

DOCUMENTO
TECNICO

Da sinistra:
M. Azzolini,
M. Lorenzini

***Emanuele Tosi**
***Michela Azzolini**
****Marilinda Lorenzini**
****Giacomo Zapparoli**

**Centro per la Sperimentazione
in Vitivinicoltura, Provincia di
Verona, Servizio Agricoltura -
San Floriano (VR)*

***Dipartimento di Biotecnologie,
Università degli Studi di Verona*

CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI BOTRYTIS CINEREA DA UTILIZZARE PER LA PRODUZIONE DI VINI PASSITI

Si sono caratterizzati, da un punto vista molecolare ed enzimatico, tre ceppi di *Botrytis cinerea* isolati da uve in appassimento. Attraverso delle prove di laboratorio e di cantina si è potuto valutare il possibile utilizzo in processi di infezione controllata, per la produzione di vini nei quali il contributo della muffa nobile possa essere standardizzato.

Introduzione

Botrytis cinerea è un fungo patogeno necrotrofico ubiquitario responsabile di marciumi in piante e frutta che generalmente viene contrastato durante il periodo vegetativo con idonee pratiche di difesa fitosanitaria. Tuttavia, nella filiera di produzione del vino l'infezione di *B. cinerea* dell'uva può rappresentare un fattore positivo che interessa specifiche produzioni quali quelle di alcuni vini speciali. Gli esempi più conosciuti so-

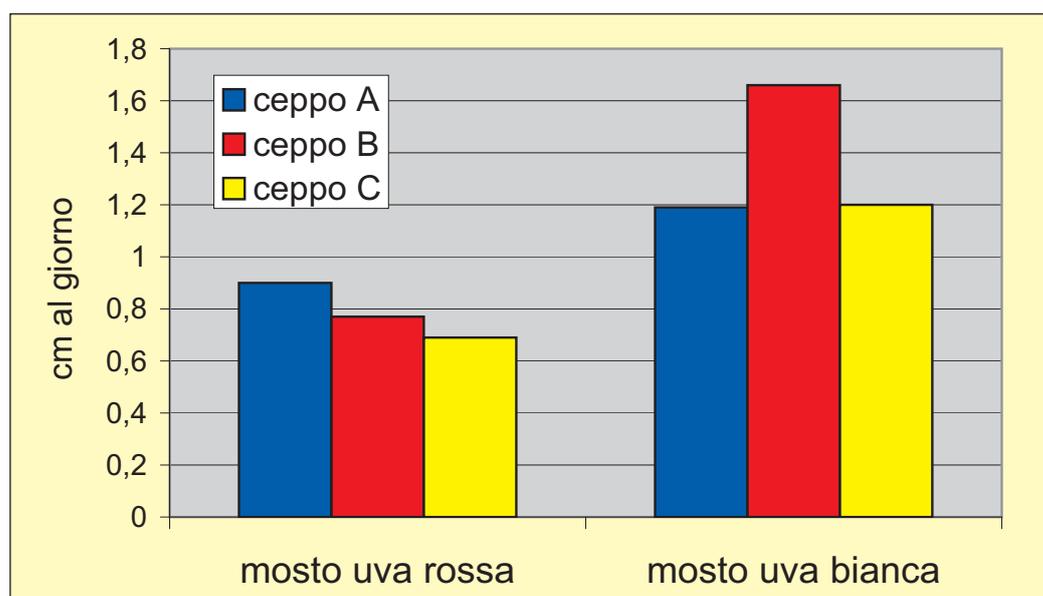
no i vini bottrizzati Sauternes, Tokaj Aszù e Trockenbeerenauslese, prodotti con differenti tecnologie di vinificazione, da uve infettate da botrite in una fase di sviluppo chiamata "muffa nobile".

La maggior parte di vini passiti italiani non sono ottenuti dalla selezione di sole uve bottrizzate, ma dall'ammostatura di grappoli che presentano un livello di infezione e uno stadio di sviluppo del fungo diverso a seconda della varietà, dell'andamento stagionale e dalle con-

dizioni del fruttato. Analogamente ai famosi vini bottrizzati esteri è stato dimostrato che la muffa nobile condiziona significativamente la loro qualità chimica e sensoriale in relazione alla quantità di uva bottrizzata presente all'ammostatura, in quanto essa conferisce peculiari caratteri organolettici non riscontrabili negli stessi vini ottenuti da uve sane (Fedrizzi et al. 2011, Tosi et al., 2012).

L'interesse verso la bottrizzazione indotta delle uve per diversificare il prodotto

Fig. 1 - Crescita radiale media del micelio (cm di diametro al giorno) di tre ceppi di *B. cinerea* (A, B e C) misurata su due substrati naturali (mosto di uva rossa e bianca) solidificati con agar



e/o recuperare caratteri sensoriali tradizionali ha incentivato sperimentazioni volte a favorire e controllare lo sviluppo della muffa nobile attraverso l'inoculo di spore di *B. cinerea* sull'uva (Favale et al., 2005; Tiberi et al., 2008; Guenzi et al., 2011). Le prime prove di botritizzazione controllata sono state effettuate in California a partire dagli anni '50 (Nelson e Amerine, 1956; Nelson et al., 1963).

Precedenti lavori hanno dimostrato come diversi ceppi di *B. cinerea* si differenzino per i caratteri fisiologici quali la germinabilità delle spore, la capacità di infezione della bacca, la resistenza ai fitofarmaci, e per i caratteri metabolici quali il consumo di zuccheri e acidi, la produzione di specifici metaboliti e le attività enzimatiche (Dugan et al., 2002; Martinez et al., 2003; Cotoras e Silva, 2005; Paplomatas et al., 2005).

Sulla base di queste conoscenze e data la particolarità del processo di botritizzazione delle uve, è presumibile che l'uso di un ceppo piuttosto che un altro possa avere un effetto differente sulle modalità e grado dell'infezione dell'uva con diverse conseguenze anche sulla qualità del prodotto finito. Considerando le scarse conoscenze

sullo sviluppo di *B. cinerea* nel corso dell'appassimento delle uve, questo studio presenta una caratterizzazione preliminare di ceppi di botrite che può essere utile in un programma di selezione di muffe idonee alla botritizzazione controllata delle uve.

Materiali e metodi

Ceppi di botrite e caratterizzazione molecolare. Si sono considerati tre ceppi di *B. cinerea* (A, B e C) isolati da campioni di uva in appassimento provenienti da fruttai siti nel territorio della Provincia di Verona. L'isolamento è stato effettuato a partire da acini naturalmente infettati dal fungo nella forma larvata o effluorescente che, messi in terreno BSM (Edwards e Seddon, 2001) per 4 giorni a 28°C, hanno consentito lo sviluppo selettivo del micete. Successivamente le colture sono state mantenute in terreno MEA (estratto di malto 2%, glucosio 2%, peptone 1%, agar 1,5%).

La caratterizzazione molecolare dei ceppi è stata effettuata tramite RAPD-PCR utilizzando il primer OPD-02 e separando i prodotti amplifica-

ti in gel elettroforetico d'agarosio (Alfonso et al., 2000).

Saggi di crescita e di infezione di uva. La crescita radiale del micelio è stata valutata in piastra utilizzando come substrato naturale due mosti, di uva bianca e rossa, la cui acidità (pH 3,46 e 3,38, rispettivamente) è stata opportunamente corretta (a pH 4,0) per poter consentire la solidificazione con agar (2%). La loro composizione era rispettivamente: 250 e 190 g/L di glucosio e fruttosio, acido tartarico 2,77 e 2,08 g/L, acido L-malico 2,0 e 1,63 g/L. Un tassello di micelio di circa 1 cm², proveniente da una coltura di 10 giorni, è stato posta al centro della piastra e nel corso dell'incubazione a 25°C si è misurato il diametro del micelio in crescita.

La capacità di infezione di uva è stata valutata impiegando acini di uva Garganega disinfettati con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2% per 10 minuti e risciacquati in acqua sterile prima di posizionarli in piastre a settori sterili. Su ogni acino è stato inoculato con un puntale di micropipetta una sospensione acquosa contenente conidi e frammenti di ife di *B. cinerea* preparata da una coltura ma-

dre di ciascun ceppo. Le sospensioni dei tre ceppi sono state standardizzate attraverso conta delle spore al microscopio ottico in camera di Burkner. Le piastre sono state incubate a 25°C per 10 giorni e la crescita del micelio in ogni singolo acino (sono stati infettati un totale di 50 acini per ceppo) è stata valutata visivamente esprimendola in base ad una scala di punteggio da 0 a 5 come segue: 0 assenza di micelio, 1 presenza del micelio solo nel foro di inoculo, 2, 3, 4 e 5 micelio ricoprente circa meno di 1/3, tra 1/3 e 1/2, tra 1/2 e 2/3, più di 2/3 della superficie dell'acino, rispettivamente.

Sensibilità ai fitofarmaci.

Sono stati testati due antibiotici commerciali contenenti come principio attivo in uno fenexamide e nell'altro una miscela di cyprodinil-fludioxonil, misurando la crescita radiale del micelio su terreno MEA (come sopra descritto) contenente concentrazioni di 0,2, 4 e 6 mg/L dei due principi attivi in relazione a quella ottenuta nella tesi controllo (senza antibiotico).

Attività enzimatiche. Le attività laccasica ed esterasica sono state effettuate sul micelio mentre quella poligatturonidasiica sull'estratto crudo. Quest'ultima è stata quantificata utilizzando l'acido poligatturonico come substrato e tampone di reazione fosfato potassico 50 mM pH 6,0. La quantificazione è avvenuta con il dosaggio degli zuccheri con il metodo di Nelson-Somogyi (Nelson et al. 1944) e la retta di taratura è stata fatta con l'acido D-galatturonico.

La laccasi è stata misurata utilizzando come substrato il 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMOP) in tampone citrato sodico 50 mM pH 3,5 leggendo allo spettrofotometro (450 nm) il viraggio della soluzione. La retta di taratura è stata fatta usando l'enzima laccasi puro di *Agaricus bisporus*.

L'esterasi è stata misurata utilizzando il 4-nitrophenylbutyrate come substrato in

tampone di reazione fosfato potassico 50 mM pH 7,5 leggendo allo spettrofotometro (415 nm) il viraggio della soluzione di reazione. La retta di taratura è stata fatta con il 4-nitrophenol.

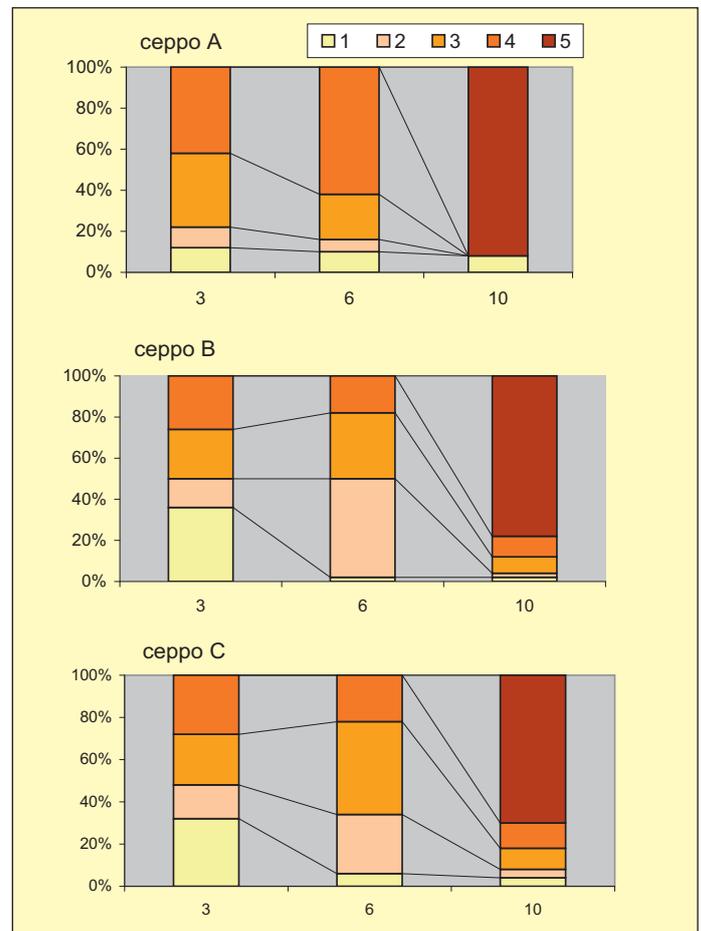
Prove di appassimento in laboratorio. Le prove di appassimento sono state condotte seguendo il medesimo protocollo descritto precedentemente per la valutazione della capacità di infezione con la differenza che gli acini inoculati sono stati incubati alle seguenti condizioni: 66 ore a 25°C, 96 ore a 16°C, 96 ore a 12°C quindi 8°C fino al raggiungimento del calo peso dell'uva desiderato. Mediante degli umidificatori, l'umidità relativa all'interno dell'incubatore è stata mantenuta ad un valore medio di circa 80%. Entrambi i parametri sono stati monitorati con un data logger mentre l'appassimento è stato seguito con il calo peso. Dopo 20 giorni gli acini sono stati pigiati ed il mosto analizzato chimicamente.

Risultati e discussione

Tipizzazione molecolare dei ceppi di Botrite. I tre ceppi di botrite analizzati con la RAPD-PCR si sono differenziati, da un punto di vista genetico, per un distinto profilo elettroforetico (dati non mostrati). Il fatto che essi provengono da un simile ambiente vitivinicolo, quale la Valpolicella, presuppone l'esistenza di una significativa variabilità genetica tra le popolazioni di *B. cinerea* di questa area, analogamente a quanto osservato in precedenti lavori (Moyano et al., 2003; Muñoz et al., 2010). Naturalmente solo ulteriori analisi molecolari di un significativo numero di campioni provenienti da stesse e differenti aree di produzione potranno confermare questa ipotesi.

Crescita in piastra e capacità di infezione degli acini. In Fig. 1 sono mostrati i

Fig. 2 - Capacità di infezione di tre ceppi di *B. cinerea* (A, B e C) misurata in percentuale su acini di uva bianca fresca dopo 3, 6 e 10 giorni di incubazione e suddivisi in 5 categorie a seconda della crescita del micelio



0 assenza di micelio, 1 presenza del micelio solo nel foro di inoculo, 2, 3, 4 e 5 micelio ricoprente circa meno di 1/3, tra 1/3 e 1/2, tra 1/2 e 2/3, più di 2/3 della superficie dell'acino, rispettivamente

risultati della prove di crescita radiale effettuata in piastra in due differenti mosti solidificati con agar. Nel mosto di uva bianca si sono osservate le maggiori differenze di crescita e questo potrebbe essere attribuito al maggior contenuto zuccherino rispetto al mosto di uva rossa. Infatti, Vercesi et al. (1997), effettuando test in terreno solido, avevano osservato che il tasso specifico di crescita di *B. cinerea* variava in relazione al contenuto in zuccheri quando le concentrazioni di acido tartarico e acido L-malico erano inferiori di circa 4 e 5 g/L, rispettivamente, soglia oltre la quale risultavano inibenti la crescita.

Nella valutazione dello sviluppo del micelio sull'aci-

no si sono ottenuti informazioni sulle potenziali capacità infettive dei ceppi in esame (Fig. 2). In questo caso il ceppo A ha mostrato una cinetica di infezione differente rispetto ai ceppi B e C, che a loro volta hanno avuto un comportamento simile. Il consumo di zuccheri, acido tartarico e malico, in mosto ottenuto dagli acini infettati, non è differito tra i tre ceppi (dati non mostrati).

Sensibilità ai fungicidi. Il test ha evidenziato differenze, anche se in generale non marcate, tra i tre ceppi alla sensibilità ai due principi attivi (Fig. 3). Il fenexamide è risultato più inibente del ciprodinil-fludioxonil per tutti i ceppi alle concentrazioni di 4

Fig. 3 - Sensibilità a due antibiotritici di tre ceppi di *B. cinerea* (A, B e C) misurata in percentuale di inibizione di crescita radiale del micelio su terreno MEA contenente 0,2, 4 e 6 mg/L rispetto al controllo (terreno senza antibiotritico)

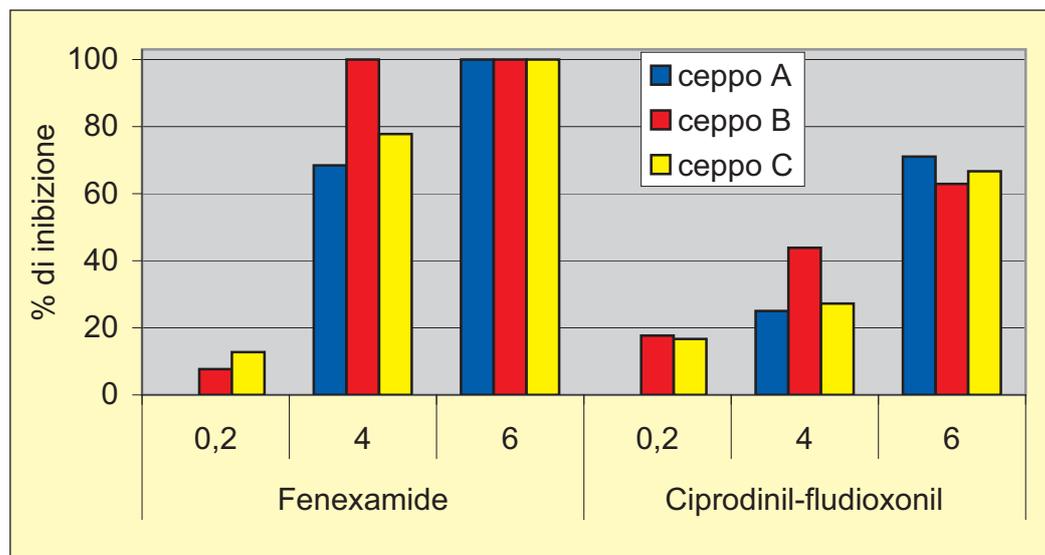
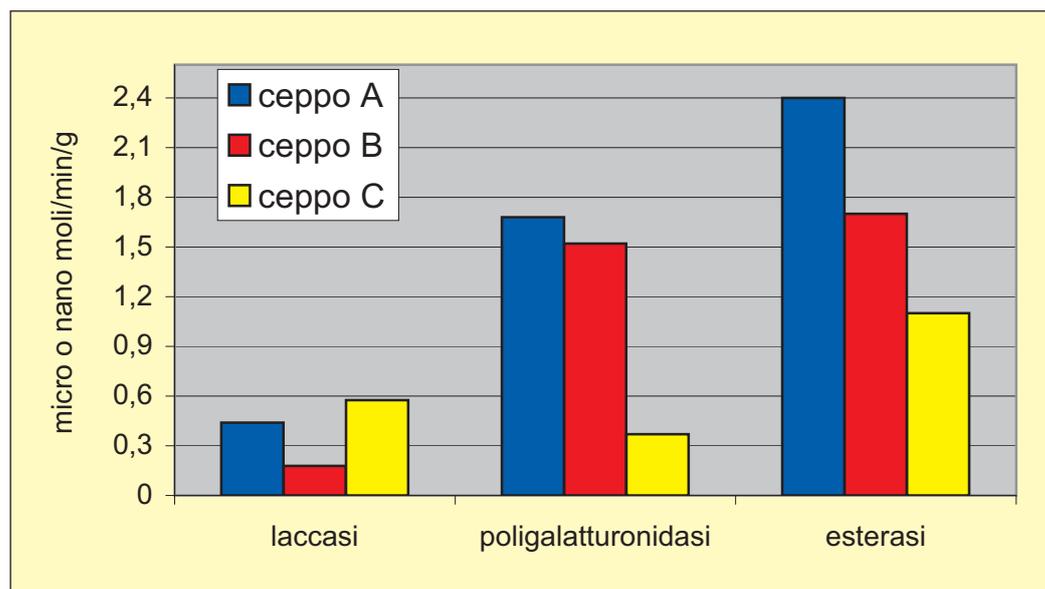


Fig. 4 - Attività enzimatica di tre ceppi di *B. cinerea* (A, B e C) espressa in moli (laccasi e poligalatturonidasi) o μ moli (esterasi) per minuto per grammo di peso secco



e 6 mg/L. A 4 mg/L di fenexamide il ceppo B è risultato il più sensibile. Fenotipi variabili alla sensibilità a questi ed altri fungicidi sono stati identificati in molte zone vitivinicole ed è stata riscontrata in alcuni casi un'alta frequenza di ceppi resistenti a più principi attivi (Topolovec-Pintarić, 2009; Leroch et al., 2011). È evidente l'importanza di conoscere il fenotipo dei potenziali ceppi da utiliz-

zare per la botritizzazione poiché i trattamenti in campo e la persistenza di un specifico fungicida nelle uve in post-raccolta potrebbero condizionare in modo significativo l'esito dell'infezione.

Attività enzimatiche. Si sono considerate tre attività rappresentative di pool enzimatici che hanno rilevanza nel processo di infezione e sulla qualità del mosto e del

vino. La laccasi determina l'ossidazione dei fenoli e ha conseguenze sul colore, la poligalatturonidasi partecipa alla degradazione della parete cellulare della cellula vegetale e ha un ruolo importante nella patogenesi e nell'interazioni con la difesa della pianta ospite, l'esterasi influenza la formazione di molti composti aromatici (esteri, acidi grassi, lattoni, etc.) che contribuiscono in

modo determinante al bouquet del vino.

I ceppi hanno evidenziato attività decisamente differenti per i tre enzimi presi in considerazione (Fig. 4); il ceppo A si è distinto per alta attività esterasica, il ceppo B per la bassa attività laccasica e il ceppo C per la bassa attività poligalatturonidasi. L'alta attività poligalatturonidasi del ceppo A potrebbe in parte spiegare la sua maggiore capacità infettiva degli acini osservata nella prova di infezione, in accordo con precedenti studi che hanno osservato una relazione tra la virulenza e la produzione di questi enzimi degradativi (Derckel et al., 1999; Choquer et al., 2007). Il ceppo B, per la sua minore attività laccasica, potrebbe essere preferito agli altri per il ridotto effetto sull'imbrunimento del colore nei bianchi e degradazione del colore nei rossi. Dall'altra parte, l'attività laccasica potrebbe favorire la stabilizzazione del colore rimuovendo alcuni fenoli (in particolare catechine e epicatechine) nel mosto (Minussi et al. 2007) e l'ossidazione di composti aromatici determinando così un "invecchiamento precoce". Quest'ultimo può essere un effetto apprezzabile in specifici contesti (Caillé et al., 2010; Bueno et al., 2010), e potrebbe essere ottenuto in Amaro da uve botritizzate da ceppi alti produttori di laccasi, come il ceppo C.

Prove di induzione della muffa nobile

Per una preliminare valutazione delle potenziali capacità di infettare nella forma nobile, si sono effettuate delle prove in laboratorio su due ceppi, B e C, scelti per l'opposta intensità dell'attività laccasica. Entrambi i ceppi hanno mostrato una buona capacità di crescere nella forma larvata (Fig. 5) e le analisi effettuate sul mosto a fine sperimentazione suggeriscono un comportamento distinto (Fig. 4). Il dato della laccasi conferma quello ottenu-

to sul micelio (Fig. 6), mentre il contenuto di glicerolo, acido gluconico e il loro rapporto (1,2 per il ceppo B e 3,1 per il ceppo C) indicano un differente grado di infezione da muffa nobile, riconducibile per entrambi allo stadio di *pourri plein*, secondo Ribéreau-Gayon et al. (2006).

L'uso di un ceppo più o meno veloce nello sviluppo larvale nella bacca può avere anche importanti riflessi tecnologici poiché da esso dipende anche la cinetica di appassimento dell'uva. Con il ceppo C il grado di appassimento è risultato maggiore e sia l'aspetto degli acini sia il calo peso e il contenuto zuccherino lo hanno evidenziato. È chiaro che le cinetiche di appassimento di uve soggette alla botritizzazione artificiale potranno essere meglio gestite con il controllo della temperatura e l'umidità relativa dell'aria e le risposte dei singoli ceppi dovranno essere vagliate attentamente.

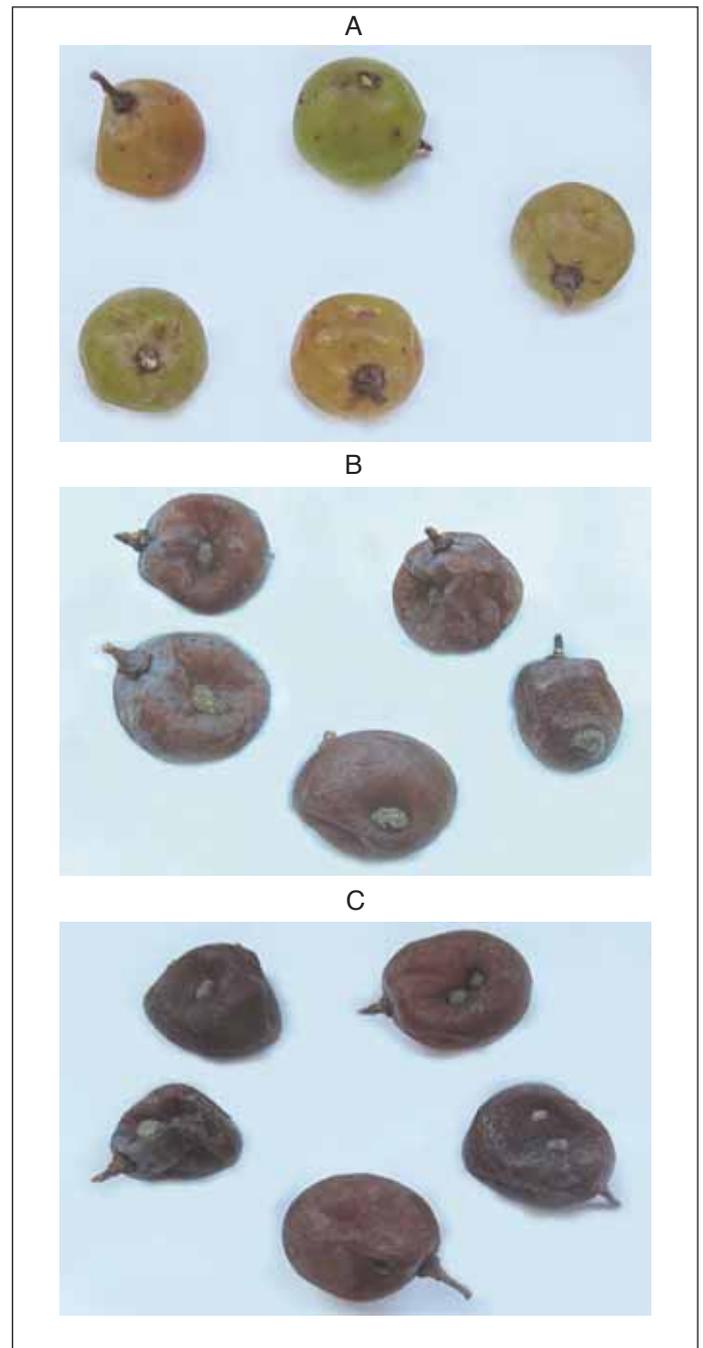
Tuttavia, diverse nostre prove di botritizzazione delle uve in fruttajo naturale (quindi senza il controllo dei parametri ambientali), mediante l'induzione dell'infezione spruzzando una sospensione di spore di ceppi di *B. cinerea*, hanno prodotto risultati soddisfacenti (dati non pubblicati) suggerendo che è possibile questa pratica anche senza l'ausilio di camere ad ambiente controllato.

Considerazioni conclusive

Questo studio ha evidenziato la diversità fenotipica di 3 ceppi di *B. cinerea* per alcuni caratteri che vengono riflessi sulla capacità di infettare l'uva, nonché sui possibili effetti qualitativi nel vino prodotto dalle uve da loro stessi colonizzate.

Dato che nel secolo scorso iniziò una intensa attività di ricerca di ceppi di lievito (dagli anni '60) e batteri malolattici (dagli anni '80) da impiegare come starter della fermentazione alcolica e ma-

Fig. 5 - Acini non inoculati (A) e inoculati con i ceppi B (B) e C (C) di *B. cinerea* a fine appassimento in microambiente controllato per lo sviluppo della muffa nobile

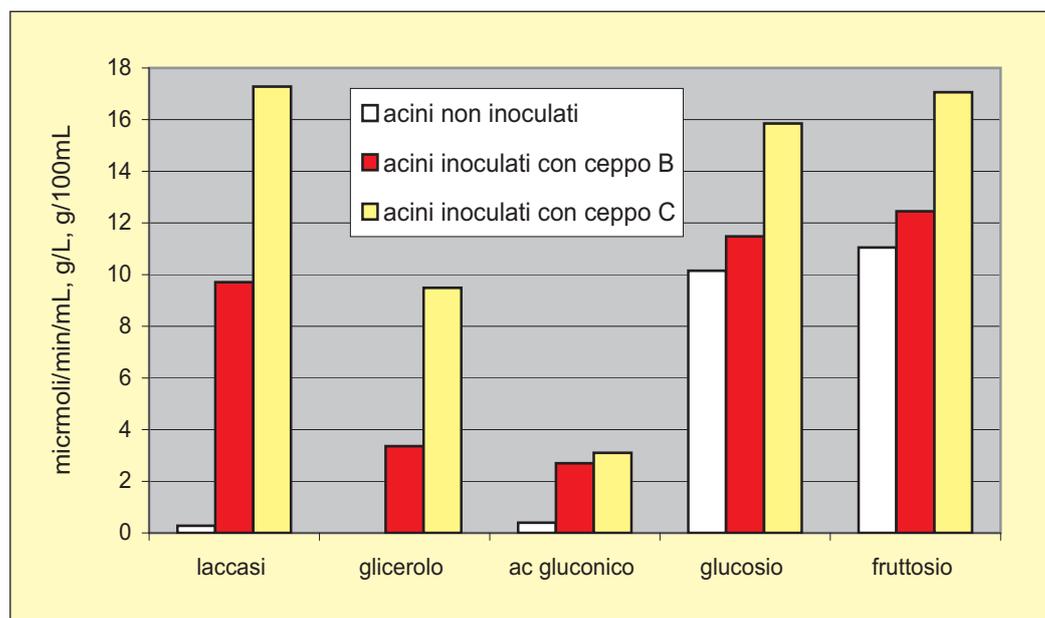


lolattica, questo studio vuole essere da stimolo per intraprendere ricerche volte all'individuazione di potenziali "starter" per la botritizzazione delle uve.

Naturalmente, in parallelo a questa ricerca, il Centro per la Sperimentazione in Vitivinicoltura della Provincia di Verona sta conducendo prove di infezione in campo e in fruttajo per mettere a punto

la migliore strategia di gestione della botritizzazione artificiale. Il successo di queste attività di ricerca sarà pienamente raggiunto solo con il coinvolgimento di produttori consci che questa pratica potrà offrire una valida opportunità tecnologica per produrre vini nei quali il contributo della muffa nobile può essere standardizzato e personalizzato. ■

Fig. 6 - Analisi dei mosti ottenuti da acini non inoculati e acini inoculati con ceppi di *B. cinerea* B e C ($\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mL}$ laccasi, g/L glicerolo, g/L x10 acido gluconico, g/100mL glucosio e fruttosio) a fine appassimento



Bibliografia

Alfonso C., Raposo R., Melgarejo P. (2000) Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology*, 49, 243-251.

Bueno M., Culleré L., Cacho J., Ferrerai V. (2010) Chemical and sensory characterization of oxidative behaviour in different wines. *Food Research International*, 43: 1423-1428.

Caillé S., Samson A., Wirth J., Diéval J.-B., Vidal S., Cheynier V. (2010) Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposure pre and post bottling. *Analytical Chimica Acta*, 660, 35-42.

Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.M., Simon A., Viaud M. (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.*, 277, 1-10.

Cotoras M., Silva E. (2005) Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia*, 97: 485-492.

Derckel J.P., Baillieul F.,

Manteau S., Audran J.C., Haye B., Lambert B., Legendre L. (1999) Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis*. *Phytopathology*, 89, 197-203.

Dugan F.M., Lupien S.L., Grove G.G. (2002) Incidence, aggressiveness and *in planta* quiescent in grape berries and dormant buds in Central Washington State. *J Phytopathology*, 150; 375-381.

Edwards S.G., Seddon B. (2001) Selective media for the specific isolation and enumeration of *Botrytis cinerea* conidia. *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 63-66.

Favale S., Garofolo A., Moretti S., Tiberi D., Cedroni A., Cargnello G., Casadei G., Bruffa R., Ciolfi G. (2005) La Malvasia del Lazio: proposta di vinificazione innovativa con uve da muffa nobile. *Vignevisini*, 7/8: 103-109.

Fedrizzi B., Zapparoli G., Finato F., Tosi E., Turri A., Azzolini M., Versini G. 2011. Model aging and oxidation effects on varietal, fermentative, and sulfur compounds in a dry botrytized red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 1804-1813.

Guenzi S., Mencarelli F.,

Bellincontro A., Vannini A., Vuono G. (2011) Botritizzazione controllata. *VQ*, 1: 46-49.

Leroch M., Kretschmer M., Hahn M. (2011) Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany. *J Phytopathol*, 159: 63-65.

Martinez, F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., Feraud M. (2003) Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathology*, 109: 479-488.

Minussi R.C., Rossi M., Bologna L., Rotilio D., Pastore G.M., Duran N. (2007). Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45: 102-107.

Moyano C., Alfonso C., Gallego J., Raposo R., Melgarejo P. (2003) Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. *European J Plant Pathology*, 109, 515-522.

Muñoz C., Gómez Talquena S., Oriolani E., Combina M. (2010) Genetic characterization of grapevine-in-

fecting *Botrytis cinerea* isolates from Argentina. *Rev Iberom Micol*, 27: 66-70.

Nelson K. E., Amerine M. A. 1956 Use of *Botrytis cinerea* for the production of sweet table wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 7, 131-136.

Nelson N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.

Nelson N., Kosuge T., Nighthingale A. 1963. Large-scale production of spores of botrytise grapes for commercial natural sweet wine production. *Am. J Enol Vitic.* 14, 118-128.

Paplomatas E.J., Pappas A.C., Antoniadis D. (2005) A relationship among fungicide-resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* based on RAPD analysis. *J. Phytopathology*, 152: 503-508.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006) *Handbook of Enology. The chemistry of wine: stabilization and treatments*. Vol. 2. 2nd edn, Wiley & Sons, Chichester, UK.

Tiberi D., Pietromarchi P., Vuono G., Bellincontro A., Vannini A., Mencarelli F. (2008) Botritization in a controlled environment and in field of Malvasia Puntinata effects on grapes and wines. *Riv Vitic Enol*, 61/62: 255-260.

Topolovec-Pintarić S. (2009) Resistance risk to new botryticides in *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in winegrowing areas in Croatia *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116, 73-77.

Tosi E., Fedrizzi B., Azzolini M., Finato F., Simonato B., Zapparoli G. (2012) Effects of noble rot on must composition and aroma profile of Amarone wine produced by the traditional grape withering protocol. *Food Chemistry* 130: 370-375

Vercesi A., Locci R., Prosser J.I. (1997) Growth kinetics of *Botrytis cinerea* on organic acids and sugars in relation to colonization of grape berries. *Mycol. Res.* 101 (2): 139-142.