



IDENTIFICAZIONE DI POTENZIALI MARCATORI PROTEICI DI MUFFA NOBILE NELL'UVA INFETTATA IN APPASSIMENTO

La valutazione della presenza di *Botrytis cinerea* nella sua forma nobile nell'uva in appassimento è di grande importanza nel processo di vinificazione dell'Amarone, poiché influisce sulle sue proprietà organolettiche/sensoriali. Nel presente lavoro viene descritta un'analisi proteica di uva appassita infettata da muffa nobile allo scopo di identificare dei possibili marcatori che ne rilevino l'infezione durante il processo di appassimento.



M. Lorenzini

B. Simonato

Di
Marilinda Lorenzini^a
Barbara Simonato^a
Renato Millioni^{b,c}
Cinzia Franchin^{c,d}
Giacomo Zapparoli^a
Giorgio Arrigoni^{c,d}

^a Dipartimento di Biotecnologie,
 Università di Verona - Verona

^b Dipartimento di Medicina, Università
 di Padova - Padova

^c Centro di Proteomica dell'Università
 di Padova - Padova

^d Dipartimento di Scienza Biomedica,
 Università di Padova - Padova

INTRODUZIONE

■ L'appassimento dell'uva, un processo tecnologico utilizzato per la produzione di vini passiti, determina una parziale disidratazione dell'acino con una conseguente perdita di peso che può raggiungere il 40%. Durante questo processo, *Botrytis cinerea* può colonizzare gli acini e, in condizioni ambientali favorevoli, può svilupparsi in forma larvata (muffa nobile) determinando modificazioni chimiche ed enzimatiche che portano ad un

notevole cambiamento della composizione dell'uva (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

■ La presenza di questo fungo influenza positivamente l'aroma di alcuni vini come il *Tokaji Aszu*, i *Sauternes* e il *Trockenbeere-nauslese*, detti vini bottrizzati poiché sono intenzionalmente prodotti da uva infetta da *B. cinerea* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Di contro però, l'infezione da *B. cinerea*, può influenzare negativamente le proprietà or-

ganolettiche di altri vini a causa dell'attività ossidativa dovuta agli enzimi del fungo, determinando una diminuzione del colore, un'alterazione dei profumi e dell'aroma che sono caratteristiche non apprezzate dai consumatori (Li *et al.*, 2008).



DOCUMENTO TECNICO

Fig. 1 - Analisi 2-DE di uva sana (A) e uva infettata (B). I numeri si riferiscono agli spot analizzati tramite MS. Gli spot numerati in bianco (3, 9, 10, 16 e 23) mostrano un *fold-change* di almeno 1.5 tra i gruppi e raggiungono una significatività statistica ($p > 0.05$). Gli spot numerati in nero (46, 47, 48, 49, 50 e 51) sono stati individuati solo nel profilo proteico ottenuto da acini infettati con muffa nobile.

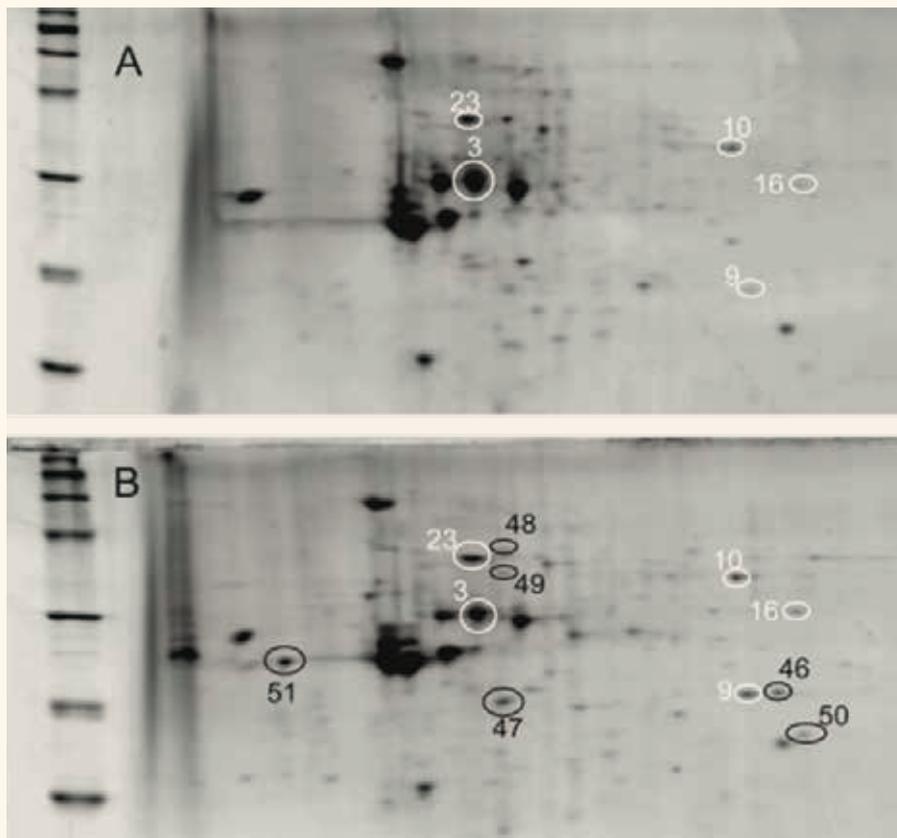
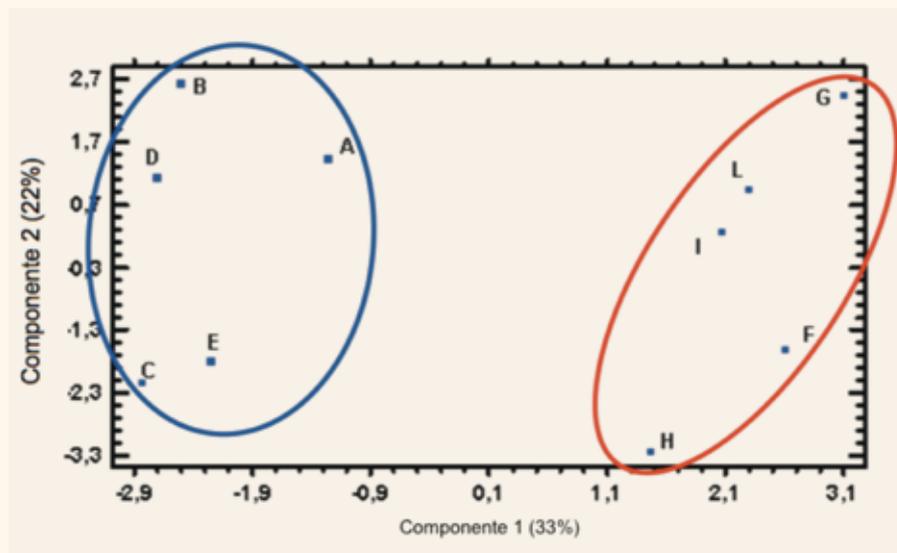


Fig. 2 - Analisi dei componenti principali (PCA) ottenuta dal profilo 2-DE di uva sana (A-E) e infettata (F-L).



■ L'Amarone è il vino rosso passito più importante prodotto principalmente con uva Corvina appassita non bottrizzata. La presenza di muffa nobile però non può essere esclusa perché *B. cinerea* può svilupparsi in determinate condizioni termo-igrometriche che normalmente sono presenti durante il processo di appassimento. Sebbene l'impatto della muffa nobile sull'aroma e la qualità sensoriale dell'Amarone siano già state studiate (Fedrizzi *et al.*, 2011; Tosi *et al.*, 2012), sono stati condotti pochi studi sugli effetti della infezione di *Botrytis* sul profilo proteico dell'uva appassita (Vincenzi *et al.*, 2012).

■ L'infezione da muffa nobile sulle uve a bacca rossa non può essere facilmente stimata. La possibilità di individuare *B. cinerea* sull'uva è di grande importanza al fine di prevedere le possibili modificazioni organolettiche/sensoriali nel vino e quindi gestire in modo opportuno la vinificazione.

■ In questo studio, è stata effettuata una analisi comparativa del proteoma dell'uva sana vs uva infettata da muffa nobile utilizzando l'elettroforesi bidimensionale (2-DE) combinata con la spettrometria di massa (MS). Lo scopo di questo studio è stato quello di investigare gli effetti dell'infezione nobile sul profilo proteico di Corvina appassita e individuare quindi possibili marcatori di infezione.

■ Questi potrebbero essere utilizzati per stimare, prima della vinificazione, la presenza di muffa nobile rendendo tale informazione molto preziosa per i produttori.

MATERIALI E METODI

■ Gli acini di uva (cv Corvina) sono stati raccolti da vigne della Valpolicella (Italia) e infettati utilizzando una sospensione di un ceppo di *B. cinerea* (siglato B2) come descritto da Lorenzini *et al.* (2013). Un totale di 100 acini infettati e 100 acini sani sono stati messi in condizioni di appassimento fino al raggiungimento del 35% p/p di perdita di peso.

■ L'uva sana congelata e infettata è stata polverizzata separatamente in mortaio in presenza di azoto liquido. L'estrazione delle proteine, la relativa quantificazione, l'elettroforesi bidimensionale (2-DE) e l'identificazio-



ne tramite LC-MS/MS degli spots è stata effettuata seguendo il protocollo descritto da Lorenzini *et al.*, 2015.

RISULTATI DISCUSSIONE

Analisi dell'uva

■ È stata valutata l'infezione su uva di *B. cinerea* da un punto di vista chimico. I dati ottenuti, (Tab. 1) mostrano un rapporto di glicerolo/acido gluconico e un valore di attività laccasica che confermano la presenza di muffa nobile nell'uva infettata (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Quindi, il protocollo di infezione, precedentemente descritto (Lorenzini *et al.*, 2015), ha permesso di effettuare, in saggi di piccola o larga scala, un'infezione di muffa nobile su uva in condizioni di appassimento.

Analisi 2-D delle proteine

■ L'estratto totale delle proteine di acini sani e infettati è stato analizzato tramite 2-DE in modo da valutare gli effetti dell'infezione di muffa nobile sulle proteine dell'uva ed evidenziare la presenza di proteine di *B. cinerea* negli acini infettati.

■ Il profilo delle proteine dei due campioni di uva è risultato significativamente differente in termini di numero di spot e concentrazione relativa (Fig. 1A e B) e, sulla base dell'analisi statistica delle mappe 2-DE, sono stati identificati circa 50 spot da sottoporre alla comparazione tra tutti i replicati dei gel. L'analisi delle componenti principali (PCA) è stata effettuata per valutare se i due gruppi (uva infettata e sana) si possono discriminare basandosi sui dati della 2-DE. Le prime due componenti principali (PC1 e PC2) hanno descritto oltre il 50% della varianza totale e, come si può osservare in Fig. 2, la PC1 (33%) permette di discriminazione nettamente le mappe degli acini sani (A-E) da quelli infettati (F-L).

■ E' interessante notare che anche nell'analisi dei componenti principali (PC1) i 5 spot (3, 9, 10, 16, e 23), la cui differenza di intensità tra i gruppi raggiunge una significatività statistica (*t-test*, $p < 0.05$) e almeno 1.5 di *fold-change*, raggiungono le variabili di punteggio migliori. Inoltre, altri 6 spot (46, 47, 48, 49, 50 e 51)

Tab. 1 - Composizione di uva Corvina sana e infettata da muffa nobile. *Significatività statistica per $p < 0.05$

	Acini sani	Acini infettati
Acido gluconico (g/L)	0.07±0.03	0.29±0.05*
Glicerolo (g/L)	0.03±0.01	4.32±0.22*
Glicerolo/acido gluconico	0.4±0.1	14.7±0.2*
Glucosio e fruttosio (g/L)	297.3±9.4	305.1±13.1
L-acido malico (g/L)	0.93±0.03	1.21±0.04*
L-acido lattico (g/L)	0.04±0.02	0.05±0.01
Attività laccasica (U/mL)	0.2±0.1	6.3±0.6*

sono stati individuati solo nel profilo proteico di acini infettati da muffa nobile, indicando che essi sono correlati molto probabilmente alla presenza delle proteine di *B. cinerea*.

Identificazione degli spot delle proteine

■ Gli spot ottenuti dai gel 2-DE che mostrano una significativa differenza sia tra i campioni sani sia tra quelli infettati ($p < 0.05$) e almeno 1.5 di *fold-change* sono stati analizzati con la spettrometria di MS. I risultati sono riportati in Tab. 2, in cui sono mostrate le proteine di *B. cinerea* identificate in uva infettata.

■ Il risultato più importante di questo studio è stata l'identificazione, solo negli acini infettati, di un certo numero di proteine di *B. cinerea* che potrebbero rappresentare potenziali marcatori di infezione.

■ La proteina di *B. cinerea* denominata *Worionin body major protein* è stata identificata negli spot 46 e 47. Il *Worionin body* è un nucleo denso del perossisoma che si può ritrovare in molti generi di ascomiceti filamentosi ed è fondamentale per lo sviluppo e la funzione dell'appressorio durante la colonizzazione della muffa. Nell'uva infettata è stata determinata anche una ipotetica proteasi acida di *B. cinerea* (spot 51). Recentemente, è stato proposto l'utilizzo di una proteasi acida aspartica della *B. cinerea* per la rimozione, in vino bianco, della torbidità dovuta alla precipitazione delle proteine, specialmente chitinasi (Van Sluyter *et al.*, 2013). Inoltre, studi precedenti hanno dimostrato che le proteasi di *B. cinerea* sono in grado di idrolizzare le proteine del mosto e del vino coinvolte nella

formazione di schiuma nel vino spumante (Cilindre *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2011).

■ Tra le proteine di *B. cinerea* presenti negli acini infettati è stata identificata anche la peroxidossina-5 (spot 47) che appartiene alla categoria delle proteine di difesa contro le specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed è associata con la risposta di difesa durante l'interazione pianta-fungo e la malato deidrogenasi (spot 47), fattore di virulenza coinvolto nella interazione tessuto-ospite già individuato in uva che mostrava la presenza di *B. cinerea* (Vincenzi *et al.*, 2012). Inoltre, sono state identificate altre proteine di *B. cinerea* come: la catena beta dell'ATP sintasi (spot 48 e 49) e la subunità alfa dell'ATP sintasi (spot 50), coinvolte nel metabolismo energetico dei funghi; la 3-alfa (o 20-beta) idrossisteroide deidrogenasi (spot 49), un enzima che appartiene alla famiglia delle ossidoriduttasi; la proteina *vjbO* (spot 50) con attività di tiamina fosfato sintasi e una proteina ipotetica simile alla proteina ribosomiale (spot 49). Negli acini infettati sono state identificate anche alcune proteine di *B. cinerea* con funzione sconosciuta: una proteina ipotetica conservata (spot 47 e 48) e due proteine predette (spot 49).

■ L'infezione di muffa nobile nell'uva appassita non è semplice da individuare su base visiva, specialmente in quella rossa. Le proteine, descritte in precedenza, presenti solo in uva infettata potrebbero rappresentare dei potenziali marcatori specifici per l'infezione di muffa nobile. Sarebbe quindi, molto importante per i produttori disporre di specifici test per la loro rilevazione nei fruttai e per quantificare il livello di infezione di questa muffa. Alcuni gruppi di ricerca hanno già svi-



DOCUMENTO TECNICO

Tab. 2 - Proteine di *B. cinerea* in acini infetti identificate tramite MS. Vengono riportati i numeri degli spot, codice di accesso della banca dati, descrizione della proteina, punteggio Mascot, numero di peptidi identificati e copertura della sequenza.

N° spot	Codice UniProt	Descrizione della proteina identificata	Punteggio	#peptidi	%copertura
46	BC1G_12729	Proteina del Woronin body major	115.52	3	16.27
47	BC1T_05133	Peroxiredoxin-5, precursore mitocondriale	83.54	2	17.31
	BC1T_12729	Proteina del Woronin body major	72.27	2	21.08
	BC1T_07409	Malate dehydrogenase, precursore mitocondriale	54.26	2	4.99
	BC1T_05503	Conserved hypothetical protein (126 aa)	41.10	2	8.80
48	114575	ATP synthase β chain, precursore mitocondriale	73.25	2	4.50
	BC1T_05503	Conserved hypothetical protein (126 aa)	46.02	2	29.60
49	BC1T_10819	Predicted protein 3- α -(or 20- β)-hydroxysteroid dehydrogenase	885.10	6	33.00
	BC1T_05004		100.04	3	7.00
	BC1T_13687	Hypothetical protein similar to ribosomal protein	93.43	3	6.91
	114575	ATP synthase β chain, precursore mitocondriale	86.79	2	4.89
	BC1T_08322	Predicted protein	46.31	2	8.39
50	BC1T_10900	Proteina yjbQ	89.37	2	13.19
	BC1T_07780	ATP synthase subunit α , precursore mitocondriale	55.42	2	4.10
51	BC1T_14153	Hypothetical protein similar to acid protease	321.73	2	7.78

luppato anticorpi policlonali contro antigeni fungini, solubili in acqua, estratti dall'intero micelio di *B. cinerea* (Ricker *et al.*, 1991).

■ Meyer e Dewey (2000) hanno messo a punto anticorpi monoclonali che sono stati utilizzati in *plate-trapped antigen-enzyme-linked immunosorbent assays* (PTA-ELISAs) o in *Tube immunoassays* (Dewey e Meyer, 2004) per rilevare l'infezione in mosto. Tuttavia,

l'utilizzo di anticorpi è sempre associato a rischi di reattività crociata con proteine di altri funghi come *Aspergillus* e *Penicillium* e potrebbe quindi essere un metodo impreciso per diagnosticare la presenza di una specifica infezione di *B. cinerea*. Infatti, la debole crescita del micelio di *B. cinerea* all'interno dell'acino durante il processo di disidratazione, così come la presenza di al-

tri patogeni fungini, potrebbe impedire un rilevamento affidabile dell'infezione nobile. Inoltre, se eseguita su vino rosso o uva rossa, l'analisi ELISA può risultare meno sensibile, oltre che per l'adsorbimento delle proteine nella matrice solida, per l'interferenza con composti che possono essere presenti ad alte concentrazioni nella matrice (specie polifenoli).

■ Nel presente lavoro, sono state identificate alcune proteine della muffa nobile che sono espresse ad alti livelli nell'uva infettata e che quindi, potrebbero rappresentare dei validi marcatori specifici per questo tipo di infezione. La loro identificazione e quantificazione negli acini durante l'appassimento potrebbe essere un buon strumento per una corretta gestione del processo di vinificazione. Però, al fine di sfruttare appieno le potenzialità di questo studio, sarebbe molto vantaggiosa l'ottimizzazione del saggio di quantificazione tramite spettrometria di massa (MS/MS) basandosi sull'utilizzo del metodo "Selected Reaction Monitoring" (SRM). L'utilizzo della spettrometria di massa non soffre della limitazione imposta da un approccio basato sugli anticorpi, ha maggiore sensibilità e specificità nell'individuazione e nella quantificazione delle proteine bersaglio rispetto ad una quantificazione di tipo immunologico (Tolin *et al.*, 2012).

■ Come atteso, i dati del presente studio mostrano anche che l'infezione di *B. cinerea* induce alterazioni nel profilo proteico di *V. vinifera*, specie per quanto riguarda proteine coinvolte nei meccanismi di difesa della pianta. In particolare, sono state individuate in uva infetta tre isoforme di endochinasi di classe IV e una 1,3-b-glucanasi. Inoltre, sono state osservate triosiforatoisomerasi, enolasi, due differenti tipi di subunità alfa del proteasoma, nucleoside difosfato chinasi, fosfoglicerato chinasi e la putativa proteina taumatin-like.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

■ Nel presente lavoro è riportata la prima indagine dell'espressione proteica di *B. cinerea* in uve appassite infettate da muffa nobile. Il risultato più interessante di questo studio è



DOCUMENTO TECNICO

rappresentato dall'individuazione e l'identificazione di alcune proteine presenti solo in uva infettata, che potrebbero rappresentare dei potenziali marcatori della presenza di questo fungo nell'uva in appassimento.

■ Poiché la muffa nobile influenza le caratteristiche fisico-chimiche e la stabilità del vino, lo sviluppo di un test che permetta di determinare in fruttajo questi specifici marcatori di infezione da muffa nobile potrebbe essere di interesse per i produttori. ■

BIBLIOGRAFIA

- Cilindre, C., Jégou, S., Hovasse, A., Schaeffer, C., Castro, A.J., Clément, C., Van Dorsselaer, A., Jeandet, P., Marchal, R. (2008). Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Proteome Research*, 7, 1199-1208.
- Dewey, F., and Meyer, U. (2004). Rapid, quantitative tube immunoassays for on-site detection of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Penicillium* antigens in grape juice. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 11-19.
- Fedrizzi, B., Tosi, E., Simonato, B., Finato, F., Cipriani, M., Caramia, G., et al. (2011). Changes in Wine Aroma Composition According to Botrytized Berry Percentage: A Preliminary Study on Amarone Wine. *Food Technology and Biotechnology*, 49(4), 529-535.
- Hong, Y., Cilindre, C., Liger-Belair, G., Jeandet, P., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P. (2011). Metabolic influence of *Botrytis cinerea* infection in champagne base wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7237-7245.
- Li, H., Guo, A., and Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108, 1-13.
- Lorenzini M., Million R., Franchin C., Zapparoli G., Arrigoni G., Simonato B. (2015). Identification of potential protein markers of noble rot infected grapes. *Food Chem.*, 179, 170-174.
- Lorenzini, M., Azzolini, M., Tosi, E., & Zapparoli, G. (2013). Postharvest grape infection of *Botrytis cinerea* and its interactions with other moulds under withering conditions to produce noble-rotten grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 762-770.
- Meyer, U.M., and Dewey, F.M. (2000). Efficacy of different immunogens for raising monoclonal antibodies to *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 104, 979-987.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud-Funel, A. (2006). *Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1) (2nd ed.). Chichester, UK: Wiley & Sons.
- Ricker, R.W., Marois, J.J., Dlott, J.M., Bostock, R.M., Morrison, J.C. (1991). Immunodetection and quantification of *Botrytis cinerea* on harvested wine grapes. *Phytopathology*, 81, 404-411.
- Tolin, S., Pasini, G., Curioni, A., Arrigoni, G., Masi, A., Mainente, F., & Simonato, B. (2012). Mass spectrometry detection of egg proteins in red wines treated with egg white. *Food Control*, 23(1), 87-94.
- 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(2), 370-375.
- Van Sluyter, S.C., Warnock, N.I., Schmidt, S., Anderson, P., van Kan, J.A.L., Bacic, A., Waters, E.J. (2013). Aspartic acid protease from *Botrytis cinerea* removes haze-forming proteins during white winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9705-9711.
- Vincenzi, S., Tolin, S., Cocolin, L., Rantsiou, K., Curioni, A., Rolle, L. (2012). Proteins and enzymatic activities in Erbaluce grape berries with different response to the withering process. *Analytica Chimica Acta*, 732, 130-136.