

XXIV SEMINARIO TECNICO
LUNEDI 26 MARZO 2012 - 46° VINITALY

APPASSIMENTO: QUALI UVE?

LE RISPOSTE DELLA GENETICA E DEL BICCHIERE

STUDIO COMPARATO DI VARIETÀ SOTTOPOSTE AD APPASSIMENTO
CON ANALISI TRASCRIPTOMICA E METABOLOMICA

RICERCHE DEL GRUPPO TECNICO MASI E DELL'UNIVERSITÀ DI VERONA
DEGUSTAZIONE TECNICA



Introduzione
Presentazione analisi di laboratorio
Relazione Scientifica

Degustazione tecnica
Moderatore:

Lanfranco Paronetto – Gruppo Tecnico Masi
Vittorio Zandonà – Gruppo Tecnico Masi
Flavia Guzzo, Giambattista Tornielli, Sara Zenoni – Università
di Verona, Dipartimento di Biotecnologie
Andrea Dal Cin – Gruppo Tecnico Masi
Raffaele Boscaini – coordinatore Gruppo Tecnico Masi

CENTRO DI GENOMICA FUNZIONALE
VEGETALE, DIPARTIMENTO DI
BIOTECNOLOGIE, UNIVERSITÀ DI VERONA



INSTITUT DES SCIENCES DE LA VIGNE ET DU VIN
BORDEAUX, AQUITAINE, FRANCE

CONTENUTI

PAG 4	INTRODUZIONE <i>Raffaele Boscaini</i>
PAG 5	I SEGRETI DELLA CORVINA SVELATI DALLA GENETICA <i>Lanfranco Paronetto</i>
PAG 9	INQUADRAMENTO DELLA SPERIMENTAZIONE E LA DIVERSA RISPOSTA VARIETALE DELLE UVE IN FASE DI APPASSIMENTO <i>Vittorio Zandonà</i>
PAG 12	L'ESPRESSIONE GENICA E IL METABOLOMA SVELANO LE DINAMICHE DELL'APPASSIMENTO DELL'UVA <i>Sara Zenoni – Flavia Guzzo – Giambattista Tornielli</i>
PAG 18	DEGUSTAZIONE TECNICA <i>Andrea Dal Cin</i>
PAG 22	IL GRUPPO TECNICO MASI

INTRODUZIONE

Raffaele Boscaini

La lunga tradizione vitivinicola della famiglia Boscaini ha tramandato attraverso sette generazioni il "mestiere" di fare l'Amarone e quindi quello di appassire le uve in Valpolicella. Durante questo periodo di tempo, che si estende per circa 250 anni, si è stratificata ed è stata messa in pratica una straordinaria quantità di esperienze, usi, conoscenze, ma anche piccoli trucchi e segreti. Questo patrimonio di informazioni non codificate non sono altro che frutto dell'osservazione, di continui tentativi attraverso gli anni che hanno portato, uno dopo l'altro, alla definizione di una serie di modi di operare scelte e di lavorare il prodotto tanto in vigna quanto in cantina. A tutt'oggi, in effetti, possiamo ancora verificare la bontà dei detti del nonno, così come certe ritualità continuano ad avere un ruolo nelle fasi di produzione dell'Amarone.

E' chiaro però che al giorno d'oggi non possiamo più accontentarci di modalità che non hanno una validazione scientifica. In Masi, quindi, attraverso il Gruppo Tecnico, da circa un trentennio portiamo avanti un'importante attività di studio e sperimentazione con i principali enti di ricerca del nostro settore, presentando e condividendo i risultati con l'affezionata audience dell'annuale Seminario - che include studiosi, appassionati e produttori - e introducendo nei nostri vini le innovazioni che ne possono derivare.

Con questo ventiquattresimo appuntamento del Seminario Masi andremo a concludere lo studio del quale lo scorso anno avevamo mostrato le prime evidenze. Anche in quest'occasione troviamo conferma di qualcosa di cui avevamo nozione. Grazie alle analisi genetiche, condotte dal dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona, avevamo mostrato come l'appassimento non sia solamente una questione di concentrazione, bensì una fase attiva. Ora, con il completamento della ricerca, siamo giunti ad un'ulteriore importante verifica di quanto da tempo osservato: le singole varietà reagiscono in maniera diversa all'appassimento e di conseguenza le uve danno risultati non sempre positivi quando sottoposte a questa pratica. Nelle pagine che seguono sono riportati le fasi della ricerca, le evidenze rilevate nei laboratori, ma anche nei vini, risultato delle microvinificazioni effettuate.

Il raggiungimento di standard sempre più elevati, al quale questi studi puntano, è diretto non soltanto alla qualità del prodotto fine a se stessa, ma anche all'integrazione della filiera produttiva, alla valorizzazione e al rispetto di un territorio che è fatto di storia, tradizioni, paesaggi, gusti e stile di vita.

I SEGRETI DELLA CORVINA SVELATI DALLA GENETICA

Lanfranco Paronetto

L'applicazione sempre più frequente della genetica alla viticoltura e all'enologia sta aprendo un mondo nuovo e affascinante per la comprensione di moltissimi fenomeni che osserviamo costantemente e che interrogano spesso l'intelligenza dei tecnici e degli appassionati di vino.

La viticoltura comprende non solo lo studio della vite, del comportamento delle varie cultivar e della loro reazione ai diversi stimoli ambientali, concretizzati dal clima e dal terreno, ma anche la risposta della pianta alle sollecitazioni colturali dei vari interventi agronomici effettuati dal viticoltore.

Certamente sono eventi complessi, interferiscono gli uni con gli altri, obbediscono a leggi non sempre ben conosciute e difficili da capire e controllare. I progressi della ricerca ci offrono oggi con la genetica, strumenti molto sofisticati, capaci di introdurci ad un approfondimento finora impensabile dei fenomeni in gioco. La genetica ci porta, infatti, alla fonte della vita, alle molecole che contengono le informazioni essenziali sui meccanismi vitali, informazioni che vengono ripetute sempre allo stesso modo e che presiedono ai meccanismi fondamentali di formazione e di funzionamento delle specifiche molecole costituenti l'espressione stessa della vita.

I meccanismi della genetica

La genetica ci spiega che un organismo vivente, è quello che è perché le particolari determinate strutture molecolari e componenti chimici di cui è costituito, sono accuratamente previste e preordinate nel suo codice genetico, **la molecola del DNA**, l'Acido Desossiribonucleico, contenuto nel nucleo di tutte le sue cellule.

Il DNA è un polimero molto complesso costituito fra l'altro, dalla successione di quattro molecole fondamentali chiamate basi azotate o basi nucleotidiche che sono l'Adenina, la Guanina, la Citosina e la Timina. Queste basi azotate si ripetono, apparentemente a caso, innumerevoli volte e costituiscono un lungo filamento che si dispone a spirale attorno ad un altro filamento simile (la famosa doppia elica), in modo tale che alla Adenina di un filamento corrisponda sempre la Timina dell'altro e alla Guanina corrisponda sempre la Citosina.

La proprietà del DNA sono essenzialmente due: una è la capacità di riprodurre se stessa srotolando la doppia elica e facendo in modo che ogni filamento faccia da stampo per un'altra sequenza di basi azotate, riproducendo il filamento omologo e ricostituendo successivamente due doppie eliche; la seconda è quella di contenere tutte le informazioni necessarie alla costruzione e costituzione dell'organismo cui appartiene.

Un segmento relativamente piccolo di DNA costituito da circa 1000 paia di basi azotate, forma un **gene** che si può così considerare l'unità genetica che contiene le informazioni minime sufficienti a far produrre alla cellula uno di quei costituenti fondamentali per la sua esistenza e per il suo funzionamento che sono le proteine strutturali o quelle funzionali. Evidentemente ogni cellula è parte di un organo ben preciso, con precise funzioni dell'organismo vivente e molti e specifici devono essere i suoi costituenti. Per questo ogni cellula è la sede dell'espressione di numerosi geni.

In ogni nucleo di ogni cellula dell'organismo esiste tutta la informazione costitutiva dell'intero organismo, ma con meccanismi molto sofisticati vengono attivati di volta in volta soltanto quei geni capaci di far produrre le proteine specifiche dell'organo cui fa parte la cellula stessa.

Nelle cellule della foglia sono attivi i meccanismi propri della foglia (es: fotosintesi clorofilliana), nelle cellule della bacca sono attivi successivamente i meccanismi di accumulo e trasformazione dei suoi costituenti (es: accumulo di zuccheri, trasformazione degli acidi).

Evidentemente in ogni cellula un numero considerevole di geni non può essere espresso, perché contengono le informazioni di produzione e metabolismo propri di altri organi della pianta. Ma anche gli stessi geni di cellule dello stesso organo, specifici per codificare strutture o funzioni proprie, subiscono un controllo molto severo per cui vengono **attivati – vengono accesi - solo quei geni che portano le informazioni adatte a produrre le proteine** che servono in quel preciso momento. Altri geni sono “spenti” in attesa di ricevere il “permesso” di attivazione quando la cellula necessita delle proteine che essi sono in grado di codificare e far produrre.

Come è noto nel 2007 si è arrivati alla decodifica dell'intero genoma della vite, si conosce perciò tutta la sequenza dei 500 milioni di basi nucleotidiche che costituiscono i 19 cromosomi che ne compongono l'intero DNA. Il progresso tecnologico è stato inoltre in grado di rendere decisamente più veloce l'analisi dei singoli geni consentendo di sapere quali siano quelli “attivi” e quelli “spenti” in ogni organo della pianta e in qualsiasi momento si desidera conoscerne lo stato.

I geni attivi sono tali perché capaci di trasmettere l'informazione che contengono ad un'altra molecola molto simile al DNA, l'mRNA (RNA messaggero) chiamato così perché porta il messaggio che contiene ai mitocondri, le particelle della cellula vegetale preposte a supportare la sintesi proteica.

La tecnica analitica *dei micro-array* mette in evidenza i geni attivi in un determinato momento, perché capace di rilevare l'esistenza di quel mRNA sollecitato dalla accensione di ciascun gene. Evidenziando quello che accade durante la fase di trascrizione del messaggio dal gene alla proteina, questo tipo di analisi si chiama “**trascrittomica**”.

Se invece si desiderasse mettere in evidenza le proteine prodotte dal meccanismo di trascrizione si deve parlare di “**proteomica**”; l'analisi dei metaboliti, conseguenza dell'attività proteica ed enzimatica dei prodotti della trascrizione si chiama “**metabolomica**”.

La genetica e l'appassimento

Al momento della vendemmia l'uva presenta un'elevata attività genica dovuta a tutti i meccanismi correlati con il fenomeno della maturazione. La raccolta dell'uva costituisce un brusco distacco del frutto dalla pianta e conseguentemente si vengono a troncare tutti gli scambi esistenti fra pianta e frutto. Una logica deduzione di questo fatto potrebbe far pensare che i geni attivi al momento della raccolta si vadano gradatamente ma velocemente inattivandosi - "spegnendosi" - con l'arresto di qualsiasi attività metabolica; gli studi condotti dai ricercatori del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona sull'uva durante l'appassimento tradizionale ha messo in evidenza un comportamento inaspettato di moltissimi geni.

Riassumendo i dati già mostrati nel seminario dello scorso Vinitaly si può dire che:

- Le cellule dell'acino non muoiono, come sembrerebbe logico, dopo il distacco dalla pianta, ma sono in grado di modificare il loro metabolismo per contrastare le condizioni di stress dovute alla loro nuova condizione. Ciò viene dimostrato proprio dalla possibilità di mettere in evidenza l'esistenza di molti tipi di mRNA corrispondenti a diverse attività geniche.
- Il numero di geni che vengono coinvolti durante la fase di appassimento delle uve è notevole, approssimativamente 1/10 dei totali.
- L'induzione genica è abbastanza precoce e rilevabile già dopo 10 giorni dalla raccolta.
- Le variazioni di espressione genica sono rilevabili ed evidenti fino all'ultimo stadio di appassimento (100 giorni).

Le differenze fra Corvina ed altre varietà

La ricerca citata ha analizzato l'espressione genica, durante il periodo di sosta in fruttajo per l'appassimento, di 9 vitigni di cui due bianchi, lo Chardonnay e la Garganega, e sette rossi: il Cabernet, il Merlot, il Syrah, il Sangiovese, il Marzemino, l'Oseleta e la Corvina.

Le varietà considerate non sono molte, ma sono sicuramente fra le più importanti e scelte in modo da considerare vitigni internazionali come lo Chardonnay, il Cabernet, il Merlot e lo Syrah, vitigni nazionali, come il Sangiovese, e vitigni locali, trentini come il Marzemino e veronesi come la Corvina, l'Oseleta e la Garganega. Inoltre, la scelta è stata fatta anche in relazione alla diversa attitudine alla disidratazione delle varie cultivar, un parametro generalmente trascurato, anche se probabilmente di considerevole importanza. La Corvina, la Garganega e il Sangiovese necessitano di un tempo decisamente superiore, circa il doppio dello Syrah e dello Chardonnay, per portare a termine l'appassimento tradizionale; il Cabernet, il Merlot, il Marzemino e l'Oseleta mostrano un comportamento intermedio. I risultati saranno spiegati in dettaglio dagli stessi ricercatori che li hanno ottenuti e dimostrano in sostanza che se si possono individuare degli andamenti comuni a tutte le varietà nella loro espressione genica durante l'appassimento, **l'intensità di questa espressione è però decisamente più elevata nella Corvina**; il livello di induzione si mostra più intenso in alcuni casi di circa 100 volte rispetto alle altre varietà.

Dalla trascrittomica alla metabolomica

Considerare la lista di geni che si accendono o si spengono durante l'appassimento è indubbiamente un risultato di grande interesse, ma certamente parziale ed incompleto se non si è in grado di assegnare una funzione a ciascuno di essi, se non si è in grado cioè di comprendere gli effetti metabolici della loro attivazione sulla bacca, ovvero a quale conseguenza qualitativa portano sulla composizione chimica dell'uva.

Un primo approccio consiste nel cercare di arrivare alla comprensione dei fenomeni mediante una rappresentazione lineare che consiste nel considerare la sequenza genica del sistema biologico, (cioè la successione geni-trascritti-proteine-metaboliti) e nello scoprire per ogni caratteristica costituzionale o funzionale, l'accoppiamento gene – metabolita. Sapere cioè quali sono le sostanze che vengono prodotte a seguito dell'attivazione di quel particolare gene o gruppo di geni.

Gli studi che riguardano la vite e l'uva sono ancora scarsi, vista la recente decodificazione del genoma della vite e l'esigua quantità di istituzioni capaci di eseguire tale tipo di indagini, ma alcuni passi avanti si stanno facendo e piano piano si potrà associare a ciascun gene il suo metabolita.

Si sta però già superando questa fase, nella consapevolezza che in ogni caso l'interpretazione del meccanismo considerato non può essere che parziale e poco attenta all'insieme dei fenomeni in gioco, poiché il sistema si modifica in funzione delle interazioni con l'ambiente esterno, a stimoli di varia natura, ma soprattutto con situazioni in continua interazione fra loro.

Risposte più interessanti possono essere ricavate dall'analisi metabolomica, la quale è in grado di rappresentare e considerare l'insieme di *tutti* i metaboliti a basso peso molecolare di un organismo biologico (in questo caso l'uva durante il suo appassimento), metaboliti che sono i prodotti finali della sua espressione genica. Si può allora descrivere meglio lo stato reale di un organismo nella sua complessa relazione con le variabili ambientali e nell'interconnessione dei diversi processi.

E' questo il panorama ricchissimo di prospettive che si sta aprendo a riguardo della ricerca, biologica in generale e viticola in particolare, in cui probabilmente si potranno pian piano svelare i meccanismi coinvolti con la pratica veronese dell'appassimento.

E' proprio nella risposta a queste domande che si può svelare il segreto della Corvina: quali sono le sostanze che vengono metabolizzate e quali quelle che vengono prodotte durante l'appassimento? E fra queste, quali sono quelle che hanno un reale impatto qualitativo nella caratterizzazione dell'Amarone?

Gli studi della genetica sollecitati dalla Masi hanno proprio lo scopo di rispondere a queste domande; così gradatamente la ricerca intrapresa comincia a dare i suoi frutti e a svelare pian piano i segreti dell'Amarone.

Uno di questi, forse ovvio, ma ora con evidenze scientifiche e spiegazioni dettagliate, risiede proprio in Verona e nel comportamento particolarmente interessante del suo principale vitigno autoctono: la Corvina.

INQUADRAMENTO DELLA SPERIMENTAZIONE E LA DIVERSA RISPOSTA
VARIETALE DELLE UVE IN FASE DI APPASSIMENTO*Vittorio Zandonà*

Per una approfondita comprensione del fenomeno dell'appassimento è stato studiato il comportamento di alcune varietà (autoctone ed internazionali) depositate in un locale presso il sito di appassimento Masi-Gargagnago, in condizioni controllate.

Si è inteso affrontare il problema mediante due approcci: quello tecnologico (attraverso analisi chimiche e fisiche delle uve in appassimento) e genetico (analisi trascrittomiche e metabolomiche).

Questo lavoro ha coinvolto la Masi Agricola per le analisi di tipo tecnologico e l'Università di Verona (Dipartimento di Biotecnologie) per le analisi genetiche e metabolomiche, per un periodo di due anni (2010-2011).

Le varietà utilizzate sono state scelte in modo da avere la massima variabilità di comportamento delle uve in fase di appassimento per avere un'ampia visione del fenomeno: Merlot, Cabernet, Syrah, Corvina, Oseleta, Sangiovese.

Lo studio si articola attraverso una serie di passaggi: raccolta dell'uva giunta a maturazione, deposizione in locale in condizioni controllate (fruttaio), campionamento secondo protocollo per le relative analisi, microvinificazioni in cantina sperimentale dopo appassimento.

Per quanto riguarda le analisi condotte presso il laboratorio Masi sono stati valutati due gruppi di parametri: fisici (calo peso dell'uva, peso medio della bacca, spessore iniziale della buccia) e chimici (grado zuccherino, acidità totale, acido malico, pH, antociani potenziali, antociani estraibili, tannini da vinaccioli, densità ottica a 280 nm).

Si è posta l'attenzione su 4 parametri particolarmente diagnostici:

- il calo peso del grappolo;
- il grado zuccherino (in particolare il grado baba);
- l'acidità totale;
- gli antociani potenziali.

Particolarmente interessante è la variazione nel tempo del peso del grappolo (vedi grafico 1), che esprime la velocità o meglio la propensione di una varietà alla perdita d'acqua: questo parametro è caratteristico delle cultivar. Possiamo in un certo qual modo descrivere un'uva in base a questa specifica: si distinguono chiaramente **varietà "lente" (come Corvina) e "rapide" (come Syrah)** a parità di condizioni ambientali. Questo parametro mette in luce un secondo aspetto tipico di una varietà: la propensione a "riprodurre" in annate differenti la stessa performance. Si distinguono pertanto **varietà piuttosto stabili negli anni (es.: Corvina, Oseleta) e poco stabili (Syrah, Sangiovese, Cabernet).**

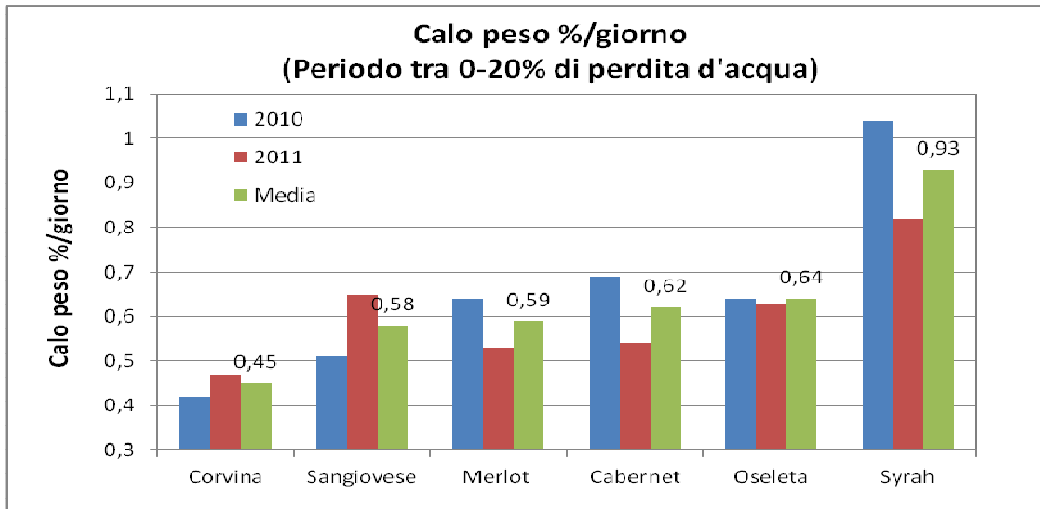


Grafico 1 – Calo di peso percentuale al giorno per grappoli di ogni singola varietà

Ci si è chiesti se la “lentezza” della disidratazione fosse correlata (come per la Corvina) ad un esito positivo dell’appassimento, non tanto dal punto di vista tecnologico bensì dal punto di vista qualitativo del prodotto finale. In altre parole, si è voluto verificare se un appassimento “lento” è in un certo qual modo legato ad un’evoluzione della bacca tale da permettere l’accumulo e/o l’insorgere di componenti che valorizzano il prodotto finale (aromi, polifenoli, acidità ...).

Allo scopo sono state allestite nell’annata 2011 due tipologie di appassimento per una medesima varietà (Corvina):

- una parte delle uve è stata messa ad appassire in cassette disposte in ordine sparso e sottoposte a ventilazione allo scopo di accelerarne il più possibile l’appassimento;
- una seconda parte è stata messa ad appassire in condizioni del tutto simili alla prima dal punto di vista della temperatura, ma in disposizione “serrata”, senza ventilazione e all’occorrenza coprendo le cassette con un foglio di nylon; questo per rallentare il più possibile l’appassimento.

Le due disposizioni sono state campionate ad intervalli regolari ed identici di calo peso fino ad una perdita di acqua per entrambe pari al 30% del peso iniziale.

Infine, le uve delle due parti sono state fermentate nelle medesime condizioni una volta raggiunto il medesimo calo peso.

Sono state eseguite analisi tecnologiche metabolomiche e trascrittomiche (quelle genetiche sono ancora in fase di elaborazione) su tutti i campioni prelevati. I risultati ottenuti suggerirebbero la correttezza dell’ipotesi, ovvero, se alla Corvina diamo un tempo adeguato a parità di calo peso, il prodotto finale che ne risulta non sarà frutto solo di una mera concentrazione (caso della Corvina accelerata), ma evidenzierà aspetti tipici di una trasformazione interna degli elementi costitutivi della bacca. **Ad una “concentrazione” si sovrappone quindi una “evoluzione” dell’uva stessa.**

Oltre al calo peso sono stati raccolti altri dati tecnologici come: il grado zuccherino, acidità totale e gli antociani potenziali.

Il grado zuccherino aumenta nel tempo seguendo in linea di massima (ovviamente con andamento opposto) il calo peso, anche se ciò non è sempre conforme alle attese. L'andamento di questo parametro è condizionato infatti anche dall'insieme delle componenti interne alla bacca "non facilmente disidratabili" e che possiamo assimilare alla "sostanza secca".

Acidità totale ed antociani potenziali costituiscono un altro gruppo di parametri particolarmente diagnostici per la comprensione del fenomeno dell'appassimento. Grazie a questi si possono classificare le uve rispetto alla loro attitudine all'appassimento secondo un'ulteriore criterio: ovvero **la propensione a preservare nel tempo la dotazione in componenti qualitativi della bacca**. Ancora una volta varietà come Corvina e Oseleta manifestano chiaramente questa tendenza al contrario ad esempio di Merlot, Syrah che sono particolarmente "degradative".

In conclusione possiamo affermare che le analisi tecnologiche sono utili come metodologia di classificazione delle uve rispetto alla fase di appassimento. Le diverse cultivar si comportano infatti diversamente almeno rispetto a tre aspetti:

- 1- nei riguardi della velocità di disidratazione (rapide/mediamente veloci/lente),
- 2- delle performance tra le diverse annate (stabili nel tempo/dipendenti dall'annata)
- 3- e nei confronti delle componenti chimiche della bacca (varietà più o meno "conservative").

Ben lungi da una piena comprensione del processo di appassimento, rimangono ancora diversi aspetti da approfondire; questo potrebbe essere materia di studio per i prossimi anni. Ad esempio:

- lo studio metabolomico dei precursori aromatici specifici dell'appassimento;
- l'influenza delle due variabili climatiche fondamentali, prese separatamente, ovvero temperatura ed umidità, sul prodotto finale;
- lo studio dell'influenza dello stato di maturazione dell'uva al momento della raccolta in relazione all'appassimento ed alle caratteristiche del vino che ne risulta;
- il ruolo dei parametri chimici e morfologici della bacca (spessore buccia, dimensioni, pruina...) sulle cinetiche di appassimento;
- l'influenza della botrite in forma nobile sull'andamento di appassimento e sul prodotto finale nonché una sua più precisa rilevazione e quantificazione.

L'ESPRESSIONE GENICA E IL METABOLOMA SVELANO LE DINAMICHE DELL'APPASSIMENTO DELL'UVA

Sara Zenoni – Flavia Guzzo – Giambattista Tornielli

Durante il processo di appassimento post-raccolta l'uva subisce diverse modificazioni solo parzialmente legate alla disidratazione e alla concentrazione del succo dell'acino. Per studiare la natura di tali modificazioni sono state allestite analisi approfondite, utilizzando due approcci avanzati e complementari: l'analisi trascrittomico e l'analisi metabolomica.

Trascrittomica

L'analisi di tutte le molecole di RNA che sono presenti in un particolare organo o tessuto in un determinato momento o condizione è definita analisi trascrittomico e grazie alla conoscenza del trascrittoma è possibile definire il numero e l'identità dei geni che sono attivi in quella particolare condizione.

Le informazioni ottenute dal recente sequenziamento del genoma di *Vitis vinifera* (Jaillon *et al.*, 2007) e lo sviluppo di potenti strumenti per l'analisi dell'espressione genica su larga scala, consentono oggi di studiare e caratterizzare importanti processi biologici, come la maturazione e l'appassimento dell'uva, con la possibilità di applicare le nuove conoscenze nel prossimo futuro. L'utilizzo di queste moderne tecnologie di analisi ha permesso di stabilire che i cambiamenti di natura fisica e biochimica che avvengono nelle bacche di Corvina durante il processo di appassimento post-raccolta sono controllati a livello genetico e che **molti geni si “accendono” o si “spengono”** quando il grappolo viene staccato dalla pianta. Nel presente lavoro, **ci siamo chiesti se questo sia un comportamento generalizzato per le diverse varietà d'uva o se invece rappresenti una peculiarità di Corvina, che permette a questa varietà di sviluppare caratteristiche qualitative uniche alla fine dell'appassimento.**

E' stata analizzata l'espressione genica complessiva di sei varietà di vite, **Corvina, Sangiovese, Oseleta, Merlot, Syrah and Cabernet Sauvignon** che sono caratterizzate da diverse velocità di disidratazione e, di conseguenza, da tempi diseguali necessari per portare a termine l'appassimento. Le sei varietà sono state fatte appassire nelle stesse condizioni ambientali allo scopo di individuare i geni che si accendono o si spengono durante il processo, di identificare i geni coinvolti nella determinazione dei caratteri di qualità delle uve e di valutare se esiste una relazione fra questi e l'attitudine all'appassimento delle diverse uve.

Da ognuna delle sei varietà appassite in fruttajo, sono stati raccolti campioni di acini a precisi intervalli temporali ed utilizzati sia per le analisi trascrittomiche sia per quelle enologiche. Per le varietà Corvina e Sangiovese, sono stati prelevati 6 campioni, per Merlot 5, mentre per Oseleta,

Syrah e Cabernet gli intervalli temporali considerati sono stati 4 (Fig. 1). I campionamenti si sono concentrati principalmente nei 30-40 giorni successivi alla vendemmia in quanto è noto che importanti modificazioni che caratterizzano il processo di appassimento (ad esempio la forte riduzione di acido malico o l'attivazione di alcuni geni) avvengono precocemente dopo il distacco del grappolo dalla pianta.

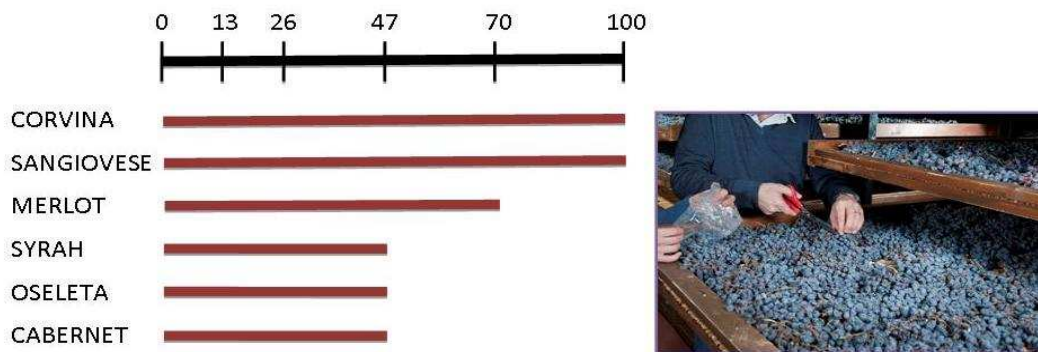


Figura 1. Durata dell'appassimento in giorni e raccolta dei campioni. Per tutte le varietà l'appassimento si è protratto fino ad un calo ponderale del 30%.

L'espressione genica è stata valutata attraverso la rilevazione della presenza di molecole di RNA relative ad ogni singolo gene del genoma di vite. Per ottenere questo risultato per prima cosa l'RNA deve essere estratto dalle bacche in appassimento. Gli acini delle sei varietà sono stati congelati e macinati in azoto liquido al fine di ottenere una polvere molto fine dalla quale attraverso parecchi passaggi di purificazione si è ottenuto l'RNA. L'analisi trascrittomico è stata condotta utilizzando una piattaforma *microarray* nel Centro di Genomica Funzionale Vegetale dell'Università di Verona, che è considerato il centro di riferimento mondiale per l'analisi di espressione genica su larga scala di vite. Un *microarray* è un supporto miniaturizzato delle dimensioni di un vetrino da microscopio, in cui sono presenti 29,582 geni contemporaneamente. In questo studio sono state eseguite 90 reazioni di ibridazione, in particolare, 18 per Corvina e Sangiovese (6 campionamenti x 3 repliche biologiche ciascuno), 15 per Merlot (5 campionamenti x 3 repliche) e 12 per Oseleta, Syrah, e Cabernet Sauvignon (4 campionamenti x 3 repliche). Tutti i campioni di RNA estratti sono stati marcati con un fluoroforo e ibridati sul *microarray*. Alla fine dell'ibridazione il *microarray* è stato scannerizzato per ottenere un'immagine nella quale singoli segnali di fluorescenza corrispondono a specifici geni che in quel campione sono accesi. I dati ottenuti sono stati statisticamente elaborati per identificare i geni differenzialmente espressi durante il processo di appassimento per ogni varietà e confrontare i diversi profili di espressione che caratterizzano le singole varietà. Il risultato più evidente riguarda il numero relativamente elevato di geni che mostrano un significativo livello di modulazione nel corso dell'appassimento post-raccolta (Fig. 2).

	CORVINA	SANGIOVESE	MERLOT	SYRAH	OSELETA	CABERNET
totale	2214	5395	3233	1772	424	886
Specifici per varietà	337	3179	856	172	67	128

Figura 2. Geni differenzialmente espressi durante l'appassimento nelle sei cultivar. Sono riportati i geni totali i geni cultivar-specifici.

Il dato dimostra inequivocabilmente che **l'appassimento è caratterizzato da un profondo riarrangiamento del trascrittoma da cui dipendono, almeno in parte, le modificazione fisiche e biochimiche che avvengono negli acini.** Se questo è vero per tutte le varietà considerate, la risposta alle condizioni di stress imposte dall'appassimento è stata decisamente diversificata nelle diverse cultivar, che hanno attivato o disattivato un numero di geni molto diverso. **Le cultivar caratterizzate da un appassimento più lento (Sangiovese, Corvina, Merlot) hanno modulato un numero di geni più elevato rispetto a cultivar che si sono disidratate più rapidamente (Oseleta, Cabernet, Syrah).** Un'altra differenza macroscopica che sottolinea la diversa risposta varietale alle condizioni di stress dell'appassimento è l'intensità di modulazione dell'espressione genica. Una visione molto generale dei dati trascrittomici mette chiaramente in luce che **Corvina e, meno marcatamente, Sangiovese hanno manifestato variazioni di espressione genica molto più elevate rispetto alle altre cultivar (Fig. 3).**

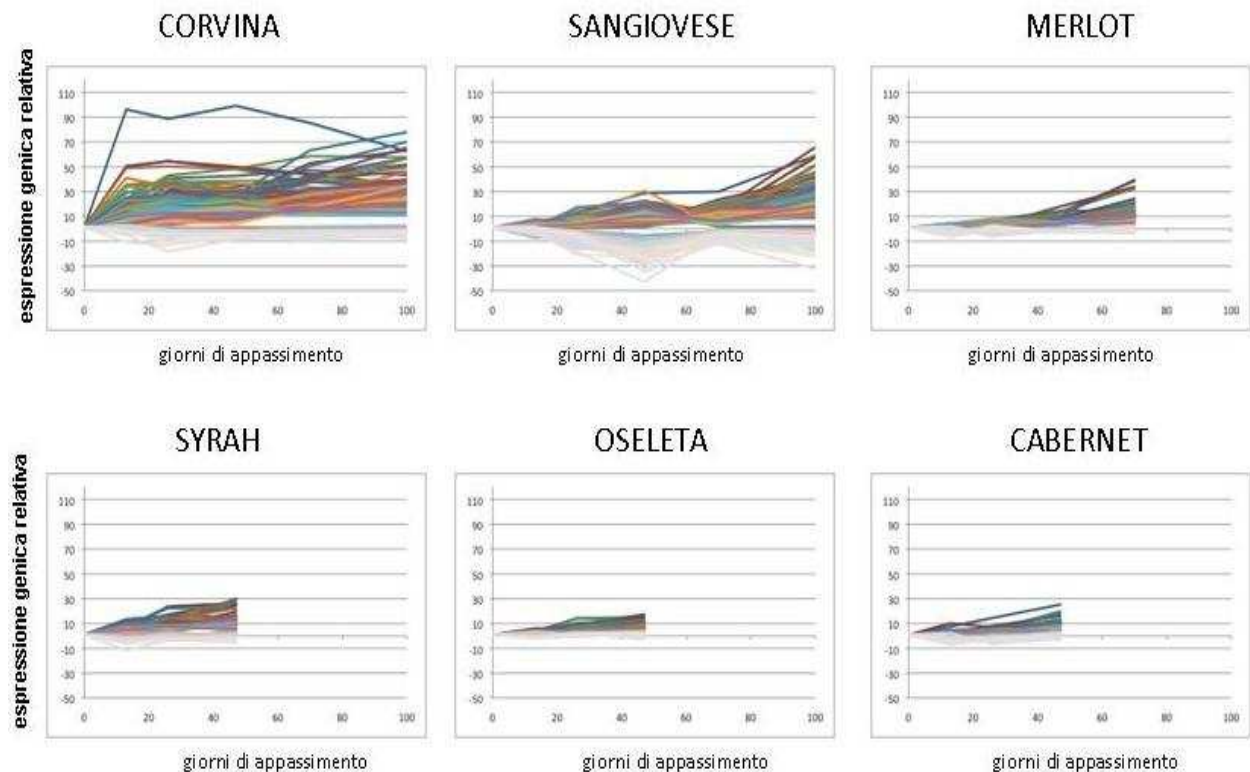


Figura 3. Livello di modulazione dei geni più attivati e più disattivati in ogni cultivar nel corso dell'appassimento.

Queste differenze potrebbero essere dovute a risposte genotipo-specifiche, ma anche al fatto che Corvina e Sangiovese, date le peculiari caratteristiche fisiche dei loro acini, si disidratano più lentamente delle altre cultivar impiegando anche il doppio del tempo per raggiungere la stessa perdita di peso. Questo **consente ai numerosi geni di esprimersi a livelli elevati con un grande impatto sul metabolismo della bacca**. Per quanto riguarda il ruolo biologico (la funzione) dei geni modulati, un aspetto molto evidente e comune a tutte le cultivar considerate è l'immediato "spegnimento", dopo la raccolta, di tutti quei geni chiaramente utilizzati per far maturare l'uva come quelli coinvolti nella produzione di flavonoidi e antociani, nell'accumulo degli zuccheri e nel rammollimento dell'acino. Al contrario nella maggior parte delle varietà analizzate è stato possibile osservare una consistente rapida attivazione di geni coinvolti nella sintesi degli stilbeni, nel metabolismo della parete cellulare, nella sintesi dei sesquiterpeni e nell'ossidazione dei polifenoli. Tuttavia in Oseleta, Cabernet e Syrah l'attivazione dei geni coinvolti in questi processi è stata minore. A titolo di esempio si riporta la generale attivazione della famiglia genica delle stilbene sintasi nelle sei cultivar, che appare evidentemente più marcata in Corvina e quasi assente in Cabernet (Fig. 4).

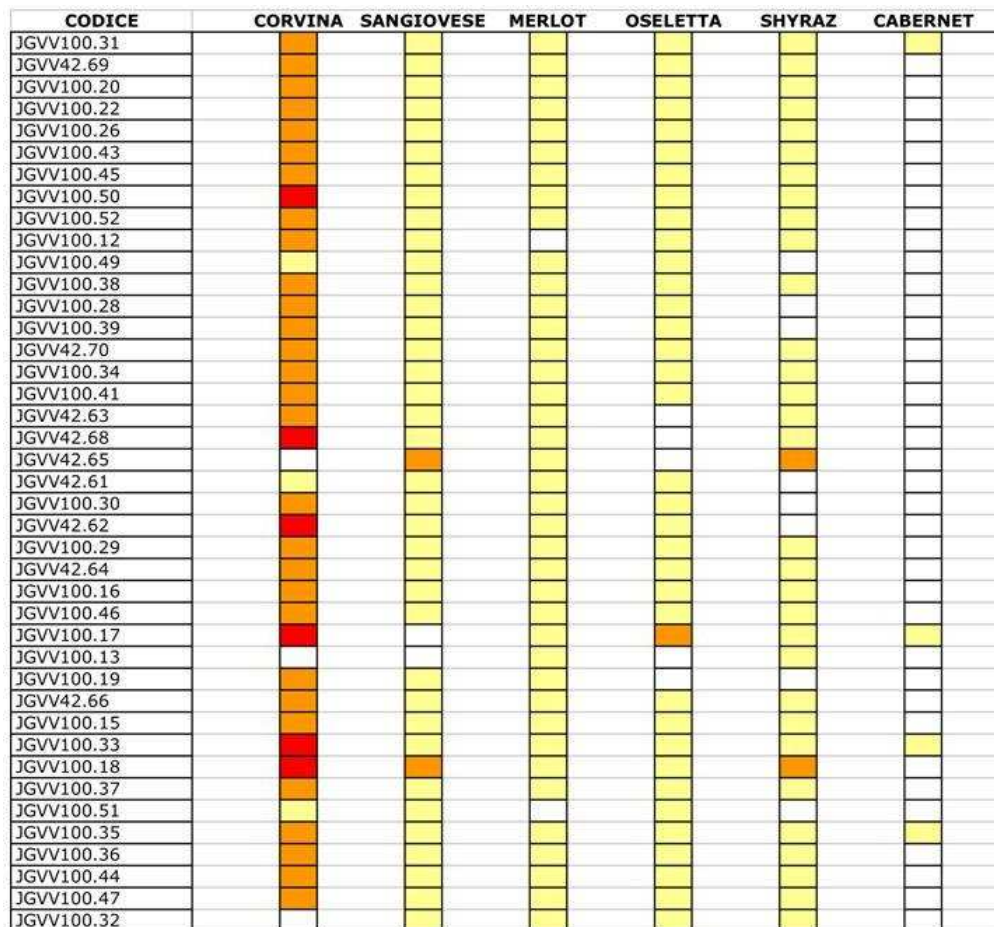


Figura 4. Elevato numero di stilbene sintasi che si attivano nella fase di appassimento. Più intenso il colore, più elevata l'espressione del gene.

Alcuni dei processi sopra menzionati potrebbero avere una decisa influenza sulle caratteristiche enologiche dell'uva appassita e questo dovrà essere confermato da specifiche analisi.

Metabolomica

La metabolomica è un approccio che consente di analizzare la composizione chimica di un campione attraverso la misura simultanea del contenuto di un numero molto elevato di composti di varia natura (metaboliti).

L'analisi metabolomica è stata condotta su una piattaforma HPLC-ESI-MS, costituita da un sistema di pompe BeckmanCoulter Gold 127 HPLC system (BeckmanCoulter, Fullerton, CA) accoppiato in linea con uno spettrometro di massa a trappola ionica BrukerEsquire 6000, fornito di sorgente di ionizzazione di tipo ESI (Electro Spray Ionization). Spettri di massa degli ioni in modalità negativa e positiva sono stati raccolti nell'intervallo di 50-3000 m/z. Infine, la matrice di dati risultante è stata sottoposta ad analisi multivariata utilizzando il programma SIMCA-P+ 12.0 (Umetrix AB, Umea, Sweden). La matrice di dati è stata analizzata dapprima attraverso Analisi delle Componenti Principali (PCA), e quindi attraverso O2PLS-DA (OrthogonalPartialLeastSquaresDiscriminant Analysis). Per determinare quali metaboliti concorressero alla caratterizzazione dei vari campioni, è stato utilizzato il parametro pq(corr), il quale mette in relazione p (basato sulle componenti X del modello, ovvero i metaboliti) con q (basato sulla componente Y del modello, ovvero le classi di campioni).

L'analisi condotta come descritto ha consentito di discriminare chiaramente le sei varietà in base ai metaboliti presenti nelle bacche, come mostrato in Figura 5.

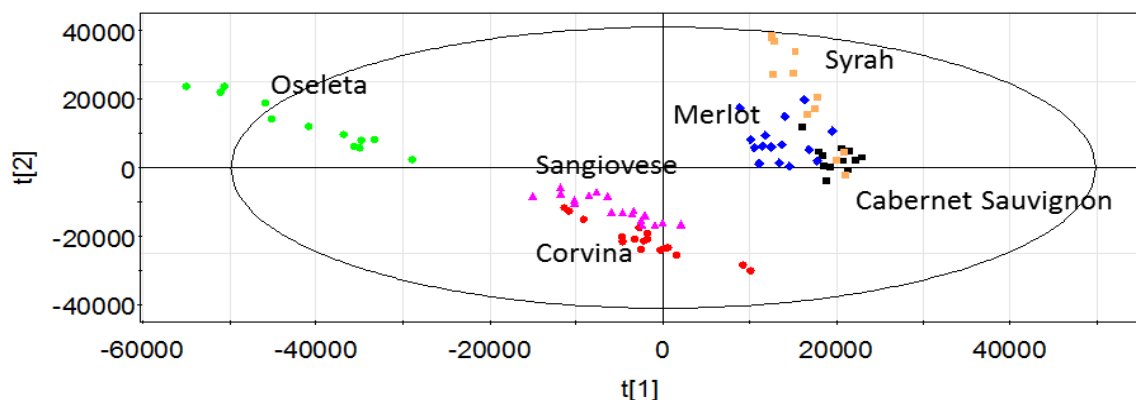


Figura 5. Analisi delle Componenti Principali dei dati metabolomici ottenuti da tutti i campioni raccolti nel corso dell'appassimento.

In dettaglio, Cabernet Sauvignon, Syrah e Merlot si raggruppano insieme a causa dell'alto contenuto di antociani (acetil)-3-O-glucosidi, che li contraddistinguono rispetto alle altre varietà; Oseleta è caratterizzata da elevata cianidina, peonidina e petunidina 3-O-glucoside e da alti livelli di stilbeni,

mentre Corvina e Sangiovese hanno caratteristiche intermedie fra quelle delle tre varietà “internazionali” da una parte e Oseleta dall’altra. Inoltre, Corvina e Sangiovese sono caratterizzate da una deficienza specifica nell’antociano delphinidina. Nell’ambito del gruppo delle varietà internazionali, Merlot è caratterizzato da alto livello di procianidine (tannini), mentre lo Syrah è particolarmente ricco in antociani acilati con acido cumarico. Sangiovese invece differisce da Corvina per una carenza di altri flavonoidi. Oltre ad essere ben caratterizzate dal loro profilo metabolico iniziale, le sei varietà di uva mostrano anche caratteristici andamenti nella variazione del contenuto di metaboliti durante i processi di appassimento. In tutte le varietà i metaboliti vengono concentrati, come è ovvio, durante il processo; tuttavia, se la loro quantificazione relativa viene condotta per acino d’uva piuttosto che per unità di peso, considerando quindi la sua perdita d’acqua e di peso durante il processo, la quantità di metaboliti può aumentare ma anche diminuire nel tempo rispetto alla quantità iniziale.

Questo indica che l’appassimento non è mera concentrazione di metaboliti dovuta a perdita di acqua, bensì dipende da complessi processi di degradazione/trasformazione e biosintesi ex novo.

Rispetto alle altre varietà **Corvina presenta dinamiche di accumulo/degradazione di metaboliti molto gradualmente nel tempo**, essendo simile in questo solo a Sangiovese, la quale è la varietà che presenta anche una composizione iniziale più simile. Le altre varietà mostrano deplezione/accumulo di metaboliti più rapido del tempo. Inoltre, Cabernet Sauvignon ha caratteristiche uniche, in quanto è l’unica varietà a non mostrare accumulo attivo di stilbeni durante il processo di appassimento.

Conclusioni

Nel complesso i dati raccolti dimostrano come l’appassimento sia un processo che modifica profondamente e migliora le caratteristiche qualitative di cultivar che, come Corvina, possiedono due principali requisiti: un’elevata risposta in termini di induzione di espressione genica e la necessità di periodi di disidratazione lunghi. Dopo la raccolta, le cellule dell’acino non sono morte, ma sono invece in grado di modificare il loro metabolismo per contrastare le condizioni di stress derivanti dal distacco dalla pianta e dalla conseguente disidratazione. Le variazioni di espressione genica sono rilevabili ed evidenti fino all’ultimo stadio di appassimento, quando le uve hanno raggiunto il livello massimo di disidratazione e sono perciò pronte per essere vinificate. Questo vuol dire che anche in questo avanzato stadio di disidratazione, che può essere raggiunto anche molti giorni dopo la raccolta (per Corvina e Sangiovese, ad esempio, lo stadio di appassimento ottimale è stato raggiunto dopo 100 giorni), i tessuti dell’acino sono in grado di esprimere molti geni per tentare di mantenere un controllo trascrizionale su quanto sta accadendo all’interno delle loro cellule. Pertanto, specialmente per le varietà che si disidratano lentamente, questo controllo potrebbe avere una notevole influenza su diverse caratteristiche enologiche delle uve appassite, come il profilo polifenolico, il potenziale aromatico o la consistenza fisica degli acini.

DEGUSTAZIONE TECNICA

Andrea Dal Cin

Grazie all'interessante studio di genetica durante l'appassimento, realizzato dalla collaborazione del dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona ed il Gruppo Tecnico Masi, si sono ottenuti risultati interessanti e l'enologia Masi oggi può prenderne grande vantaggio non solo per migliorare il processo tecnico di appassimento, ma anche quello fermentativo delle uve da esso provenienti.

Oggi i dati parlano sempre più chiaramente: le uve dopo il processo di appassimento sono diverse da quelle fresche ed in molti casi anche il prodotto vino proveniente dalla fermentazione delle stesse presenta risultati talvolta diversi rispetto alle attese. Infatti, il profilo organolettico dei vini ottenuti è molto variabile.

Due eclatanti esempi sono: il vino da uve Corvina fresca, notoriamente leggero, fresco, fruttato e beverino, con una colorazione rosso violacea di bassa intensità; opposta è la versione appassita caratterizzata da aromi fruttati complessi quali ciliegia e marasca, noce e mandorla e con una colorazione rosso intenso, polposa di corpo e piena. Non a caso la Corvina è l'uva principale dell'Amarone della Valpolicella e nel particolare, con sfumature uniche, quelli di Masi e Serego Alighieri.

Il Cabernet Sauvignon invece è nella versione fresca apprezzato in tutto il mondo, un vino eclettico sia da pronta beva che da lungo invecchiamento. La versione appassita invece è leggermente amara, con aromi erbacei di fieno e terrosi, l'intensità colorante non cambia di molto ed il corpo è più fine rispetto alla versione da uve fresche.

Le uve fermentate e considerate per questa seconda parte di studio sono: Corvina, Corvina appassimento accelerato, Corvina appassimento rallentato, Cabernet, Merlot 1, Merlot 2, Oseleta, Sangiovese e Syrah (la prima parte dello studio prevedeva anche lo Chardonnay, la Garganega e Marzemino).

Procedura di lavoro: le uve sono state microvinificate presso la cantina sperimentale Masi di Gargagnago, Valpolicella, in contenitori da 75 l con seguente protocollo:

- diraspa-pigiatura separata delle uve sia per le fresche che appassite;
- aggiunta lievito commerciale selezionato;
- macerazione/fermentazione per 20 gg ca per i freschi e 30 gg ca per gli appassiti;
- parametri di fermentazione: da uve fresche temperatura iniziale di circa 15°C e picco di 24°C - appassite circa 10°C e picco 22°C;
- svinatura e stoccaggio campioni;
- analisi in e post fermentazione, assaggio finale.

I parametri di base controllati dal Laboratorio Masi durante la fermentazione sono stati: temperatura di fermentazione, alcool prodotto, alcool potenziale, acidità totale, pH, zuccheri, polifenoli totali, acido malico, acido lattico, anidride solforosa libera e totale, estratto secco totale e netto. Riportiamo i dati analitici principali rilevati per la Corvina appassita nel grafico 1.

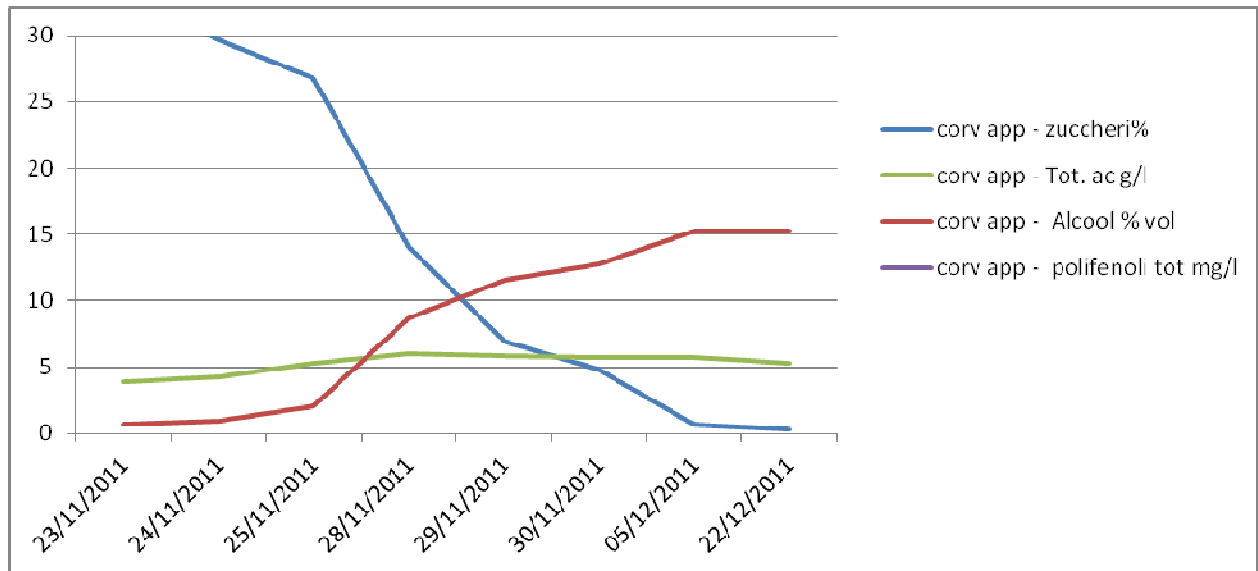


Grafico 1: dati analitici relativi alla Corvina appassita 2011

I campioni sono stati assaggiati singolarmente dal Gruppo Tecnico Masi sia nella versione sperimentale dei vini da uve fresche che appassite nel mese di febbraio 2012. Sono stati individuati una serie di descrittori olfattivi e gustativi ed applicati ad essi una scala di valori di intensità da 0 a 5. Il risultato dell'assaggio di Corvina appassita 2011 è illustrato nel grafico 2 qui sotto:

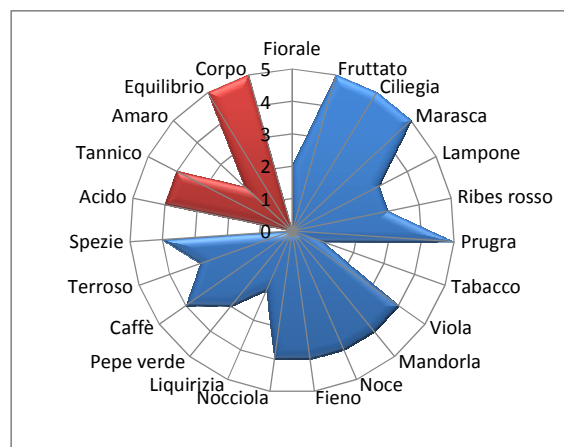


Grafico 2: profilo organolettico della Corvina appassita 2011

Con questo studio ora più che mai possiamo dire di essere scesi nel dettaglio appassimento-fermentazione. Si svela, con nuovo approccio, la complessa espressione aromatica di ogni singolo metabolita prodotto durante l'appassimento e si inizia a rendere oggettiva l'analisi sensoriale che fino ad ora era prettamente soggettiva.

Il vino finale non è solamente correlato agli aromi dell'uva, ma anche a quelli di appassimento e di fermentazione e quanto più sono lenti quanto migliore potrebbe esserne il risultato. Possiamo concludere quindi che **la complessità dell'aroma del vino è inversamente proporzionale alla velocità dell'appassimento e della fermentazione**, ma fino ad un certo punto: infatti, dopo lunghi appassimenti, vengono metabolizzati i componenti principali dell'uva e la fermentazione può diventare stentata, anche in questo caso quindi esiste un limite.

Il prossimo interessante passo potrebbe essere la verifica e controllo dei limiti di appassimento e fermentazione in particolare per quest'ultima capirne l'effetto e ruolo svolto dai complessi aromatici prodotti, anche dai lieviti, che caratterizzano i vini da appassimento di cui Masi è sostenitrice e divulgatrice a livello mondiale.

VINI IN ASSAGGIO

1. CORVINA da uva fresca 2011

Raccolta il : 12.09.2011
Alcool : 12,02% vol.
Estratto secco: 25,5 g/l
Acidità totale: 5,3 g/l
Acidità volatile: 0,38 g/l
pH 3,4
Zuccheri: 2,1 g/l

2. CABERNET da uva fresca 2011

Raccolta il : 09.09.2011
Alcool : 12,72% vol.
Estratto secco: 26,5 g/l
Acidità totale: 5,3 g/l
Acidità volatile: 0,35 g/l
pH 3,73
Zuccheri: 2,3 g/l

3. CORVINA da uva appassita 2011

Raccolta : 12.09.2011
Appassita dal: 12.09.11 al: 17.11.2011
Alcool : 15,29% vol.
Estratto secco: 34,5 g/l
Acidità totale: 5,24 g/l
Acidità volatile: 0,47 g/l
pH 3,48
Zuccheri: 2,6 g/l

4. CABERNET da uva appassita 2011

Raccolta : 09.09.2011
Appassita dal: 09.09.11 al: 02.11.2011
Alcool : 17,62% vol.
Estratto secco: 34,5 g/l
Acidità totale: 5,76 g/l
Acidità volatile: 0,71 g/l
pH 4,03
Zuccheri: 3,5 g/l

5. FOJANEGHE 2008

Alcool : 13,60% vol.
Estratto secco: 31,1 g/l
Acidità totale: 5,70 g/l
Acidità volatile: 0,52 g/l
pH 3,59
Zuccheri: 4,9 g/l

6. RISERVA DI COSTASERA 2007

Alcool : 15,60% vol.
Estratto secco: 35,9 g/l
Acidità totale: 6,30 g/l
Acidità volatile: 0,58 g/l
pH 3,49
Zuccheri: 8,6 g/l

GRUPPO TECNICO MASI

MEMBRI

COORDINATORE GENERALE	Raffaele Boscaini
COORDINATORE TECNICO	Lanfranco Paronetto
VITICOLTURA referente	Lucio Brancadoro
VITICOLTURA	Mattia Lucchini
ENOLOGIA referente	Andrea Dal Cin
ENOLOGIA	Andrea Tella
ENOLOGIA	Dante Cavazzani
CONTROLLO QUALITÀ referente	Vittorio Zandonà
CONTROLLO QUALITÀ	Anita Boscaini
CONTROLLO QUALITÀ	Barbara Masello
CONTROLLO QUALITÀ	Andrea Farinazzo
ASPETTI COMMERCIALI	Luc Desroches
ASPETTI STRATEGICI	Sandro Boscaini

COLLABORAZIONI

Giuseppe Brugnoli, giornalista, scrittore, storico

Massimo Delledonne, Università di Verona, Dipartimento di Biotecnologie

Marco Olivetti, climatologo

Mario Pezzotti, Università di Verona, Dip. di Scienze, Tecnologie e Mercati della Vite e del Vino

Attilio Scienza, Università di Milano, Dipartimento delle Produzioni Vegetali

Diego Tomasi, CRA-VIT Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano

SEDE OPERATIVA Cantina Masi Valgatarà, 37020 Valgatarà di Marano, Verona,
Tel. 045-6832445 Fax. 045-6832438 masi@masi.it