazione alcolica tenda ad avvenire spontaneamente dopo la spremitura dell'uva, generalmente vengono aggiunti al mosto lieviti selezionati che garantiscano uno svolgimento ottimale del processo.



Quattro chiacchiere sulla fermentazione:
Lieviti e Batteri



Nella creazione del vino sono coinvolti dei microorganismi e sono fondamentalmente di due tipi:
- i lieviti e i batteri

Che cosa sono lieviti e batteri?

I batteri sono organismi procarioti, con un grado di evoluzione complessivamente minore rispetto ai lieviti (eucarioti) ma possono agire sul mosto e sul vino in modo incisivo.

Occorre pensare ai lieviti come a microscopici funghi unicellulari responsabili delle fermentazioni, cioè della trasformazione del mosto d'uva in vino attraverso l'utilizzo dello zucchero presente.



I batteri sono organismi PROCARIOTI UNICELLULARI ed esistono in forme morfologiche diverse.



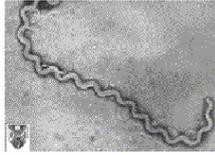
Esistono tre forme principali di batteri, in base alle quali vengono classificati:

- a bastoncino "BACILLI"
- a sfera "COCCHI"
- a spirale "SPIRILLI"

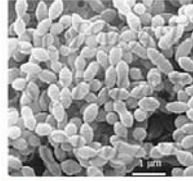


Bacillum

2 µm



Spirillum



Cocci



Funghi



I funghi, come i batteri, sono molto diffusi in natura, anche se vivono generalmente nel suolo ed in regioni con minore umidità rispetto ai batteri.

Di queste importanti forme vegetali ricordiamo i due sottogruppi che interessano direttamente le applicazioni biotecnologiche:

lieviti



muffe



Batteri aerobi ed anaerobi

I batteri sono presenti in tutti gli ambienti naturali: terreno, acqua, piante oppure all'interno di animali e vegetali. Alcuni batteri hanno bisogno per sopravvivere di un ambiente contenente ossigeno (aerobi obbligati) altri possono vivere anche o solo in assenza di ossigeno (anaerobi facoltativi od obbligati).



Lieviti

I lieviti sono un sottogruppo dei funghi. Nonostante la maggior parte dei funghi abbia una morfologia relativamente complessa, i lieviti si caratterizzano per il fatto che generalmente esistono sotto forma di piccole cellule singole dell'ordine di micron.

Utilizzi industriali dei lieviti

I lieviti sono forme di microrganismi molto importanti dal punto di vista industriale. L'attività anaerobica dei lieviti è infatti da sempre usata per produrre birra e vino.



Saccharomyces cerevisiae



I lieviti sono funghi microscopici che appartengono, per la maggior parte, agli **Ascomiceti** (1 delle 4 sottodivisioni della divisione **Eumycota**).

I lieviti si trovano sulla buccia dell'acino maturo, dove sono trattenuti dalla pruina (copertura cerosa della buccia a forma di scaglie).

La loro disseminazione nel vigneto è dovuta a Drosophile (piccole mosche abbondanti attorno al materiale vinario).

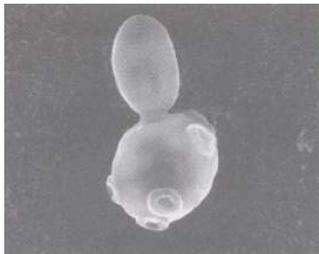
Dopo la vendemmia, gran parte dei lieviti muore: tuttavia alcuni sopravvivono allo stato di spore, nel suolo e nei magazzini.

La primavera seguente attendono solo un ambiente favorevole per svilupparsi di nuovo.

Nei paesi tradizionalmente viticoli, i lieviti, riproducendosi anno dopo anno, si sono a poco a poco adattati al clima e alla natura della vendemmia. Grazie a una vera e propria selezione naturale si sono creati dei "ceppi" di lieviti autoctoni.

Struttura

La struttura generale del lievito è quella della cellula vegetale: è formato da una parete cellulosica che racchiude un citoplasma, il quale a sua volta tiene in sospensione un nucleo e diverse inclusioni. L'aspetto del lievito varia con l'età: quando è giovane possiede un citoplasma omogeneo ialino e incolore e comprende un solo vacuolo; quando invecchia la membrana cellulosica si corruga, si ispessisce, mentre il citoplasma diventa granuloso.



Saccharomyces Cerevisiae
Cellula vecchia con vistosi anelli cicatriziali: ad ogni anello corrisponde una gemmazione (x 8000)

Riproduzione

I lieviti sporigeni, secondo le condizioni ambientali, possono riprodursi in due modi diversi (gemmazione o producendo spore (sessuata)).

Gli asporigeni, si riproducono solo per gemmazione e qualche volta per scissione (riproduzione asessuata)

Per gemmazione: Il nucleo della cellula si sposta verso la membrana, si distende, si divide, dando origine a una piccola gemma sulla superficie della cellula. Questa cresce rapidamente per dare origine ad una cellula-figlia che può o meno staccarsi dalla cellula-madre e che si riprodurrà a sua volta per gemmazione.

Un solo lievito può così molto rapidamente produrre milioni di cellule. E' il metodo di riproduzione che si incontra nella fase attiva della fermentazione.

Per scissione: Il nucleo si distende e si divide in due; contemporaneamente si avvia, a livello della membrana, una separazione che porta alla formazione di due cellule.





Esaminiamo ora la riproduzione sessuata.
Quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli (temperature troppo alte o troppo basse, mancanza di elementi nutritivi), subentra la riproduzione sessuata.

In particolare cellule di lievito $2n$ subiscono meiosi e diventano delle ascospore (n) racchiuse in un asco.

Le ascospore si trovano in uno stato di vita rallentata e riprenderanno la loro vita attiva solo quando le condizioni ambientali saranno favorevoli. Le ascospore rappresentano il metodo di sopravvivenza dei lieviti durante la cattiva stagione. E' sotto questa forma che si possono trovare sulla buccia dell'acino d'uva, nelle fecce del vino, nei tini.

La fusione di due ascospore di sessualità opposta formerà la generazione $2n$, da cui siamo partiti

L'uso di lieviti selezionati è ormai diffuso in enologia: si tratta di colture di lieviti prescelti per le loro ottime qualità enologiche, che contribuiscono a produrre vini di qualità ed a migliorarne la conservazione.

La fermentazione con lieviti selezionati porta molti vantaggi:

- un inizio più rapido della fermentazione,
- una conduzione migliore della stessa,
- maggiore conservabilità dei vini.

Importante nell'utilizzo di questi lieviti è creare un buon piede di fermentazione cioè una base di mosto inoculato con lieviti che fermenti bene, utilizzando mosto pulito, ad esso si unisce il resto della massa di mosto in modo lento perché non ci siano arresti nel processo.

Guidare e controllare la fermentazione, poi, è una questione di temperatura e di solfitazione.

In commercio esistono molti tipi di lieviti selezionati e la scelta di un tipo invece che di un altro diventa molto importante: infatti per ogni qualità d'uva si può scegliere il lievito selezionato migliore e soprattutto si può scegliere il lievito che ci aiuterà a produrre il tipo di vino che noi vogliamo.

Anche a questo punto che entra in gioco la figura dell'enologo: è a lui, infatti, che spetta la scelta dei lieviti.



Miglioramento genetico e lieviti



BIOTECNOLOGIE IN ENOLOGIA *Saccharomyces cerevisiae*

Il programma si basa sull'assunzione che le caratteristiche dei ceppi di lievito debbano essere legate a differenze presenti nel loro GENOMA.

L'ottenimento quindi delle mappe del loro fenotipo polipeptidico e la conseguente caratterizzazione biochimica potranno essere di valido aiuto agli operatori nel settore enologico.

Il lavoro può essere effettuato avvalendosi, sia di tecniche elettroforetiche (2D-PAGE) accoppiate ad analisi computerizzata, sia di tecniche biotecnologiche (sequenziamento, tecniche cDNA, ecc.) per la caratterizzazione delle specie proteiche depositarie della capacità di influenzare la vinificazione.



Studio dell'espressione genica di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* impiegati nella vinificazione.

Il *Saccharomyces cerevisiae* svolge un ruolo chiave nel processo di fermentazione alcolica. Alla capacità fermentativa di tale lievito sono legate alcune problematiche che interessano la vinificazione, principalmente l'avvio e la possibilità di rallentamenti o blocchi causati dall'instaurarsi di condizioni sfavorevoli quali carenze nutrizionali, carenza di ossigeno, inibizione da substrato, tossicità da etanolo, shock termico.

Gli obiettivi di queste di ricerche sono:

- 1) selezionare uno o più ceppi di lievito in grado di portare a termine la fermentazione anche in condizioni di stress chimico fisico e biologico e capaci di incidere in maniera positiva sulle caratteristiche qualitative del vino;
- 2) definire i meccanismi cellulari di risposta agli stress ambientali attraverso l'identificazione della natura e delle funzioni biochimiche delle proteine sintetizzate alle quali è legata la capacità di superare tali condizioni critiche.

Per raggiungere tali obiettivi è stato analizzato il corredo proteico dei ceppi di *S.cerevisiae* durante le varie fasi della fermentazione ed in differenti condizioni nutrizionali impiegando tecniche di elettroforesi bidimensionale accoppiate con tecniche di immunoblotting e microsequencing.



Modificazioni dell'espressione proteica di un ceppo di lievito nella vinificazione del "Sangiovese"

Santucci et al. Università di Siena

Studio sull'espressione genica di un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzato per la produzione di vini D.O.C.G. ottenuti dal Sangiovese.

L'entità e la variazione dell'espressione proteica sono state messe in correlazione con la variazione della concentrazione di glucosio durante il processo fermentativo.

L'esaurimento del glucosio nel terreno di coltura risulta non solo in un arresto della proliferazione cellulare ma anche in un incremento della sintesi di alcuni enzimi associati all'utilizzo di composti carboniosi diversi dal glucosio.



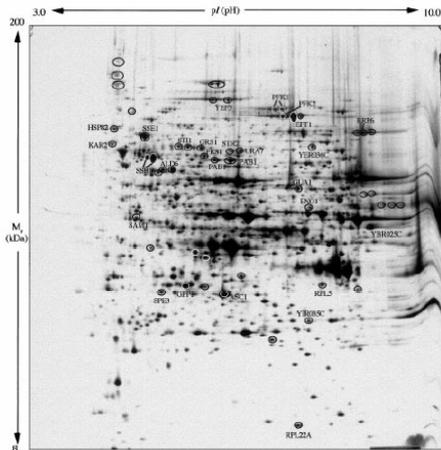
Segue....

E' stata osservata una stretta correlazione fra la concentrazione di glucosio nel mezzo e la conseguente modulazione dell'espressione proteica.

Quest'ultima è stata studiata mediante elettroforesi 2D. L'analisi è stata condotta comparando le mappe 2D di lievito cresciuto in differenti condizioni nutrizionali (glucosio nel mezzo di coltura) e prelevato a tempi diversi della fermentazione alcolica.

E' stata osservata una variazione delle proteine sintetizzate in funzione della diversa concentrazione di glucosio presente all'inizio della fermentazione e nelle fasi successive.

Adattamento alle diverse condizioni ambientali e capacità di fronteggiare fasi critiche della fermentazione impedendo fenomeni di arresto o rallentamento dovuti a limitazione di glucosio.





Gli estratti proteici di lieviti raccolti dopo 16h di crescita (100 g/l di glucosio nel mezzo di coltura), 22 h (30 g/l) e 44 h (0 g/l) sono stati analizzati mediante elettroforesi 2D.

Sono riportati solo i gels di 16 h e 44 h poiché i gels di 22 h non differivano sostanzialmente da quelli a 16 h.

Dei circa 2500 spots totali, 54 spots erano presenti tipicamente solo nel gel a 16 h, mentre 138 apparivano solo nel gel a 44 h.

La maggior parte di questi ultimi spots erano presenti nella parte più bassa del gel corrispondenti a pesi molecolari al di sotto di 30.000 kDa.

Molte di queste proteine sono state identificate mediante analisi MS come enzimi implicati nel metabolismo del C.

Pochi altri spots variavano per la loro densità indicando una minore o maggiore espressione.



Miglioramento genetico dei lieviti

Molto utili saranno le conoscenze che possono derivare dall'uso della tecnologia dei chip DNA e della proteomica sul ruolo svolto dal lievito *S. cerevisiae* nel processo di fermentazione.

Il genoma del lievito *S. cerevisiae* è stato completamente sequenziato (circa 6.000 geni).

E' possibile evidenziare e confrontare in diversi ceppi profili di espressione dei geni coinvolti nel processo fermentativo, dei geni responsabili dell'adattamento fisiologico a stress che possono portare a fermentazioni anomale o al loro blocco.

Questa via ha, per esempio, permesso di visualizzare le modificazioni nei livelli di attività di geni durante la fermentazione condotta da un ceppo vinario di *S. cerevisiae* in condizioni differenti di disponibilità di N.

Le nuove conoscenze acquisite con le discipline dell'era post-genomica (DNA microarray, proteomica) potranno allargare la comprensione del ruolo svolto dal lievito del vino nel processo di fermentazione.