



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI
LIEVITI non-*Saccharomyces* DA UVE
MARAŠTINA

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF
non-*Saccharomyces* YEASTS FROM
MARAŠTINA GRAPES

TESI SPERIMENTALE

Studente:
PIERPAOLO NOCCHI

Relatore:
DOTT.SSA CRISTIANA GAROFALO

Correlatori:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIĆ
DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

Sommario.....	2
Elenco delle Figure	4
Elenco delle Tabelle.....	5
Acronimi e Abbreviazioni.....	6
1. Introduzione	7
1.1. Ecologia microbica delle uve	7
1.2. Fattori che influenzano la crescita dei lieviti sulla superficie degli acini d'uva ..	8
1.3. I lieviti non- <i>Saccharomyces</i>	10
1.3.1. I principali generi di lieviti non- <i>Saccharomyces</i>	11
1.3.2. Applicazioni biotecnologiche di lieviti non- <i>Saccharomyces</i>	15
1.4. Metodi di identificazione e conta microbica	17
2. Scopo della Tesi	20
3. Materiali e Metodi.....	21
3.1. Campionamento	21
3.2. Conta vitale	23
3.3. Isolamento e purificazione	23
3.4. Crioconservazione.....	24
3.5. Estrazione del DNA dalle colture pure	24
3.6. Amplificazione via PCR delle regioni ITS1 e ITS2 incluso il gene 5.8S rRNA	24
3.7. Elettroforesi su gel di agarosio.....	26
3.8. Identificazione dei lieviti.....	26
4. Risultati e Discussione	27

4.1. Risultati delle conte vitali.....	27
4.2. Risultati dell'identificazione molecolare dei lieviti non- <i>Saccharomyces</i>	28
5. Conclusione.....	44
6. Bibliografia	45
Ringraziamenti.....	48

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 3-1: Localizzazione dei vigneti elaborata con il software QGIS3	21
Figura 3-2: Ciclo termico seguito per la PCR.....	26
Figura 4-1: Esempio di profilo elettroforetico	29
Figura 4-2: Distribuzione delle principali specie non- <i>Saccharomyces</i> rilevate negli undici vigneti	37
Figura 4-3: Distribuzione delle principali specie non- <i>Saccharomyces</i> rilevate nei singoli vigneti	38
Figura 4-4: Colonie di specie appartenenti al genere <i>Aureobasidium</i> : a) <i>Aureobasidium pullulans</i> ; b) <i>Aureobasidium melanogenum</i> ; c) <i>Aureobasidium namibiae</i> ; su terreno di coltura WL	39
Figura 4-5: Colonie di specie appartenenti al genere <i>Metschnikowia</i> : a) <i>Metschnikowia chrysoperlae</i> ; b) <i>Metschnikowia pulcherrima</i> ; su terreno di coltura WL	41
Figura 4-6: Colonie della specie <i>Hanseniaspora uvarum</i> su terreno di coltura WL.....	42
Figura 4-7: Colonie della specie <i>Lachancea thermotolerans</i> su terreno di coltura WL	42
Figura 4-8: Colonie della specie <i>Pichia kluyveri</i> su terreno di crescita WL.....	43
Figura 4-9: Colonie della specie <i>Rhodotorula babjevae</i> su terreno di crescita WL	43

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1- Substrati maggiormente impiegati per la conta e l'isolamento dei lieviti da vino	18
Tabella 3-1: Elenco campioni suddivisi per località.....	22
Tabella 3-2: Composizione del terreno di coltura WL	23
Tabella 3-3: Composizione del terreno di coltura YPD utilizzato per la crioconservazione	24
Tabella 3-4: Sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione del DNA.....	25
Tabella 3-5: Composizione della miscela di reazione usata per la PCR.....	25
Tabella 4-1: Risultati delle conte vitali di lieviti in piastra contenente terreno di crescita WL	27
Tabella 4-2: Risultati identificazione molecolare degli isolati	30

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

UFC	Unità Formanti Colonia
UV	Ultra Violetti
WL	Wallerstein Laboratory
DNA	DeossiriboNucleic Acid
FISH	Fluorescence In Sito Hybridization
DEFT	Direct Epifluorescence Filter Technique
YM	Yeast and Molds
YEPG	Yeast Extract Peptone Glucose
PDA	Potato Dextrose Agar
DBDM	<i>Dekkera Brettanomyces</i> Differential Medium
VBNC	Viable But Not Culturable
PCR	Polymerase Chain Reaction
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
NGS	Next Generation Sequencing
IJK	Institute for Adriatic Crops and Karst Reclamation
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose Broth
TE	Tris EDTA
EDTA	Ethane-1,2-Diyldinitrilo Tetraacetic Acid
ITS	Internal Transcribed Spacer
dNTPs	deoxyNucleotide TriPhosphate
TBE	Tris Borato EDTA
p/v	Peso/Volume
D.s.	Deviazione standard

1. INTRODUZIONE

1.1. Ecologia microbica delle uve

Nonostante l'ecologia microbica delle uve sia stata ampiamente studiata, a seguito dell'influenza significativa da essa esercitata sulla qualità finale del vino, la sua composizione ancora non risulta essere completamente nota. Si stima che sulla superficie dei grappoli la popolazione microbica raggiunga valori di 10^3 - 10^5 UFC/g, considerando che oltre ai lieviti sono presenti anche batteri e funghi filamentosi. Questi valori in realtà variano sensibilmente a seconda del grado di maturazione delle uve, infatti sugli acini immaturi la concentrazione cellulare è piuttosto bassa, nell'ordine di 10 - 10^3 UFC/g, ma con il progredire della maturazione la popolazione raggiunge anche valori nell'ordine di 10^4 - 10^6 UFC/g (Romano & Capece, 2018). Nell'ambiente vitivinicolo la vigna, o più precisamente la superficie delle uve, è considerabile come nicchia specialistica dove i lieviti vinari formano delle comunità ampiamente variabili in funzione di numerosi parametri, come ad esempio il grado di maturazione dell'acino o l'impiego di fitofarmaci, che vanno ad influenzare la composizione del microbiota dell'uva. Sebbene i lieviti siano abbondantemente diffusi in natura, la loro distribuzione non è casuale, ma si ritrovano in specifici habitat, dove le diverse specie formano le comunità. All'interno delle comunità, inoltre, la distribuzione delle specie è influenzata da tutti quei fattori fisici, chimici e biotici che permettono ai lieviti di sopravvivere e svilupparsi (Romano & Capece, 2018). Questi fattori vanno a definire le cosiddette "nicchie" ed in base a queste possiamo identificare lieviti "generalisti", se li ritroviamo in nicchie differenti (nicchie estese) e lieviti "specialisti" se invece li ritroviamo solo in habitat unici (nicchie limitate) (Romano & Capece, 2018). Anche le tipologie di lieviti presenti variano con la maturazione, sui grappoli immaturi predominano i generi *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Candida*, oltre ad *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Filobasidium* e *Rhodosporium* che sono presenti in generale nel suolo, sulle foglie e sulla corteccia delle viti. In alcuni casi specie del simil-lievito *Aerobasidium pullulans* (Sabatel, Canol, Esteve-Zarzoso, & Guillamòn, 2002) sono predominanti sulle uve dall'invasatura fino alla fase di raccolta, andando a costituire il "microbiota" residente sui chicchi d'uva (Romano & Capece, 2018). Sui grappoli maturi invece, predominano le specie

appartenenti ai generi *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, rappresentando il 50-75% circa della popolazione blastocetica totale. Numericamente meno presenti sono invece le specie di *Candida* (*C. zemplinina*), *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Cryptococcus*, *Sporidiobolus*, *Torulasporea* e *Zygosaccharomyces* (Romano & Capece, 2018). Diversa è la situazione per specie fermentative di *Saccharomyces*, che contrariamente alla credenza popolare, si presentano in popolazioni estremamente basse su uve sane e non danneggiate e sono raramente isolate da acini intatti (Sabatel, Canol, Esteve-Zarzoso, & Guillaumon, 2002).

1.2.Fattori che influenzano la crescita dei lieviti sulla superficie degli acini d'uva

Molti sono i fattori che influenzano la composizione della microflora epifitica delle uve, ma di primaria importanza sono le condizioni climatiche e microclimatiche, le modalità di gestione del vigneto e fattori biotici (Romano & Capece, 2018). Quando si parla di condizioni climatiche si intendono la temperatura, l'esposizione ai raggi UV, le precipitazioni, la luce solare e i venti (Barata, Mafeito-Ferreira, & Loureiro, 2012). Ciascuno di questi parametri influisce sia sulla diversità che sulla quantità delle popolazioni, anche se tra i molti studi a riguardo ci sono alcuni risultati contrastanti, come ad esempio la piovosità che nella maggior parte dei casi determina una maggiore conta dei lieviti, probabilmente dovuta all'aumento del volume dell'acino che può portare a lacerazioni della buccia con conseguente fuoriuscita di succo e ad una maggiore disponibilità di nutrienti sulla superficie dell'acino dovuta a fenomeni di esosmosi (Barata, Mafeito-Ferreira, & Loureiro, 2012). Tuttavia in altri studi sono emersi risultati ben diversi, secondo i quali in annate con precipitazioni elevate si sono ottenuti conteggi totali anche dieci volte inferiori (Comitini & Ciani, 2006). Anche per quanto riguarda le pratiche agronomiche (fertilizzazione, irrigazione) e la modalità di gestione del vigneto (biologico o convenzionale) e di conseguenza la tipologia di prodotti chimici utilizzati nei trattamenti, i risultati ottenuti non sono univoci, infatti molti studi concordano sul fatto che l'agricoltura biologica favorisca maggiori conte microbiche ed una maggiore biodiversità, in quanto sembra che la persistenza dei fungicidi usati in viticoltura convenzionale sulle uve possa influenzare negativamente l'ecologia delle comunità di lieviti coinvolte nella fermentazione e non (Barata, Mafeito-Ferreira, & Loureiro, 2012; Romano & Capece, 2018). Altri studi però, evidenziano una variazione delle specie che colonizzano gli acini ed una maggiore abbondanza di lieviti nei vigneti condotti in modo convenzionale rispetto a quelli trattati solamente con rame e zolfo, i

principali fungicidi ammessi in agricoltura biologica (Milanovic, Comitini, & Ciani, 2013). Questi risultati contrastanti sono probabilmente dovuti all'impossibilità di valutare i diversi fattori separatamente ed è forse in parte attribuibile agli effetti eco tossici che il rame ha su diverse popolazioni microbiche (Martins, et al., 2014). Alcuni fattori biotici come gli invertebrati, influenzano il microbiota dell'uva mediante diversi meccanismi: essi agiscono sia direttamente, attaccando gli acini e causando la fuoriuscita di succo e quindi una maggiore disponibilità di nutrienti, sia come vettori microbici, ruolo interpretato da api e vespe, ma soprattutto da *Drosophila* (il moscerino della frutta), che è stata associata positivamente alla presenza di lieviti apiculati come *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membrifaciens* e *Metschnikowia pulcherrima*, ma anche di batteri lattici ed acetici (Barata, Mafeito-Ferreira, & Loureiro, 2012). Anche gli uccelli sembrano fungere da vettori di lieviti frequentemente associati alle uve, come è emerso da recenti studi che hanno rilevato nel becco e nella parte iniziale del tratto digestivo ben diciotto differenti specie di lievito, come *Saccharomyces cerevisiae* e lieviti non-*Saccharomyces* come *Hanseniaspora uvarum* (Francesca, Canale, Settanini, & Moschetti, 2012). Oltre alle interazioni tra lieviti ed altri organismi, vanno considerati anche i fenomeni di interazione tra la popolazione microbica residente sulle uve, quali la produzione di tossine killer, sostanze ad attività antibiotica e altre molecole coinvolte nei meccanismi di *quorum sensing*. Da mettere in evidenza a questo proposito è l'attività di *Aureobasidium pullulans*, che sembra ridurre la diversità dei basidiomiceti per il rilascio di un fattore killer e che quindi potrebbe avere future applicazioni tecnologiche (Romano & Capece, 2018). Altri aspetti che hanno influenza sulle comunità microbiche sono il grado di maturazione dell'uva, composizione e spessore dello strato ceroso presente sugli acini e la posizione dell'acino nel grappolo. Il grado di maturazione delle uve è uno dei fattori che hanno un impatto maggiore, infatti, come precedentemente detto, tra la fase fenologica di invaiatura e quella di uva matura si ha una notevole variazione sia della concentrazione cellulare, passando da 10^1 - 10^3 UFC/g a 10^4 - 10^6 UFC/g, sia delle specie predominanti. Queste differenze si hanno per l'influenza che la maturazione ha sulla composizione e sulla disponibilità dei nutrienti sulla superficie dell'acino e per la diversa attrattività che l'uva ha verso possibili vettori. Lo strato di pruina che ricopre le bacche di uva, incide sull'adesione dei microrganismi e sulla loro capacità di colonizzare la superficie dell'acino e sembra che anche la posizione dell'acino all'interno del grappolo sia determinante, come ad esempio la zona vicino al peduncolo che risulta essere un substrato particolarmente favorevole alla crescita dei lieviti rispetto al resto del grappolo, tanto da ospitare una popolazione da 10 a 100 volte più alta (Romano & Capece, 2018).

Sorprendente è invece il fatto che non ci sono evidenze sperimentali sulla dipendenza diretta della microflora dell'uva da varietà e posizione geografica del vigneto, mettendo in dubbio l'idea che possono esistere specie o ceppi di "terroir" (Barata, Mafeito-Ferreira, & Loureiro, 2012). Dopo aver analizzato in generale i fattori che influenzano la crescita microbica sulla superficie degli acini d'uva è necessario analizzare le ragioni per cui sono alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces* come *Hanseniaspora/Kloeckera* o *Metschnikowia* a prevalere rispetto ad altre come ad esempio *S. cerevisiae*. La diversa frequenza potrebbe essere spiegata con:

- Una migliore tolleranza di queste specie nei confronti di stress ambientali quali la temperatura, la siccità, l'irradiazione e la luce solare, dovuta probabilmente alla caratteristica di alcuni di essi di contenere carotenoidi che li rendono più resistenti alle radiazioni di quelli che non contengono queste sostanze (Sabatel, Canol, Esteve-Zarzoso, & Guillaumon, 2002);
- Una migliore tolleranza a sostanze inibitrici di natura chimica provenienti dal grappolo o distribuite dall'uomo con i trattamenti fitosanitari;
- Una migliore capacità di adesione alla superficie delle uve e di metabolizzare i composti presenti, soprattutto in uve ancora non molto mature, in cui la disponibilità di zuccheri è molto bassa e a prevalere sono necessariamente basidiomiceti oligotrofici, il fungo simile al lievito *A. pullulans* o ascomiceti a metabolismo ossidativo o debolmente fermentativo (Vaudano, Costantini, Pulcini, & Garcia-Moruno, 2018);
- Fenomeni di interazione con altre specie di lieviti, batteri e funghi filamentosi, che potrebbero svolgere un ruolo importante, ma su cui c'è ancora molto da indagare: basti pensare all'attività antagonistica del già citato *A. pullulans* o di *M. pulcherrima*, che produce "pulcherrimina", un pigmento insolubile che impoverisce il mezzo di ferro inibendo la crescita di numerosi microrganismi (Romano & Capece, 2018), e al fatto che questi non-*Saccharomyces* siano tra i più rappresentati sulla superficie delle uve.

1.3.I lieviti non-*Saccharomyces*

In ambito enologico le uve sono il principale vettore dei lieviti e come precedentemente illustrato, i principali membri del consorzio microbico sono rappresentati dai generi complessivamente detti non-*Saccharomyces*. Questi lieviti, che si trasferiscono naturalmente dall'uva al mosto durante il processo di pigiatura, con le loro caratteristiche fisiologiche

possono andare ad influenzare positivamente o negativamente le caratteristiche qualitative finali di un vino.

1.3.1. I principali generi di lieviti non-*Saccharomyces*

Tra tutte le popolazioni non-*Saccharomyces* che si possono ritrovare nei mosti, i lieviti di interesse enologico sono limitati come numero e tra di essi i principali generi sono:

- ***Hanseniaspora/Kloeckera***: il genere *Hanseniaspora* (e la sua forma anamorfica *Kloeckera*) appartiene all'ordine delle *Saccharomycetales*, famiglia delle *Saccharomycodaceae* e presenta una tipica riproduzione vegetativa con gemmazione bipolare che determina anche la caratteristica forma ovoide-apiculata della cellula, motivo per cui vengono anche denominati lieviti apiculati. Le colonie su terreno WL sono piatte ed intensamente colorate di verde. Dal punto di vista metabolico usano il glucosio come substrato di fermentazione, mentre non riescono ad utilizzare il nitrato come fonte di azoto. Fanno parte del genere *Hanseniaspora* dieci specie, di cui *H. uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* sono di interesse enologico, nonché i più rappresentati sulla superficie degli acini d'uva e nei mosti. Sono dotati di una certa vigoria fermentativa e per ciò sono i primi lieviti ad innescare la fermentazione alcolica, ma poi per la loro bassa resistenza all'alcol (3-5 % v/v sopra i 20°C) vengono presto sopraffatti da *S. cerevisiae* (Borren & Tian, 2021).
- ***Metschnikowia***: appartiene all'ordine *Saccharomycetales*, famiglia delle *Metschnikowiaceae*, la riproduzione è di tipo vegetativo per gemmazione multilaterale e le cellule sono da sferiche ad ellittiche. La maggior parte delle specie fermenta il glucosio, mentre non riescono ad assimilare il nitrato (Cocolin & Ciani, 2018). Il genere comprende trentanove specie, di cui quelle più frequentemente isolate in ambito vinario sono *M. pulcherrima* e *Metschnikowia fruticola*. Su terreno WL le colonie si presentano di colore crema o marrone e le due specie nominate si distinguono perché *M. pulcherrima* rilascia pulcherrimina, un pigmento che forma un alone rosso mattone attorno alle colonie. Dal punto di vista enologico questo genere è un componente normale del microbiota delle uve, ma presentando scarsa capacità competitiva e sensibilità all'anidride solforosa, si disattiva nelle prime fasi della fermentazione alcolica, ma presenta proprietà che la rendono comunque attraente per i viticoltori, come la capacità di produrre composti antimicrobici (pulcherrimina) attivi sia nel mosto che sulle uve in pre-

raccolta ed un'elevata attività enzimatica extracellulare, che contribuisce al miglioramento della complessità organolettica de vino e a fornire fonti di nutrizione azotate per idrolisi delle proteine (Borren & Tian, 2021).

- ***Candida/Starmerella***: il genere *Candida* è il più ampio ed eterogeneo, comprendendo 314 specie, diversamente da *Starmerella* (forma anamorfica asessuata) che invece ne comprende solo due: *Starmerella bombicola* e *Starmerella meliponinorum*. Le specie più diffuse sulle uve sono *C. stellata* e *Candida zemplinina*, fino al 2011 entrambe comprese in *C. stellata* (Borren & Tian, 2021). La morfologia cellulare varia tra le diverse specie, ma in generale si hanno cellule piccole e allungate con gemmazione sub-apicale; si differenzia *C. stellata*, più grossa e tondeggiante, che va a formare gruppi di cellule a forma di stella, da cui il nome. Anche l'aspetto su terreno WL può variare notevolmente a seconda della specie, passando da colonie convesse con bordi regolari intensamente colorate di verde a colonie bianche con consistenza cremosa (Cocolin & Ciani, 2018). Le specie *C. stellata*, *C. zemplinina* e *St. bombicola* presentano alcune peculiari caratteristiche di interesse enologico, quali la capacità di crescere e fermentare anche in presenza di alte concentrazioni zuccherine (osmofilia), la produzione di elevate concentrazioni di glicerolo e la tendenza a consumare più rapidamente il fruttosio del glucosio (lievito fruttosifilo) (Cocolin & Ciani, 2018). Tuttavia la loro incapacità di fissare l'azoto e di crescere in ambiente anaerobico, ne limitano la presenza nei fermenti del vino alle prime fasi (Borren & Tian, 2021).
- ***Pichia***: appartiene all'ordine *Saccharomycetales*, famiglia *Pichiaceae* e come *Candida* è un genere polifilogenetico. Include venti specie, di cui quattro di interesse vinario: *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *P. membranifaciens* e *Pichia occidentalis*. L'unico zucchero che funge da substrato per la fermentazione è il glucosio, mentre il nitrato non è l'unica fonte di azoto. Le cellule sono allungate ed ellissoidali, con riproduzione vegetativa multilaterale. Su terreno WL le colonie si presentano convesse, con colore bianco-grigio, un accentuato aspetto rugoso ed una consistenza farinosa. Si tratta di lieviti non competitivi con *S. cerevisiae*, ma sono in grado di rimanere latenti e resistere all'etanolo e per questo riescono a svilupparsi nel vino diventando, in presenza di ossigeno, agenti dell'alterazione chiamata "fioretta" (Cocolin & Ciani, 2018).

- ***Wickerhamomyces***: il genere *Wickerhamomyces* è stato introdotto solo recentemente nella tassonomia dei lieviti ed appartiene all'ordine *Saccharomycetales*, famiglia delle *Wickerhamomycetaceae*. Le specie accertate al momento sono diciassette, di cui solo *Wickerhamomyces anomalus* (ex. *Hansenula anomala* e *Pichia anomala*) è di interesse enologico per la produzione di un elevato livello di enzimi extracellulari attivi in condizioni simili al vino (Borren & Tian, 2021). Le cellule si presentano sferiche-ovoidi o allungate, la riproduzione asessuale avviene per gemmazione multilaterale e in alcuni casi possono produrre pseudoife o ife vere. Solo alcune specie sono in grado di fermentare gli zuccheri, mentre il nitrato è assimilato come unica fonte di azoto (Cocolin & Ciani, 2018).
- ***Saccharomycodes***: tale genere è incluso nell'ordine *Saccharomycetales* ed insieme a *Hanseniaspora*, nella famiglia *Saccharomycodaceae*. Solo due specie sono ascrivibili a questo genere e solo una di esse è di interesse enologico: *Saccharomycodes ludwigii*. La riproduzione vegetativa avviene per gemmascissione (particolare gemmazione bipolare) e le cellule assumono la forma a limone tipica degli apiculati. Le colonie su terreno WL si presentano bianco-verdi, con una protuberanza più intensamente colorata di verde al centro (Cocolin & Ciani, 2018).
- ***Torulaspota***: genere compreso nell'ordine *Saccharomycetales*, famiglia delle *Saccharomycetaceae*. A questo genere appartengono sei specie, di cui la più diffusa ed enologicamente importante è *Torulaspota delbrueckii*. Dal punto di vista morfologico le cellule sono globose o ellittiche, con possibile formazione di pseudoife e di protuberanze che si formano in seguito a tentativi di coniugazione e che ne facilitano il riconoscimento mediante osservazione microscopica (Cocolin & Ciani, 2018). Le cellule vegetative sono prevalentemente aploidi, con gemmazione multilaterale, seguita da coniugazione fra la cellula e la sua stessa gemma e successivamente dalla sporificazione. Su terreno WL le colonie appaiono con un colore dal bianco al verde pallido, forma convessa e consistenza cremosa. Dal punto di vista metabolico il glucosio non è l'unico zucchero fermentato. *T. delbrueckii* è usata da tempo in ambito vinario per ridurre la produzione di acido acetico nei vini, per migliorarne il profilo aromatico, in considerazione della sua elevata purezza fermentativa e della buona tolleranza all'alcol (Bely, Stoeckle, Masneuf-Pomarède, & Dubourdieu, 2008). Alcune

ricerche, inoltre, dimostrano che alcuni ceppi presentano caratteri killer nei confronti di *S. cerevisiae* e di altri lieviti non-*Saccharomyces* (Borren & Tian, 2021).

- ***Zygosaccharomyces***: come *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces* appartiene alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*. Le specie accettate nel genere sono sei, tra cui *Zygosaccharomyces rouxii* e *Zygosaccharomyces bailii* sono da mettere in evidenza. Le cellule sono di forma sferica o ovale allungata, si dividono per gemmazione multilaterale e le colonie cresciute su terreno WL appaiono convesse, di colore bianco-verde pallido e cremose. Questi lieviti sono fruttosofili e osmotolleranti, presentano una buona attitudine fermentativa, sono dotati di resistenza ai principali antisettici e di alcol-tolleranza (Cocolin & Ciani, 2018). Tutte queste caratteristiche gli consentono di svilupparsi nei prodotti finiti, rendendoli potenziali contaminanti e alterativi di tutti i prodotti dell'industria delle bevande. Presentano tuttavia caratteri positivi come la produzione di polisaccaridi e di bassi livelli di idrogeno solforato ed essendo fruttosofili potrebbero trovare applicazione nel riavvio di arresti di fermentazione (Cocolin & Ciani, 2018).
- ***Lachancea/Kluyveromyces***: questi due generi filogeneticamente affini appartengono alla famiglia delle *Saccharomycetaceae* e a ciascuno di essi appartengono sei specie. Nel genere *Kluyveromyces* si evidenziano *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, in grado di fermentare il lattosio, termotolleranti e con buona attività pectinolitica e perciò tecnologicamente interessanti (Cocolin & Ciani, 2018). *Lachancea thermotolerans* è invece la specie più diffusa ed enologicamente interessante del genere *Lachancea*, avendo dimostrato buone proprietà enologiche (Borren & Tian, 2021). Le cellule si presentano ovoidali e cilindriche-allungate, mentre le colonie su terreno WL appaiono bianche, convesse e cremose. La divisione avviene per gemmazione multipolare.
- ***Schizosaccharomyces***: questo genere è molto distante filogeneticamente agli altri generi fin'ora discussi ed appartiene al subphylum *Taphrinomycotina*, ordine delle *Schizosaccharomycetales*. A *Schizosaccharomyces* appartengono tre specie, tutte di interesse vinario: *Schizosaccharomyces japonicus*, *Schizosaccharomyces octosporus* ed in particolare *Schizosaccharomyces pombe*. Le cellule di questi lieviti possono essere da globose a cilindriche e la riproduzione vegetativa

avviene per scissione. Se coltivate su terreno WL, le colonie, si presentano convesse ed intensamente colorate di verde. Il carattere fisiologico più interessante è la possibilità di svolgere la fermentazione malo-alcolica, che li rende utili o alterativi nella vinificazione a seconda delle situazioni (Cocolin & Ciani, 2018).

- ***Dekkera/Brettanomyces***: i generi *Dekkera* e *Brettanomyces* fanno parte dell'ordine *Saccharomycetales*, famiglia delle *Pichiaceae* e rappresentano uno la fase telomorfica sessuale (*Dekkera*) ed uno la fase vegetativa anamorfica (*Brettanomyces*). La morfologia cellulare di questi lieviti è variabile da sferoidale a sub-globosa, a volte ogivale. Su terreno WL le colonie sono convesse, di colore bianco e consistenza cremosa. Le specie di interesse vinario sono principalmente due: *Dekkera anomala* (fase telomorfica di *Brettanomyces anomalus*) e *Dekkera bruxellensis* (fase telomorfica di *Brettanomyces bruxellensis*) (Serra Colomer, Funch, & Forster, 2019). Nonostante la loro diffusione in natura sia limitata ed il loro isolamento dalle uve sia difficoltoso, sono considerati tra i più temibili lieviti alterativi dei vini, per la loro capacità di svilupparsi in condizioni in cui altri microrganismi non sarebbero in grado di moltiplicarsi e perché, anche se presenti in basse concentrazioni determinano la produzione di elevate dosi di acido acetico, etil-fenoli e tetraidropiridine, composti estremamente sgradevoli ed alterativi dei vini. Altre caratteristiche peculiari sono la crescita lenta in piastra, la resistenza ad elevate dosi di actidione ed il fatto che in condizioni di anaerobiosi, questi lieviti evidenziano l'inibizione della fermentazione alcolica a favore del metabolismo respiro-fermentativo (effetto Custers) (Cocolin & Ciani, 2018).

1.3.2. Applicazioni biotecnologiche di lieviti non-*Saccharomyces*

I lieviti non-*Saccharomyces* sono oggetto, soprattutto negli ultimi anni, di approfonditi studi, finalizzati alla comprensione del loro ruolo nella vinificazione e alla scoperta di possibili applicazioni tecnologiche che questi lieviti potrebbero trovare nella moderna enologia. La ricerca si pone come obiettivo lo sfruttamento di alcune caratteristiche fisiologiche spesso assenti in *S. cerevisiae*, al fine di:

1. Migliorare l'aspetto sensoriale dei vini, attraverso la produzione di composti secondari che aumentano la complessità aromatica e la diminuzione di acidità volatile grazie al controllo della sintesi di acido acetico;

2. Ridurre l'uso di antisettici chimici sfruttando la capacità di alcuni ceppi di lieviti non-*Saccharomyces* di produrre sostanze antimicrobiche nei confronti di specie alteranti o indesiderate (Cocolin & Ciani, 2018).

Analizzando il primo punto nel dettaglio è necessario spiegare che le principali differenze tra i modi in cui i lieviti producono composti aromatici durante la fermentazione sono dovute al loro diverso corredo enzimatico. I lieviti contengono geni che codificano enzimi che svolgono ruoli importanti per la loro sopravvivenza e alcuni di questi enzimi sono secreti all'esterno della membrana cellulare con il compito di fornire energia e nutrienti al lievito, scomponendo composti complessi e polimeri nell'ambiente circostante. Alcuni di questi enzimi catalizzano la formazione di composti aromatici primari e secondari dei vini ed inoltre lieviti diversi producono abbondanze e tipologie differenti di enzimi. Quindi, a causa della diversità dei lieviti indigeni non-*Saccharomyces*, c'è una più ampia gamma di enzimi extracellulari prodotti durante una fermentazione spontanea, rispetto a quando si inocula una monocultura di *S. cerevisiae* e di conseguenza ci si può aspettare che si formi anche una più ampia gamma di composti volatili. Inoltre va evidenziato che mediante le moderne tecniche di sequenziamento genico è emerso che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* codificano per una maggiore quantità di enzimi extracellulari rispetto a *S. cerevisiae* (Borren & Tian, 2021). La maggiore attività enzimatica, oltre a contribuire al miglioramento sensoriale, possono avere anche importanti effetti sulla fermentazione alcolica: enzimi come proteasi, β -glucosidasi, esterasi e pectinasi, frequenti in lieviti dei generi *Candida*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Metschnikowia* e *Lachancea*, portano ad un miglioramento della disponibilità di sostanze azotate assimilabili, una maggiore resa di estrazione, chiarifica e filtrazione più semplici (Cocolin & Ciani, 2018). L'altra importante proprietà tecnologica che si potrebbe sfruttare dei lieviti non-*Saccharomyces* deriva dal fatto che ceppi di alcune specie hanno dimostrato di possedere i cosiddetti "caratteri killer", ovvero geni che codificano per proteine o glicoproteine che disattivano altri lieviti, per questo definiti sensibili (Cocolin & Ciani, 2018). Questa proprietà è studiata da molto su ceppi di *S. cerevisiae*, il cui spettro d'azione resta tuttavia limitato alle colture della stessa specie, al contrario è dimostrato che diverse specie di non-*Saccharomyces* sono in grado di produrre tossine attive nei confronti di altri lieviti apiculati come *Hanseniaspora/Kloeckera*, che come già detto sono molto presenti sulle uve e nei mosti e nei confronti dei lieviti alterativi *Dekkera/Brettanomyces*. Considerando che attualmente il controllo del microbiota spontaneo è condotto principalmente mediante l'uso dell'anidride solforosa e nota la sua tossicità, l'uso in questo contesto di antimicrobici naturali come i lieviti in grado di produrre tossine killer o l'uso

delle tossine stesse potrebbe essere una valida alternativa biologica. Alla luce di ciò, scientificamente rilevanti sono *W. Anomalus*, *K. wickerhamii* e *P. membranifaciens*, che producono rispettivamente Pikt, Kwkt e PMKT2 (Cocolin & Ciani, 2018), tre micocine che sono state caratterizzate e sono risultate tutte attive in mosto e vino e quindi potenzialmente utilizzabili nel controllo dei lieviti *Dekkera/Brettanomyces* e a tal riguardo si ricorda anche la già citata *M. pulcherrima*. Sono perciò numerosi i vantaggi che possono apportare i lieviti non-*Saccharomyces* nel corso della fermentazione alcolica, ma è chiaro che sono anche molte le difficoltà legate alla conduzione a livello commerciale di fermentazioni spontanee. Per ovviare a ciò, già dagli anni 60' vengono sperimentate ed utilizzate le cosiddette "fermentazioni miste", con l'obiettivo di ricreare una situazione simile alla fermentazione selvaggia, ma in condizioni controllate e definendo rigorosamente sia i ceppi di lievito da inoculare che la loro carica iniziale. A livello pratico le fermentazioni miste possono essere condotte in due differenti modi:

- come coinoculo, in cui il ceppo di lievito non-*Saccharomyces* viene inoculato contemporaneamente a *S. cerevisiae*,
- come inoculo sequenziale, in cui *S. cerevisiae* viene aggiunto al mosto dopo un tempo prestabilito dall'inoculo del non-*Saccharomyces* (Cocolin & Ciani, 2018).

La prima procedura si presta ai casi in cui il lievito scelto per il coinoculo è competitivo nei confronti di *S. cerevisiae* e quindi riesce a svilupparsi insieme ad esso, mentre la seconda è applicata nel caso si utilizzino non-*Saccharomyces* non-competitivi nei confronti di *S. cerevisiae* e si rende necessario un loro inoculo in precedenza di quest'ultimo, per consentirne la crescita.

1.4. Metodi di identificazione e conta microbica

In passato l'ecologia microbica delle uve, del vino e più in generale dei prodotti alimentari era studiata mediante analisi microbiologiche basate sull'utilizzo di terreni di coltura sintetici per la conta vitale, l'isolamento e l'ottenimento di colture pure delle specie presenti, seguiti da saggi morfologici, fisiologici e biochimici, per consentirne l'identificazione. Negli ultimi vent'anni queste tecniche sono state ampiamente superate dalle determinazioni basate sullo studio del DNA, in quanto consentono di ovviare a diversi inconvenienti delle tecniche classiche, quali i tempi necessari all'ottenimento dei risultati e l'affidabilità degli stessi, che prendendo in considerazione solamente il fenotipo sono

influenzate dallo stato fisiologico delle cellule sia per quanto riguarda la morfologia, sia per gli aspetti biochimici (Vaudano, Pulcini, Costantini, & Garcia-Moruno, 2018). Tuttavia alcune metodologie restano molto utili per la determinazione della carica totale dei lieviti e il rapido riconoscimento e conteggio di alcuni di essi: è il caso ad esempio dei metodi basati sull'osservazione microscopica, che coadiuvata dall'uso di camere di conta (Camera di Thoma) e colorazione con blu di metilene, consente di effettuare rapidamente e senza particolari attrezzature di laboratorio, conte sul numero di cellule totali e di rilevare informazioni sulla loro vitalità e in casi particolari sul genere o ancor più raramente la specie in questione (Vaudano, Costantini, Pulcini, & Garcia-Moruno, 2018). Oggi esistono tecniche, che in associazione con la microscopia, possono migliorarne l'efficienza e l'attendibilità dei risultati, quali il metodo FISH (Flourescence In Sito Hybridization) o DEFT (Direct Epiflourescence Filter Technique), che consentono di effettuare la conta microbica al microscopio a fluorescenza distinguendo anche le cellule vive da quelle morte, dopo diverse tipologie di trattamenti per metterle in evidenza (Tofalo & Rantsiou, 2018). Anche la conta in piastra su terreno agarizzato, le cui principali tipologie sono riportate in *Tabella 1-1*, può dare informazioni sulla carica di cellule vive nel mosto e con alcuni terreni anche riguardo la morfologia delle colonie cresciute. Inoltre è da ricordare che la crescita su piastra rappresenta il primo necessario passaggio per l'applicazione di tutte le metodologie di identificazione molecolare coltura-dipendenti, di seguito descritte.

Tabella 1-1- Substrati maggiormente impiegati per la conta e l'isolamento dei lieviti da vino

Substrato	Applicazione
YM (Yeasts and Molds)	Lieviti totali in uve, mosti e vini
YEPG (Yeast Extract Peptone Glucose)	
PDA (Potato Dextrose Agar)	
WL Nutrient Agar (Wallerstein Laboratories)	Differenziazione delle specie di lievito in base al colore, alla forma della colonia e al tempo di sviluppo
DBDM (Dekkera Brettanomyces Differential Medium)	Determinazione di <i>Brettanomyces spp.</i> Nel campione di vino
Lysine medium	Determinazione dei lieviti non- <i>Saccharomyces</i>

I recenti progressi nella biologia molecolare hanno portato allo sviluppo di tecniche veloci e affidabili per l'identificazione di lieviti e microrganismi in generale. Queste tecniche, che sono in continua evoluzione, sono generalmente distinte in:

1. **Metodi coltura-dipendenti (o indiretti):** in questo caso risulta necessario coltivare preventivamente i microrganismi in piastra e procedere successivamente all'analisi molecolare su DNA estratto dalle colonie eventualmente cresciute. Questo approccio da un lato consente una accurata determinazione a livello di specie, o di ceppo in alcuni casi, ma richiede il tempo necessario alla crescita e non permette di rilevare le specie in stato VBNC (Viable But Not Culturable). Tra le più comuni di queste metodologie si mettono in evidenza: PCR-*Specie specifica* (Josepa, Guillamon, & Cano, 2000), ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Esteve-Zarzoso, Manzanares, Ramon, & Querol, 1998), sequenziamento dei domini D1/D2 del 26S (Tofalo & Rantsiou, 2018) e PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Tofalo & Rantsiou, 2018).
2. **Metodi coltura-indipendenti (o diretti):** nei metodi diretti l'analisi molecolare è effettuata direttamente sulla matrice, con notevole risparmio in termini di tempo e consentendo di rilevare anche specie in stato VBNC. Il principale svantaggio di queste tecniche è rappresentato dall'impossibilità di distinguere microrganismi vivi o morti, in quanto il DNA può conservarsi integro per molto tempo dopo la morte cellulare (Vaudano, Costantini, Pulcini, & Garcia-Moruno, 2018). Si mettono in evidenza la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Cocolin, Heisey, & Mills, 2001) e la PCR quantitativa (Tofalo & Rantsiou, 2018). Notevoli aspettative derivano invece da tecniche meta genomiche come la NGS (Next Generation Sequencing), che permette di identificare e quantificare l'intero microbioma presente in diversi campioni simultaneamente grazie al sequenziamento di corte sequenze di DNA ribosomiale (Tofalo & Rantsiou, 2018).

2. SCOPO DELLA TESI

La presente Tesi di Laurea è stata svolta nell'ambito del progetto “*Impact of non-Saccharomyces wine yeasts on wine aromas-WINE AROMAS*” (IP-2020-02-1872), finanziato da “*Croatian Science Foundation* (<https://hrzz.hr/en/>)”. Il lavoro di Tesi svolto si inserisce nella prima fase del progetto, volta ad individuare i lieviti non-*Saccharomyces* con potenziali caratteristiche enologiche tali da migliorare la qualità organolettica del vino prodotto dalle uve “Maraština”. Questo vitigno a bacca bianca, riconducibile ai più noti vitigni “Malvasia bianca lunga” e “Malvasia del Chianti” (Budic-Leto, Humar, Gajdos Kljusuric, Zdunic, & Zlatic, 2020), è il più coltivato nella regione croata della Dalmazia, dove occupa una superficie totale di circa 303 ha (Maletic, et al., 2015), dislocati in particolare lungo la costa e sulle isole. Grazie all'elevato tenore zuccherino e allo spessore della buccia, si presta ad essere appassito al sole per essere impiegato nella produzione del tradizionale vino da dessert “Prošek”. In particolare l'obiettivo della presente Tesi di Laurea è stato quello di isolare ed identificare a livello molecolare le specie di lieviti non-*Saccharomyces* presenti sulla superficie delle uve, a partire da campioni prelevati da undici vigneti dislocati in differenti località del territorio dalmata, rappresentanti le diverse condizioni di coltivazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1.Campionamento

I campioni di uva, tutti appartenenti al vitigno Maraština, sono stati prelevati da undici diversi vigneti situati nella regione geografica dalmata (Croazia) (*Figura 3-1*), che si differenziano tra loro per giacitura, altitudine, distanza dalla costa, regime termico ed idrico.



Figura 3-1: Localizzazione dei vigneti elaborata con il software QGIS3

Da ciascun vigneto, identificato con una lettera dell'alfabeto, sono stati prelevati 3 campioni di grappoli maturi non danneggiati, per un totale di 33 campioni (*Tabella 3-1*). I campioni sono stati spediti in condizioni di refrigerazione presso i laboratori dell'Università Politecnica delle Marche dove sono stati processati immediatamente dopo l'arrivo.

Tabella 3-1: Elenco campioni suddivisi per località

Numero campione	Località	Identificativo	Descrizione
1	IJK (Institute for Adriatic Crops and Karst Reclamation, Spalato)	A	Località costiera a pochi Km dal centro della città di Spalato (Dalmazia centrale)
2			
3			
4	Prapatna 1 (Isola di Korčula)	B	Isola (Dalmazia sud)
5			
6			
7	Dračevica (Isola di Korčula)	C	Isola (Dalmazia sud)
8			
9			
10	Prapatna 2 (Isola di Korčula)	D	Isola (Dalmazia sud)
11			
12			
13	Kruševo (Isola di Korčula)	E	Isola (Dalmazia sud)
14			
15			
16	Kaštela (Kaštel Kambelovac)	F	Località costiera (Dalmazia centrale)
17			
18			
19	Smilčić	G	Località collinare distante circa 17 Km dalla costa e a circa 200 m.s.l. (Dalmazia nord)
20			
21			
22	Nadin (Polača)	H	Località collinare distante circa 13 Km dalla costa e a circa 200 m.s.l. (Dalmazia nord)
23			
24			
25	Stankovci	I	Località collinare distante circa 10 Km dalla costa e a circa 200 m.s.l. (Dalmazia nord)
26			
27			
28	Okalj	L	Località situata su di un altopiano a 300 m.s.l. e a circa 30 Km dalla costa (Dalmazia nord)
29			
30			
31	Vukšić	M	Località collinare distante circa 15 Km dalla costa e a circa 200 m.s.l. (Dalmazia nord)
32			
33			

3.2. Conta vitale

Le conte vitali su piastra sono state allestite a partire da 200 g di uva, provenienti da ciascun campione, omogenati separatamente utilizzando un omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 Circulator (PBI International, Milano, Italia) per 5 min a 260 rpm. Gli omogenati così ottenuti sono stati poi utilizzati per allestire le diluizioni seriali decimali con acqua peptonata sterile (peptone 2 g/L).

Da ciascuna diluizione sono state prelevate aliquote di 100 μ L e seminate per spandimento su piastre contenenti terreno di coltura WL Nutrient Agar Medium (VWR International PBI S.r.l.), la cui composizione è riportata in *Tabella 3-2*, addizionato con antibiotico cloramfenicolo (100 mg/mL), per ridurre al minimo il rischio di insorgenza di contaminazioni batteriche.

Tabella 3-2: Composizione del terreno di coltura WL

Ingredienti	Concentrazione (g/L)
Estratto di lievito	4,00
Triptone	5,00
Glucosio	50,00
Agar	20,00
Diidrogeno fosfato di potassio	0,55
Cloruro di potassio	0,425
Cloruro di calcio	0,125
Solfato di magnesio	0,125
Cloruro ferrico	0,0025
Solfato di manganese	0,0025
Verde di bromocresolo	0,022
pH finale	5.5 \pm 0.1 a 25°C

Le piastre sono poi state incubate a 25°C per 48/72 ore e si è poi proceduto ad effettuare la conta vitale sulle piastre che presentavano 30-300 Unità Formanti Colonia (UFC). I risultati sono stati espressi come media di 3 repliche \pm la deviazione standard. Per ciascun vigneto i valori medi delle conte vitali sono stati confrontati sulla base del Tukey test ($\alpha = 0,05$), utilizzando il software Statistica 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.3. Isolamento e purificazione

Per l'isolamento e la purificazione, da ogni piastra contabile sono state scelte 5-10 colonie/piastra in base alla loro morfologia e si è poi proceduto all'isolamento e

purificazione delle colonie stesse, mediante la tecnica di isolamento per strisci successivi su terreno WL addizionato con antibiotico cloramfenicolo (100 mg/mL), per un totale di due purificazioni.

3.4.Crioconservazione

Per la crioconservazione dei lieviti non-*Saccharomyces* isolati è stato utilizzato il terreno YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose Broth), la cui composizione è riportata in *Tabella 3-3*.

Tabella 3-3: Composizione del terreno di coltura YPD utilizzato per la crioconservazione

Ingredienti	Concentrazione
Estratto di lievito	10 g/L
Peptone	20 g/L
D-Glucosio	20 g/L

Il terreno, disciolto in acqua deionizzata, è stato sottoposto a sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15 minuti ad 1 atm. I ceppi sono stati poi crio-conservati a -80°C in una miscela sterile composta da YPD e glicerolo (crio-protettore), in rapporto 3:2.

3.5.Estrazione del DNA dalle colture pure

L'estrazione del DNA dalle colture pure di lieviti è stata effettuata utilizzando il metodo "al calore". Si è proceduto come di seguito descritto:

1. Prelievo biomassa (un'ansata) da piastre al secondo striscio di purificazione;
2. Stemperamento della biomassa in 300 µL di tampone TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) in Eppendorf da 1,5 mL;
3. Trattamento al calore a 100°C per 10 min in termoblocco (Thermoblock FALC INSTRUMENTS, Bergamo, Italia) ;
4. Centrifugazione per 5 min a 14000 rpm.

Il DNA così estratto viene conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

3.6.Amplificazione via PCR delle regioni ITS1 e ITS2 incluso il gene 5.8S rRNA

L'amplificazione del DNA estratto in precedenza è stata effettuata mediante PCR, utilizzando i primers ITS1 e ITS4 (Vilgalys, Hopple Jr., & Hibbett, 1994) (*Tabella 3-4*), che

amplificano le regioni ITS1 e ITS2 dello spaziatore trascritto interno (ITS), situate rispettivamente fra il gene 18S ed il gene 5,8S e fra il gene 5,8S e l'estremità 3' del gene 26S (Kumar & Shukla, 2005). La miscela di reazione di 48 μ L dalla composizione riportata in (Tabella 3-5) , alla quale sono stati addizionati 2 μ L di ciascun estratto di DNA.

Tabella 3-4: Sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione del DNA

Primers	Sequenze (5'→3')
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Tabella 3-5: Composizione della miscela di reazione usata per la PCR

Componenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume iniziale (μ L per ogni campione)
Buffer	10 X	1 X	5 μ L
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 μ L
ITS1	10 μ M	0,2 μ M	1 μ L
ITS4	10 μ M	0,2 μ M	1 μ L
Taq polimerasi*	5 U/ μ L	1 U/ μ L	0,2 μ L
H ₂ O**			39,8 μ L

* Taq DNA polimerasi (Sibenzyme, Novosibirsk, Russia); ** Acqua deionizzata sterile per biologia molecolare (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Le amplificazioni sono state condotte utilizzando il termociclatore “My Cycler thermal cycler” (Bio-Rad Laboratories), seguendo il ciclo termico riportato in *Figura 3-2*.

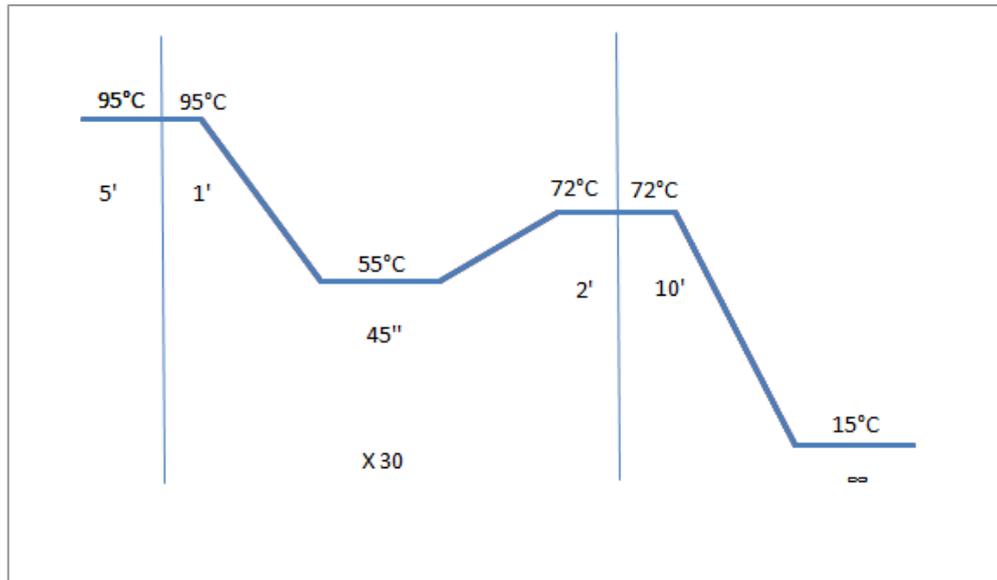


Figura 3-2: Ciclo termico seguito per la PCR

3.7. Elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti della PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio concentrato all'1.5% (p/v), utilizzando il tampone Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X (Sambrook et al., 1989) e GelRed (10000X) (Biotium, Fremont, CA, USA) come intercalante, in sostituzione del bromuro di etidio (presumibilmente mutageno). La migrazione elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 100 V utilizzando il marcatore molecolare "HyperLadder™ 100bp" (Bioline, BiolineReagents Ltd, United Kingdom) Dopo l'elettroforesi le bande di prodotti della PCR su gel sono state visualizzate tramite luce UV ($\lambda = 260 \text{ nm}$) ed il gel è stato quindi fotografato (*Figura 3-3*) impiegando il sistema COMPLETE PHOTO XT101 (Explera, Jesi, Ancona).

3.8. Identificazione dei lieviti

La purificazione e il sequenziamento degli ampliconi di DNA sono stati condotti dalla ditta GENEWIZ Germany GmbH (Leipzig, Germania), che ci ha fornito le sequenze in formato FASTA. Queste poi sono state allineate alle sequenze depositate nella banca dati di GenBank, utilizzando il software BLASTN disponibile liberamente in rete al sito:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Risultati delle conte vitali

Dalle conte vitali in piastra sono emersi i seguenti risultati (*Tabella 4-1*), espressi come media di 3 repliche \pm la deviazione standard.

Tabella 4-1: Risultati delle conte vitali di lieviti in piastra contenente terreno di crescita WL

Log UFC/mL	
Vigneto	Media \pm D.s*
A	3,24 \pm 0,08 ^g
B	5,04 \pm 0,07 ^b
C	5,50 \pm 0,06 ^a
D	4,14 \pm 0,01 ^e
E	4,74 \pm 0,05 ^c
F	3,83 \pm 0,27 ^f
G	4,50 \pm 0,03 ^d
H	3,58 \pm 0,08 ^f
I	4,35 \pm 0,21 ^e
L	3,79 \pm 0,10 ^f
M	3,74 \pm 0,15 ^f

D.s. Deviazione standard: *Le diverse lettere indicano differenze statisticamente significative tra i diversi vigneti secondo il test di Tukey ($\alpha = 0,005$)

I dati ottenuti mostrano che la carica di lieviti presenti negli omogenati d'uva varia da 3,24 \pm 0,08 (vigneto A, IJK, Spalato) a 5,50 \pm 0,06 Log UFC/mL (vigneto C, Dračevica, isola di Korčula), che corrispondono ai valori generalmente riportati da altre ricerche per le uve mature (Milanovic, Comitini, & Ciani, 2013). Non avendo informazioni sulle metodologie di

gestione e sull'esposizione dei vigneti da cui i campioni sono stati prelevati, risulta difficoltoso mettere in relazione i dati con i diversi fattori che possono aver determinato cariche microbiche differenti. Tuttavia si rileva un incremento statisticamente significativo nei valori dei risultati delle conte relative a campioni prelevati dai quattro vigneti situati sull'isola di Korčula rispetto agli altri, con valori rispettivamente per B di $5,04 \pm 0,07$, per C di $5,50 \pm 0,06$, per D di $4,14 \pm 0,01$ e per E di $4,74 \pm 0,05$ Log UFC/mL. Si ha quindi una media di 4,85 Log UFC/mL. mentre calcolando la media tra i risultati degli altri sette vigneti dislocati lungo la costa si ottiene un valore inferiore di circa il 20%, pari a 3,86 Log UFC/mL. In particolare, i vigneti F, H, L ed M non presentano differenze statisticamente significative tra loro, con valori piuttosto bassi se confrontati con le conte relative ai vigneti situati sull'isola di Korčula. Posto che non vi siano state differenze o errori nel campionamento, soprattutto per quanto riguarda la sanità degli acini prelevati, questi risultati possono essere interpretati in diversi modi: trovandosi su di un'isola di dimensioni relativamente piccole, conte vitali più elevate possono essere dovute ad una maggiore irradiazione solare, che come abbiamo detto in precedenza influisce positivamente sull'ecologia microbica delle uve (Romano & Capece, 2018); per le stesse ragioni i vigneti potrebbero essere maggiormente esposti ai venti, tra i principali vettori di microrganismi (Barata, Mafeito-Ferreira, & Loureiro, 2012) o caratterizzati da una maggior presenza di uccelli migratori (Francesca, Canale, Settanini, & Moschetti, 2012). Analizzando i dati climatici emerge inoltre che sull'isola di Korčula si ha una temperatura media annuale maggiore rispetto alla costa, con valori rispettivamente di circa 16°C sull'isola e di 14°C sulla costa (CLIMATE-DATA.ORG), altro fattore che potrebbe influire positivamente sulla carica microbica e sulla biodiversità.

4.2. Risultati dell'identificazione molecolare dei lieviti non-*Saccharomyces*

Nello svolgimento di questo lavoro di Tesi sperimentale sono stati analizzati un totale di 276 colture di lievito, ottenute dall'isolamento e purificazione effettuati in seguito alle conte vitali. Il DNA estratto da questi campioni è stato sottoposto a PCR con l'obiettivo di amplificare le regioni ITS1 e ITS2 dello spaziatore trascritto interno (ITS), comprese tra i geni 18S, 5.8S e 26S del DNA ribosomiale (Kumar & Shukla, 2005), con l'utilizzo dei primers ITS1 e ITS4. Il vantaggio dell'uso di primers ITS è che questi amplificano un'ampia gamma di bersagli fungini ed in particolare ITS1-ITS4 sono specifici per funghi e basidiomiceti (Martin & Rygiewicz, 2005).

Gli ampliconi ottenuti sono poi stati sottoposti a migrazione elettroforetica su gel di agarosio, per verificarne l'avvenuta amplificazione. Osservando ai raggi UV i profili elettroforetici ottenuti (*Figura4-1*) si rileva una certa variabilità interspecifica.

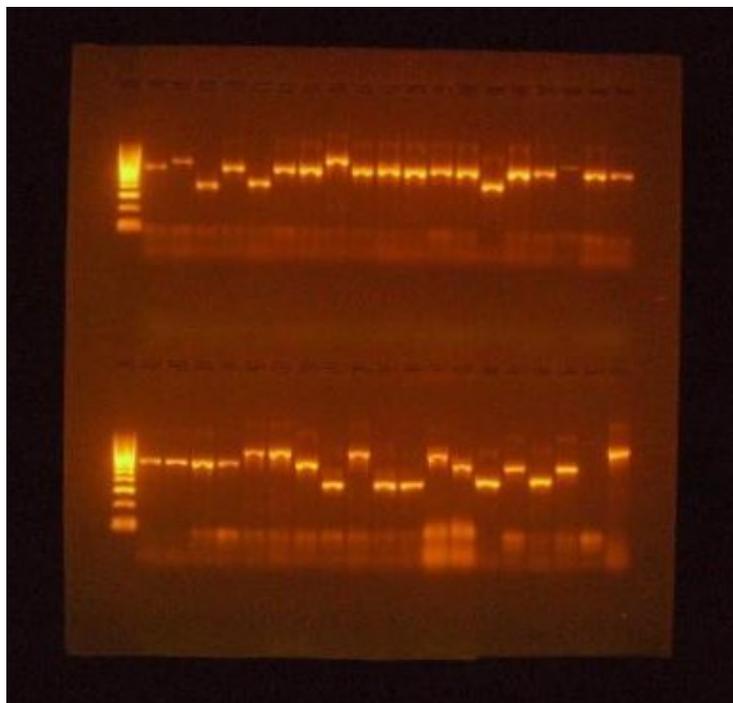


Figura 4-1: Esempio di profilo elettroforetico

In seguito alla purificazione e al sequenziamento, eseguiti dalla ditta GENEWIZ Germany GmbH, è stato possibile confrontare le sequenze nucleotidiche fornite in formato FASTA con quelle depositate nella banca dati GenBank mediante il software BLASTN. I risultati sono riportati di seguito in *Tabella 4-2*.

Tabella 4-2: Risultati identificazione molecolare degli isolati

Vigneto	Codice isolato	Specie	Identità (%)	Numero di accesso della sequenza Genbank*	
A (IJK)	A-1	<i>Aureobasidium namibiae</i>	99.01	NR 147362	
	A-2	<i>Aureobasidium namibiae</i>	99.00	NR 144909	
	A-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.36	NR 144909	
	A-6	<i>Aureobasidium lini</i>	98.92	NR 147320	
	A-7	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR 144909	
	A-9	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.83	NR 147362	
	A-10	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.30	NR 159598	
	A-11	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.31	NR 159598	
	A-12	<i>Filobasidium magnum</i>	99.66	NR 130655	
	A-14	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.12	NR 159598	
	A-15	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.50	NR 159598	
	A-16	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.14	NR 159598	
	A-17	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.57	NR 144909	
	A-18	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.58	NR 144909	
	A-19	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR 144909	
	A-20	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR 144909	
	A-21	<i>Naganishia adeliensis</i>	99.03	NR 111050	
	A-22	<i>Naganishia adeliensis</i>	100	NR 111050	
	A-24	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.78	NR 159598	
	A-25	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.13	NR 159598	
	A-26	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.43	NR 144909	
	A-27	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.15	NR 159598	
	B (Korčula)	B-1	<i>Metschnikowia chrysoerlae</i>	99.30	NR 111376
		B-2	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.10	NR 147362
		B-6	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.96	NR 159598
		B-7	<i>Metschnikowia sinensis/ Metschnikowia shanxiensis</i>	100/ 100	NR_155404/ NR 155403
		B-8	<i>Wickerhamiella fructicola</i>	99.15	NR 158998
B-9		<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR 144909	
B-10		<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.89	NR 144909	
B-11		<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.46	NR 159598	
B-12		<i>Aureobasidium melanogenum</i>	99.28	NR 159598	
B-13		<i>Metschnikowia sinensis Metschnikowia shanxiensis</i>	100 100	NR_155404 NR 155403	
B-14		<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR 159598	
B-15		<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99.76	NR 164379	
B-16		<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99.76	NR 164379	
B-17		<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.76	NR 159598	

	B-18	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.33	NR_159598
	B-19	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR_159598
	B-20	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.49	NR_159598
	B-22	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	98.23	NR_111376
	B-24	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.13	NR_159598
	B-25	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.10	NR_111334
	B-26	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.02	NR_111334
	B-27	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.51	NR_130660
	B-28	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.29	NR_159598
	B-30	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99.01	NR_164379
	B-32	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR_159598
	B-33	<i>Metschnikowia sinensis</i>	100	NR_155404
		<i>Metschnikowia shanxiensis</i>	100	NR_155403
C (Korčula)	C-1	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	100	NR_111376
	C-2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.27	NR_130660
	C-3	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.27	NR_130660
	C-4	<i>Papiliotrema terrestris</i>	98.92	NR_073350
	C-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.57	NR_144909
	C-6	<i>Papiliotrema terrestris</i>	98.95	NR_073350
	C-7	<i>Aureobasidium namibiae</i>	99.02	NR_147362
	C-8	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.40	NR_159598
	C-9	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
	C-10	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.14	NR_130660
	C-11	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.38	NR_130660
	C-12	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.66	NR_111376
	C-13	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.95	NR_159598
	C-14	<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	99.25	NR_166218
	C-15	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	98.96	NR_111376
	C-16	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.66	NR_147362
	C-17	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.31	NR_111376
	C-18	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.31	NR_111376
	C-19	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	98.83	NR_147362
	C-21	<i>Aureobasidium namibiae</i>	99.03	NR_144909
C-22	<i>Metschnikowia sinensis</i> / <i>Metschnikowia shanxiensis</i>	100/ 100	NR_155404/ NR_155403	
C-23	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.31	NR_111376	
C-26	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	100	NR_111376	
C-27	<i>Rhodotorula babjevae</i>	99.53	NR_077096	
C-28	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.31	NR_111376	
C-30	<i>Rhodotorula babjevae</i>	99.53	NR_077096	
	D-1	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR_159598
	D-2	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	99.32	NR_159598
	D-3	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	99.32	NR_159598
	D-5	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	98.60	NR_111376

D (Korčula)	D-7	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR_159598
	D-8	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR_159598
	D-10	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	99.03	NR_159598
	D-11	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR_159598
	D-12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR_144909
	D-13	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.66	NR_159598
	D-15	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
	D-16	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.15	NR_144909
	D-17	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
	D-18	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.23	NR_144909
	D-19	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	NR_159598
	D-20	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.84	NR_147362
	D-21	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
	D-22	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.51	NR_159598
	D-23	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.21	NR_144909
	D-24	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.20	NR_144909
	D-25	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.52	NR_144909
	D-26	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.74	NR_159598
	D-27	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.64	NR_147362
	D-28	<i>Rhodotorula babjevae</i>	99.46	NR_077096
D-29	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909	
D-30	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.74	NR_159598	
E (Korčula)	E-1	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.93	NR_159598
	E-2	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.14	NR_159598
	E-3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR_144909
	E-4	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	98.63	NR_111376
	E-5	<i>Kabatiella bupleuri</i>	99.39	NR_121524
	E-6	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	98.68	NR_164379
	E-7	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.94	NR_159598
	E-9	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.14	NR_159598
	E-10	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.12	NR_159598
	E-11	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.30	NR_111376
	E-12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.75	NR_144909
	E-13	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	99.57	NR_159598
	E-14	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.84	NR_147362
	E-16	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.19	NR_147362
	E-17	<i>Papiliotrema terrestris</i>	98.11	NR_073350
	E-18	<i>Papiliotrema terrestris</i>	98.94	NR_073350
	E-19	<i>Metschnikowia sinensis</i>	99.02	NR_155404
		<i>Metschnikowia shanxiensis</i>	99.02	NR_155403

	E-20	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.27	NR_111376
	E-21	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.27	NR_111376
	E-22	<i>Metschnikowia sinensis</i>	99.02	NR_155404
		<i>Metschnikowia shanxiensis</i>	99.02	NR_155403
	E-24	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.19	NR_147362
	E-25	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.23	NR_111334
	E-26	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.22	NR_130660
	E-27	<i>Lachancea quebecensis</i>	99.20	NR_138247
	E-28	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
	E-29	<i>Papiliotrema terrestris</i>	98.59	NR_073350
	E-30	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.97	NR_159598
	E-31	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99	NR_111376
	E-32	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR_144909
F (Kaštela)	F-1	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.96	NR_159598
	F-2	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.97	NR_159598
	F-3	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.15	NR_159598
	F-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR_144909
	F-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR_144909
	F-6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.57	NR_144909
	F-7	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.57	NR_144909
	F-8	<i>Starmerella apicola</i>	99.04	NR_130681
	F-9	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.57	NR_144909
	F-10	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.97	NR_159598
	F-11	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.51	NR_159598
	F-12	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.48	NR_159598
	F-14	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99	NR_164379
	F-15	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.76	NR_159598
	F-17	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.13	NR_159598
	F-18	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.51	NR_159598
	F-19	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99.76	NR_164379
	F-20	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.51	NR_159598
	F-21	<i>Kwoniella endophytica</i>	98.22	NR_170734
	F-22	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.49	NR_159598
	F-23	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.74	NR_159598
	F-24	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR_144909
	F-27	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
	F-28	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.32	NR_159598
	F-29	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.15	NR_159598
	F-30	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.12	NR_159598

G (Smilčić)	G-1	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.32	NR_159598	
	G-2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.57	NR_144909	
	G-3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	97.59	NR_144909	
	G-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909	
	G-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.35	NR_144909	
	G-6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR_144909	
	G-7	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR_144909	
	G-8	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.31	NR_159598	
	G-12	<i>Aureobasidium namibiae</i>	99.03	NR_147362	
	G-13	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.57	NR_144909	
	G-14	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.50	NR_159598	
	G-15	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.28	NR_144909	
	G-16	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.10	NR_159598	
	G-24	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.22	NR_130660	
	G-25	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99.75	NR_164379	
	G-26	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99.76	NR_164379	
	G-27	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909	
	G-28	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99.55	NR_138192	
	G-29	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.22	NR_130660	
	G-30	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909	
	H (Nadin)	H-1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
		H-2	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.49	NR_159598
		H-3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
		H-4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
		H-5	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.34	NR_159598
		H11	<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>	99.33	NR_138220
		H-12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
		H-13	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR_144909
		H-14	<i>Quambalaria cyanescens</i>	99.27	NR_111202
		H-15	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909
H-16		<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909	
H-17		<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.58	NR_144909	
H-18		<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.37	NR_144909	
H-21		<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909	
H-23		<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR_144909	
H-24		<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	98.89	NR_138192	
H-25		<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99.53	NR_138192	
H-26		<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR_144909	
H-27		<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99	NR_111376	
H-29		<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99.54	NR_138192	
H-31	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99.76	NR_164379		
H-32	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99	NR_111376		
I	I-1	<i>Pichia terricola</i>	98.92	NR_153294	
	I-2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR_144909	
	I-3	<i>Pichia kluyveri</i>	98.95	NR_138210	

I (Stankovci)	I-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR 144909
	I-6	<i>Pichia kluyveri</i>	99.21	NR 138210
	I-7	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.22	NR 130660
	I-8	<i>Pichia kluyveri</i>	98.45	NR 138210
	I-9	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR 144909
	I-10	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	100	NR 111376
	I-11	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.34	NR 159598
	I-12	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.80	NR 159598
	I-13	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR 144909
	I-14	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99	NR 111376
	I-15	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.27	NR 111376
	I-16	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.40	NR 159598
	I-17	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	100	NR 111376
	I-19	<i>Aureobasidium namibiae</i>	93.16	NR 147362
	I-20	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR 144909
	I-25	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	99.36	NR_155181
	I-26	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.97	NR 159598
	I-27	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	100	NR 111376
	I-28	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.22	NR 130660
	I-29	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.34	NR 159598
I-30	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	98.96	NR 111376	
L (Oklaž)	L-1	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.49	NR 159598
	L-2	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.30	NR 111376
	L-3	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	99.28	NR 111376
	L-4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.27	NR 130660
	L-5	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.26	NR 130660
	L-7	<i>Aureobasidium namibiae</i>	97.82	NR 147362
	L-8	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.50	NR 159598
	L-12	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.31	NR 159598
	L-14	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR 144909
	L-15	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.68	NR 144909
	L-17	<i>Filobasidium floriforme</i>	98.19	NR 119429
	L-18	<i>Pseudofusicoccum calophylli</i>	67.88	NR 163339
	L-21	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	97.09	NR 159598
	L-22	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR 144909
L-24	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.00	NR 147362	
L-26	<i>Filobasidium magnum</i>	99.39	NR 130655	
M (Vukšić)	M-1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR 144909
	M-2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.79	NR 144909
	M-3	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.74	NR 111334
	M-4	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	98.98	NR 111376
	M-5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.58	NR 144909
	M-6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR 144909
	M-7	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR 144909
	M-8	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR 144909

	M-11	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.73	NR 144909
	M-12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	NR 144909
	M-13	<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	99.15	NR_155181
	M-14	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.49	NR 111334
	M-15	<i>Rhodotorula babjevae</i>	98.54	NR 077096
	M-16	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.78	NR 144909
	M-21	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.74	NR 111334
	M-22	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.47	NR 111334
	M-23	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.74	NR 111334
	M-24	<i>Solicoccozyma aeria</i>	99.56	NR 155841
	M-25	<i>Lachancea thermotolerans</i>	100	NR 111334
	M-26	<i>Aureobasidium namibiae</i>	98.76	NR 147362
	M-27	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	98.58	NR 159598
	M-28	<i>Lachancea thermotolerans</i>	98.53	NR 111334
	M-29	<i>Lachancea thermotolerans</i>	99.75	NR 111334
	M-30	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.75	NR 144909

*Numero di accesso della sequenza Genbank con la maggiore % di identità rispetto alla sequenza analizzata

Osservando i risultati è evidente come, a livello generale, le specie individuate e la loro frequenza rispettino i risultati della maggioranza delle altre ricerche sull'ecologia microbica delle uve, infatti delle 28 differenti specie non-*Saccharomyces* identificate, l'84% appartengono ai generi *Aureobasidium*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* e *Lachancea*, confermandone la predominanza sui grappoli (Romano & Capece, 2018). Oltre a queste sono presenti specie appartenenti ai generi *Pichia*, *Rhodotorula* e *Filobasidium*, che anche se isolate con frequenze molto basse, sono interessanti per le possibili applicazioni in enologia. Di seguito sono riportati i grafici relativi alle specie maggiormente isolate in generale (Figura 4-2) e nello specifico in ciascun vigneto (Figura 4-3).

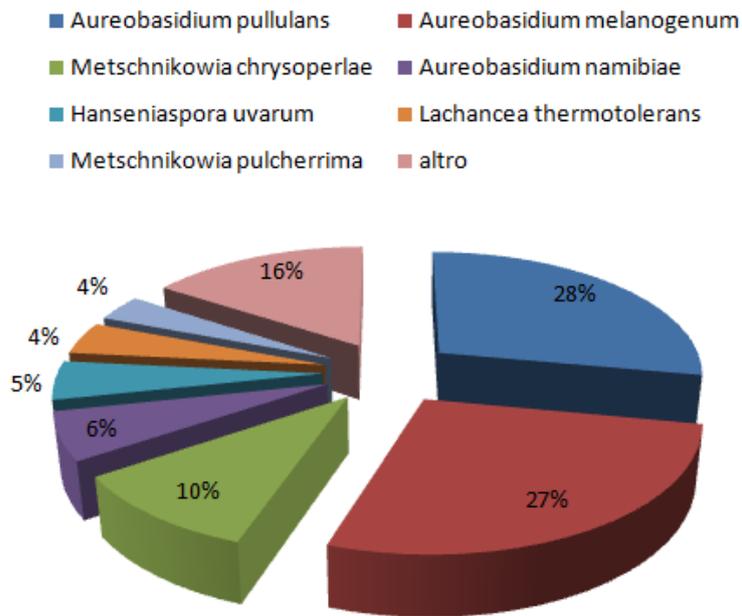
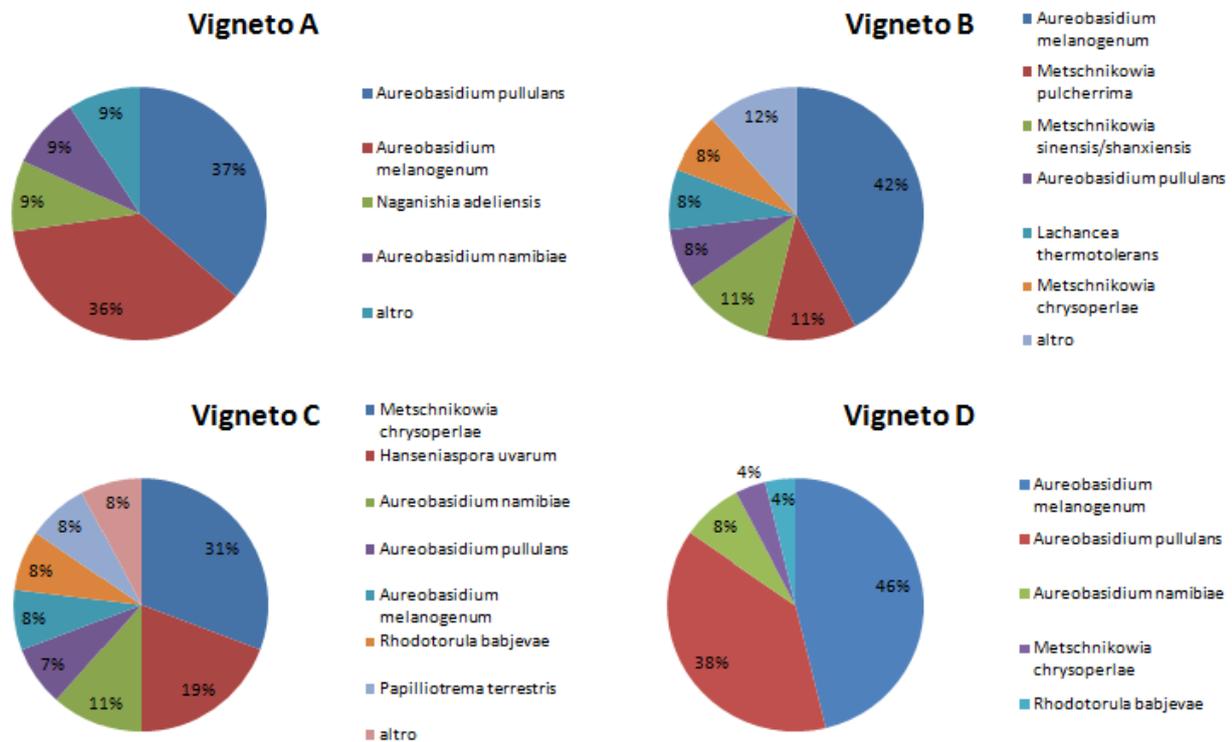


Figura 4-2: Distribuzione delle principali specie non-Saccharomyces rilevate negli undici vigneti



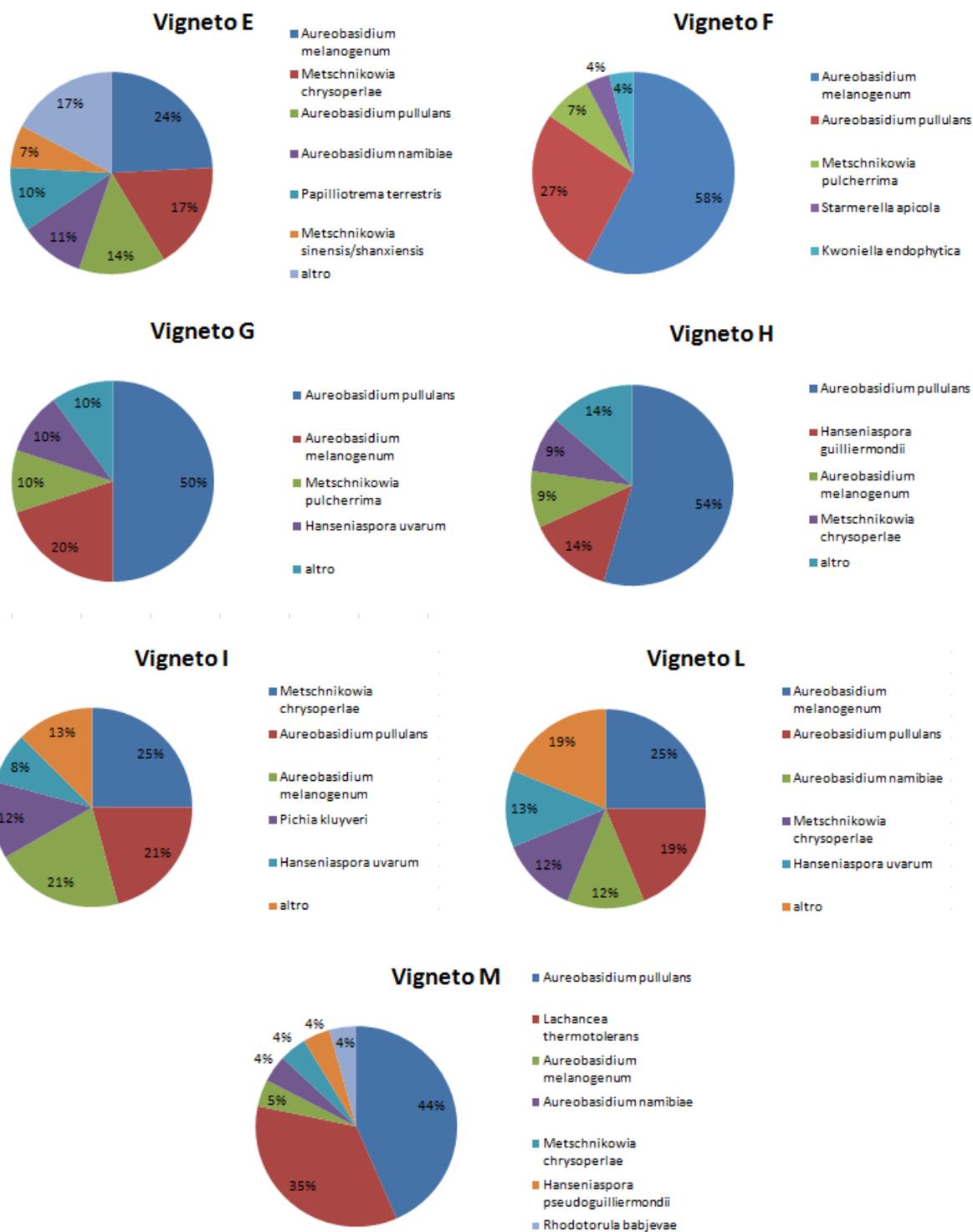


Figura 4-3: Distribuzione delle principali specie non-Saccharomyces rilevate nei singoli vigneti

Il fungo simil-lievito *Aureobasidium pullulans* (ordine *Dothideales*) è risultata la specie più presente, rappresentando il 28% degli isolati, subito seguita da un'altra specie dello stesso

genere: *Aureobasidium melanogenum*. Fino a pochi anni fa queste due specie, insieme ad *Aureobasidium namibiae* (6%), erano comprese in *Aureobasidium pullulans* e considerate “varietà”. Queste specie sono poi state elevate a livello di specie (Gostincar, et al., 2014) per differenze fenotipiche sostanziali nell’intervallo di temperature di crescita, metanizzazione e tolleranza a NaCl. Tutte tre le specie sono caratterizzate da un’eccezionale tolleranza per un’ampia gamma di condizioni ecologiche, tanto da poter essere considerati organismi poliestremotolleranti (Gostincar, Grube, & Gunde-Cimerman, 2011) ed anche per questo presentano un elevato polimorfismo intraspecifico, che ne rende difficoltosa la distinzione a livello morfologico. *A. pullulans* è solitamente associato alla vite e alle piante in generale, può tollerare elevatissime concentrazioni di NaCl (Zalar, Gostincar, de Hoog, Ursic, Sudhadham, & Gunde-Cimerman, 2008); *A. melanogenum* predilige ambienti acquosi e cresce a temperature maggiori degli altri (37°C), mentre su *A. namibiae* sono poche le informazioni reperibili, ma risulta essere stato isolato da rocce dolomitiche nel Deserto del Namib (Gostincar, et al., 2014). Inoltre, come rilevato dall’osservazione delle colture pure ottenute nello svolgimento del lavoro di tesi (Figura 4-4 a, b, c), *A. melanogenum* e *A. namibiae* appaiono notevolmente più pigmentati rispetto ad *A. pullulans*.

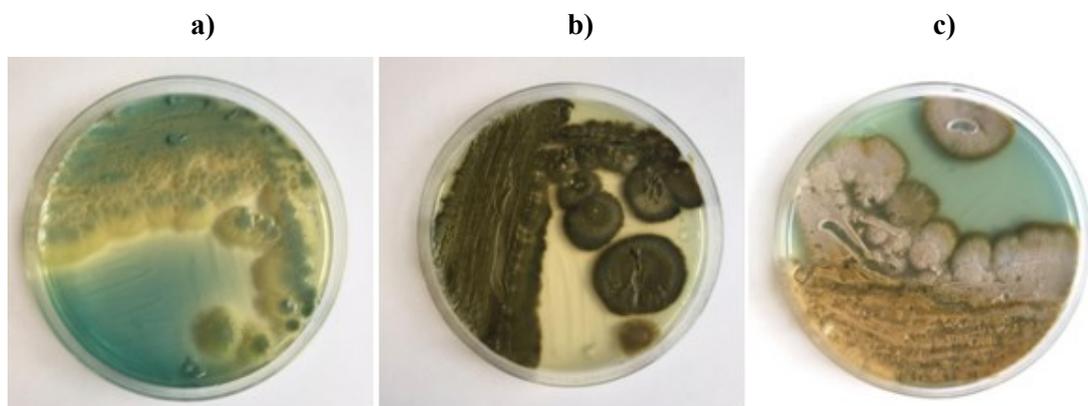


Figura 4-4: Colonie di specie appartenenti al genere *Aureobasidium*: a) *Aureobasidium pullulans*; b) *Aureobasidium melanogenum*; c) *Aureobasidium namibiae*; su terreno di coltura WL

Analizzando la distribuzione tra i diversi vigneti emerge che, rispetto ad *A. pullulans*, la specie *A. melanogenum*, sia maggiormente presente tra i vigneti situati sull’isola di Korčula (B, 42%; D, 46%; E, 24%) e tra i vigneti della costa meglio esposti al sole, poiché il livello

di irradiazione solare influisce sulla presenza e sulla prevalenza numerica dei lieviti a favore di quelli pigmentati (Romano & Capece, 2018). Fa eccezione il vigneto C, in cui però il secondo lievito per frequenza è *Rhodotorula babjevae*, un altro non-*Saccharomyces* pigmentato. Tutte e tre le specie di *Aureobasidium* presentano interessanti caratteristiche quali la produzione di un gran numero di enzimi extracellulari coinvolti nella degradazione del materiale vegetale, di inquinanti aromatici e della plastica (Isola, et al., 2013) e la secrezione di proteine e polisaccaridi con azioni antimicotiche (aureobasidina-A) e antibatteriche (esofilina-A) (Gostincar, et al., 2014). In particolare l'aureobasidina-A mostra forte attività fungicida, soprattutto nei confronti di *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* (Takesako, et al., 1993). Ciò è interessante se rapportato ai risultati, in quanto, nonostante specie appartenenti al genere *Candida* siano considerate predominanti sui grappoli d'uva, questo non è stato isolato da nessun vigneto, fatta eccezione per *Starmerella apicola* (sinonimo di *Candida apicola*) isolata esclusivamente dal vigneto F. Quindi questi funghi neri presentano molte importanti proprietà che possono trovare applicazione in campo industriale, medico ed in agricoltura come agente di biocontrollo in campo e in post-raccolta (Sharma, Singh, & Singh, 2009).

Il secondo genere non-*Saccharomyces* più presente si è dimostrato essere *Metschnikowia*, con la specie *Metschnikowia chrysoperlae* (10%), *Metschnikowia pulcherrima* (4%) e *Metschnikowia sinesis/shanxiensis* (2%). Tra di esse la più importante per le sue applicazioni in campo enologico precedentemente descritte (Cocolin & Ciani, 2018) è *M. pulcherrima* (Figura 4-5b), che è ritenuta tra le specie semifermentative più presenti sulle uve. Nel presente lavoro di Tesi, questa specie non è stata rilevata con la frequenza attesa, considerando che è comunemente ritrovata sulle uve mature con un'abbondanza del 5-20% e anche la sua distribuzione tra i vigneti non segue dinamiche particolari da evidenziare. Più interessante è l'elevata presenza di *M. chrysoperlae* (Figura 4-5a), strettamente correlato a *M. pulcherrima* da cui differisce a livello genomico per sole 6 bp nella regione D1/D2 e per differenze nell'assimilazione di alcune fonti di carbonio (Suh, Gibson, & Blackwell, 2004). Il lievito *M. chrysoperlae* è solitamente associato al tratto digestivo di insetti del genere *Chrysoperla* (*Neuroptera: Chrysopidae*), considerati insetti utili in campo agricolo perché predatori molto comuni di numerose specie di afidi (Suh, Gibson, & Blackwell, 2004). La sua distribuzione tra i diversi vigneti risulta essere poco uniforme, si passa da i vigneti A, F e G caratterizzati dalla sua assenza, ai vigneti C ed I in cui invece è predominante su tutte le

altre specie, con percentuali rispettivamente del 31% e del 25%, presumibilmente come conseguenza della distribuzione stessa del suo principale vettore sul territorio dalmata.

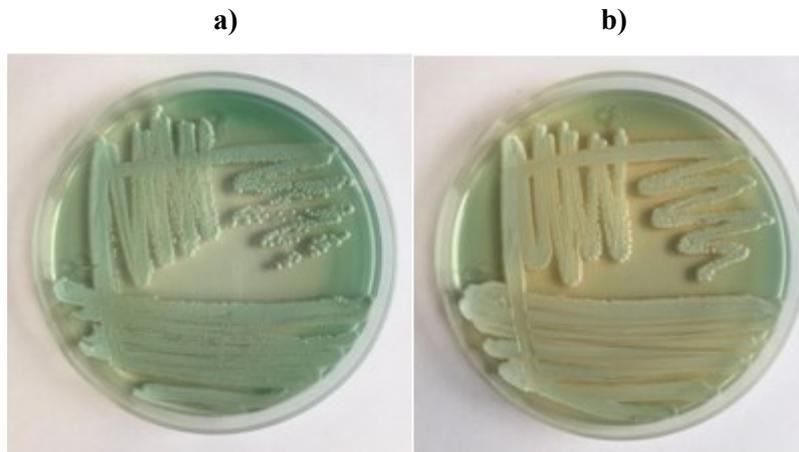


Figura 4-5: Colonie di specie appartenenti al genere *Metschnikowia*: a) *Metschnikowia chrysoperlae*; b) *Metschnikowia pulcherrima*; su terreno di coltura WL

Anche diverse specie appartenenti al genere *Hanseniaspora* sono state isolate con frequenze relativamente alte, in particolare *Hanseniaspora uvarum*, riscontrata in totale nel 5% degli isolati. *H. uvarum* è considerata in molti studi come la specie non-*Saccharomyces* più abbondante nei vigneti (Borren & Tian, 2021) e per il suo metabolismo semifermentativo anche nelle prime fasi della fermentazione, quindi come per *M. pulcherrima* si può affermare che sia stata isolata con una frequenza più bassa rispetto a quanto ci potesse aspettare, dato che comunemente si considera che queste due specie da sole rappresentino il 50-75% della popolazione di lieviti (Romano & Capece, 2018). In ogni caso si tratta di una specie molto studiata per le possibili applicazioni in ambito enologico, in quanto risulta che se coinoculata con *S. cerevisiae* aumenta la produzione di esteri acetati, che danno al vino un aroma fruttato positivo (Borren & Tian, 2021). Su terreno WL questo lievito forma colonie piatte ed intensamente colorate di verde (Figura 4-6), come anche *H. guilliermondii*, isolata con una frequenza significativa (14%) solo nel vigneto H, ed anch'essa di interesse enologico.

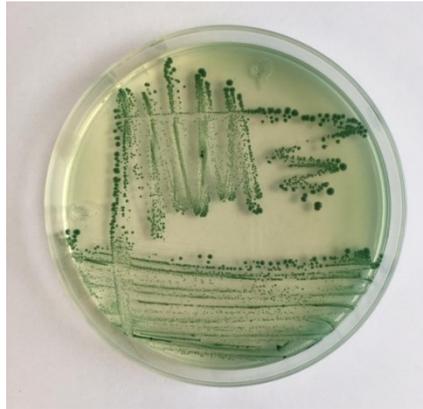


Figura 4-6: Colonie della specie *Hanseniaspora uvarum* su terreno di coltura WL

Importante in ambito vinario è anche *L. thermotolerans* (Figura 4-7), lievito ubiquitario che si trova naturalmente sull'uva, ma anche in altri habitat come suolo, insetti e altre piante, ampiamente distribuiti in tutto il mondo. È caratterizzato da una bassa produzione di acidità volatile, che aiuta a controllare i livelli globali di acido acetico in inoculazioni miste o sequenziali con *S. cerevisiae* o altre specie non-*Saccharomyces*. Mostra inoltre un'elevata produzione di acido lattico, tale da influenzare fortemente il pH del vino durante la fermentazione (Morata, Loira, Tesfaye, Banuelos, Gonzalez, & Suarez Lepe, 2018). *L. thermotolerans* è stato isolato dalle uve Maraština con una frequenza significativa, pari al 4% del totale degli isolati, ma osservando i grafici relativi ai singoli vigneti (Figura 4-3) risulta che la sua distribuzione è poco costante e concentrata soprattutto nel vigneto M (Vuksic) (35%), situato lungo la costa in una zona collinare.

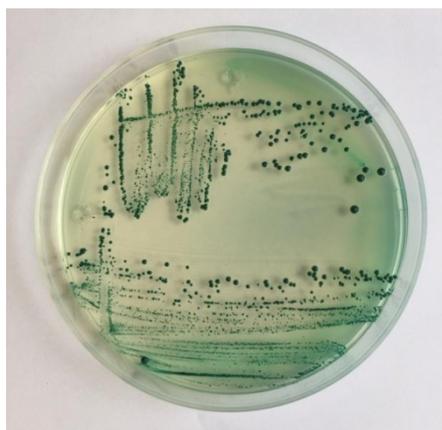


Figura 4-7: Colonie della specie *Lachancea thermotolerans* su terreno di coltura WL

Le rimanenti specie di lieviti non-*Saccharomyces* identificate, sono state isolate in maniera sporadica e con frequenze molto basse, ma tra di esse si segnalano alcune specie che potrebbero trovare applicazioni enologiche quali *Pichia kluyveri* (Figura 4-8), isolata in generale con una frequenza dell'1% e *Rhodotorula babjevae* (Figura 4-9), isolata con una frequenza del 2%.



Figura 4-8: Colonie della specie *Pichia kluyveri* su terreno di crescita WL



Figura 4-9: Colonie della specie *Rhodotorula babjevae* su terreno di crescita WL

5. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti nel presente lavoro di Tesi confermano quanto emerge dagli altri studi sull'ecologia microbica delle uve (Barata, Mafeito-Ferreira, & Loureiro, 2012; Vaudano, Costantini, Pulcini, & Garcia-Moruno, 2018; Tofalo & Rantsiou, 2018; Sabatel, Canol, Esteve-Zarzoso, & Guillaumòn, 2002), sia per quanto riguarda la biodiversità che per la distribuzione delle specie di lievito non-*Saccharomyces*. Inoltre, non essendo presenti precedenti studi sul microbioma del vitigno autoctono della Dalmazia Maraština, né sulla distribuzione dei lieviti non-*Saccharomyces* in questa regione della Croazia, il lavoro svolto fornisce nuove importanti informazioni al riguardo. Si conferma la presenza di specie di lievito non-*Saccharomyces* di interesse enologico su questo vitigno, quali *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans* e *P. kluyveri*, che verranno poi caratterizzate nella seconda fase del progetto “*Impact of non-Saccharomyces wine yeasts on wine aromas-WINE AROMAS*” in cui il presente lavoro di Tesi si inserisce, per valutarne l'impatto sul vino e le possibili applicazioni in campo enologico.

6. BIBLIOGRAFIA

(s.d.). Tratto il giorno dicembre 1, 2021 da CLIMATE-DATA.ORG: <https://it.climate-data.org/europa/croazia-82/>

Barata, A., Mafeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* , 153 (3), 243-259.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal Food Microbiology* , 122 (3), 312-320.

Borren, E., & Tian, B. (2021). L'importante contributo dei lieviti non-Saccharomyces all'aroma del vino: una revisione. *Alimenti* (10), 13.

Budic-Leto, I., Humar, I., Gajdos Kljusuric, J., Zdunic, G., & Zlatic, E. (2020). Free and Bound Volatile Aroma Compounds of "Marastina" Grapes as Influenced by Dehydration Techniques. *Applied sciences MDPI* , 10.

Cocolin, L., & Ciani, M. (2018). I lieviti non-Saccharomyces. In G. Suzzi, & R. Tofalo, *Microbiologia enologica* (p. 101-116). Bologna: Edagricole.

Cocolin, L., Heisey, A., & Mills, D. (2001). Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* , 49-53.

Comitini, E., & Ciani, M. (2006). Sopravvivenza di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* inoculati su uve da vino durante due annate. *Lettere in microbiologia applicata* (42), 248-253.

Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., & Querol, A. (1998, Luglio 1). The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology* , p. 143-148.

Francesca, N., Canale, D., Settanini, L., & Moschetti, G. (2012). Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environ Microbiol. Rep.* , 105-120.

Gostincar, C., Grube, M., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments? *Fungal Biology* , 1008-1018.

Gostincar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turco, M., Zajc, J., et al. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics* (549).

Isola, D., Selbmann, L., de Hoog, S. G., Fenice, M., Onofri, S., Prenafeta-Boldù, F. X., et al. (2013). Isolation and Screening of Black Fungi as Degraders of Volatile Aromatic Hydrocarbons. *Mycopathologia* , 369-379.

Josepa, S., Guillamon, J., & Cano, J. (2000). PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomuces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *Microbiological Letters FEMS* , 255-259.

Kumar, M., & Shukla, P. (2005). Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *Journal of Clinical Microbiology* , 662-668.

Maletic, E., Pejic, I., Karglan Kotic, J., Zdunic, G., Preiner, D., Simon, S., et al. (2015). Ampelographic and genetic characterization of Croatia grapevine varieties. *Vitis* , 93-98.

Martin, K., & Rygewicz, P. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* , 1-11.

Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., et al. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *Internationa Journal of Food Microbiology* , 177, 21-28.

Milanovic, V., Comitini, F., & Ciani, M. (2013). Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology* , 161 (3), 240-246.

Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Banuelos, M. A., Gonzalez, C., & Suarez Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* Application in Wine Technology. *Fermentation* (4), 53.

Romano, P., & Capece, A. (2018). La fermentazione spontanea. In G. Suzzi, & R. Tofalo, *Microbiologia enologica* (p. 2). Bologna: Edagricole.

Sabatel, J., Canol, J., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamòn, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological research* , 157, 267-274.

Serra Colomer, M., Funch, B., & Forster, J. (2019). La crescita delle specie di lievito *Brettanomyces* per la produzione di birra. *Current Opinion in Biotechnology* , 56, 30-35.

Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables by microbial antagonist: A review. *Biological control* , 205-221.

Suh, S.-O., Gibson, C. M., & Blackwell, M. (2004). *Metschnikowia chrysoperlae* sp. nov., *Candida picachoensis* sp. nov. and *Candida pimensis* sp. nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperlae carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 1883-1890.

Takesako, K., Kuroda, H., Inoue, T., Haruna, F., Yoshikawa, Y., Kato, I., et al. (1993). Biologic properties of Aureobasidin A, a cyclic depsipetide antifungal antibiotic. *The Journal of Antibiotics* , 1414-1420.

Tofalo, R., & Rantsiou, K. (2018). Ricerca, identificazione e caratterizzazione dei lieviti vinari. In G. Suzzi, & R. Tofalo, *Microbiologia enologica* (p. 155-174). Bologna: Edagricole.

Vaudano, E., Costantini, A., Pulcini, L., & Garcia-Moruno, E. (2018). I lieviti dell'habitat viticolo-enologico. *L'Informatore Agrario* (4), 33.

Vaudano, E., Pulcini, L., Costantini, A., & Garcia-Moruno, E. (2018). I lieviti dell'habitat viticolo-enologico. *L'Informatore Agrario* (4), 33.

Zalar, P., Gostincar, C., de Hoog, C. S., Ursic, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullans* and its varieties. *Studies in Mycology* , 61, 21-38.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dott.ssa Cristiana Garofalo per avermi permesso di portare avanti le ricerche, la Dott.ssa Federica Cardinali e tutti coloro che sono stati sempre presenti durante le giornate in laboratorio, disponibili per consigli e chiarimenti. Un particolare ringraziamento va alla Dott.ssa Vesna Milanović, per il suo fondamentale aiuto ed i consigli che mi hanno permesso di concludere al meglio questa bella esperienza. Desidero esprimere la mia più sentita gratitudine nei confronti di tutta la mia famiglia ed in particolare dei miei genitori, che mi hanno sempre sostenuto durante questo percorso. Ringrazio Linda per la grande pazienza e per la forza e l'impegno che ogni giorno mi trasmette e senza la quale non sarei arrivato fin qui. Infine non posso tralasciare Michele e Mario, grazie ai quali questi tre anni sono trascorsi in un istante.