Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Progetto "Thirsty Grapes"

Induzione della tolleranza allo stress idrico nella vite e protezione dai marciumi dell'uva durante l'appassimento mediante l'uso di idrolizzati proteici di origine vegetale

Relazione finale di sintesi

Misura	**124 (Azione S) - Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nel settore agricolo, alimentare e forestale**
Id. domanda	2307790
Soggetto proponente (capofila ATS)	Università degli Studi di Verona – Dipartimento di Biotecnologie
Partner ATS	Consorzio Tutela Vini Soave e Recioto di Soave, Consorzio per la Tutela dei Vini Valpolicella, Università degli Studi di Bari - Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Cantina Sociale Valpolicella Classico di San Pietro in Cariano, S.S. Agricola Tommasi Viticoltori, Agricola F.lli Tedeschi s.r.l.
Parole chiave	Idrolizzati proteici, composti naturali, stress idrico, appassimento, muffa grigia, vite

RESPONSABILE – COORDINATORE DI PROGETTO

Prof. Maurizio Boselli
Università degli Studi di Verona – Dipartimento di Biotecnologie

GRUPPO DI RICERCA

Prof. Maurizio Boselli
Dott. Christian Gastaldelli
Dott. Simone Baldo
Dott. Mohamed Ali Bahouaoui PhD
Dott.ssa Nihed Lachhab PhD
Università degli Studi di Verona – Dipartimento di Biotecnologie

Dott. Aldo Lorenzoni
Consorzio Tutela Vini Soave e Recioto di Soave

Consorzio per la Tutela dei Vini Valpolicella

Prof. Antonio Ippolito
Prof. Franco Nigro
Dott.ssa Simona M. Sanzani PhD
Dott.ssa Angela Maria Ligorio PhD
Università degli Studi di Bari - Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti

Dott. Roberto Verzillo
Cantina Sociale Valpolicella Classico di San Pietro in Cariano

S.S. Agricola Tommasi Viticoltori

Simone Quintarelli
Agricola F.lli Tedeschi s.r.l.

I N D I C E

1. Introduzione 5

2. Abstract progetto 6

2.1. Obiettivi e benefici del progetto **6**

2.2. Lista dei partecipanti e ruolo ricoperto nel progetto **7**

3. Elaborazione piano esecutivo di progetto e affidamento incarichi 9

3.1. Obiettivi dell'azione **9**

3.2. Attività svolte e metodologia applicata **9**

3.3. Output dell'azione **9**

4. Studio della composizione chimica e molecolare di idrolizzati proteici di origine vegetale 10

4.1. Obiettivi dell'azione **10**

4.2. Attività svolte e metodologia applicata **10**

4.3. Output dell'azione **10**

5. Determinazione del bilancio idrico di piante sottoposte a diversi livelli di stress idrico e trattamenti con idrolizzati proteici di origine vegetale 11

5.1. Obiettivi dell'azione **11**

5.2. Attività svolte e metodologia applicata **11**

5.3. Output dell'azione **11**

6. Determinazione dei caratteri agronomici e tecnologici delle uve 12

6.1. Obiettivi dell'azione **12**

6.2. Attività svolte e metodologia applicata **12**

6.3. Output dell'azione **12**

7. Determinazione di molecole segnale in piante trattate e soggette a stress idrico 13

7.1. Obiettivi dell'azione **13**

7.2. Attività svolte e metodologia applicata **13**

7.3. Output dell'azione **13**

8. Determinazione di *priming* a seguito di segnali *root-shoot* attivati da stress idrico 14

8.1. Obiettivi dell'azione **14**

8.2. Attività svolte e metodologia applicata **14**

8.3. Output dell'azione **14**

9. Controllo della sanità dell'uva in fruttaio 15

9.1. Obiettivi dell'azione **15**
9.2. Attività svolte e metodologia applicata **15**
9.3. Output dell'azione **15**

10. Piano di comunicazione e diffusione informazioni 16
10.1. Obiettivi dell'azione **16**
10.2. Attività svolte e metodologia applicata **16**
10.3. Output dell'azione **16**

11. Gestione e monitoraggio progetto 18
11.1. Obiettivi dell'azione **18**
11.2. Attività svolte e metodologia applicata **18**
11.3. Output dell'azione **18**

12. Conclusioni e proposte 19

1. Introduzione

L'agricoltura moderna ha di fronte a se la sfida della sostenibilità, che vuol dire sopravvivenza non solo economica nel lungo periodo, ma, nello stesso tempo, uso razionale delle risorse naturali soprattutto di quelle cosiddette non rinnovabili, come l'acqua e il suolo.
Per la viticoltura, la sostenibilità è diventata cruciale con la tendenza a ridurre per quanto possibile i *carbon* e *water footprint*.
Quindi due sono gli obiettivi della moderna viticoltura: ridurre l'uso dell'acqua per irrigazione e ridurre l'impiego dei *chemicals*, siano essi antiparassitari o erbicidi.
Le piante esposte a stress ambientali reagiscono con varie reazioni biochimiche per proteggersi. E' stato dimostrato che la vite trattata con una varietà di agenti che inducono resistenza stimolano l'effetto *priming* nella pianta.
Di notevole interesse appaiono gli idrolizzati proteici come alternativa ad altri induttori di resistenza sintetici (ormoni) agli stress abiotici.
Recentemente alcuni studi hanno confermato l'efficacia di alcuni biostimolanti nei confronti di stress sia abiotici, sia biotici.
Il presente lavoro intende proprio mettere a punto dei prodotti innovativi e verificare la loro efficacia nei confronti degli stress biotici e abiotici cui la vite è soggetta.

2. Abstract progetto

2.1. Obiettivi e benefici del progetto

	Obiettivo operativo	Benefici	Valutazione
1	Analisi di idrolizzati proteici di nuova formilazione di origine vegetale.	Abbandono di idrolizzati proteici da carniccio, sottoprodotto della lavorazione delle pelli. Sviluppo di metodiche industriali più rispondenti alla viticoltura sostenibile.	Valutazione della loro attività biologica, sia come componente singolo, sia in combinazione.
2	Determinazione del bilancio idrico di piante trattate con idrolizzati proteici di origine vegetale e sottoposte a diversi livelli di stress idrico.	Contrasto verso lo stress idrico delle piante di vite con prodotti ad effetto *priming* di origine naturale. Benefici per una viticoltura a basso impatto ambientale con la limitazione dell'irrigazione.	Valutazione del bilancio idrico della vite con metodo innovativi in risposta ai trattamenti con idrolizzati di origine naturale.
3	Determinazione dei caratteri agronomici e tecnologici di uve trattate con idrolizzati proteici.	Miglioramento della qualità delle uve e soprattutto dei contenuti in metaboliti secondari.	Analisi chimico-fisica delle uve ottenute e trattate con idrolizzati.
4	Determinazione di molecole segnale in piante soggette a stress idrico.	Miglioramento delle conoscenze della reazioni biochimiche della vite a seguito di stress idrico e di trattamenti con idrolizzati contenenti molecole segnale.	Valutazione delle risposte di ipersensibilità da parte della vite (HR).
5	Determinazione dell'espressione genica a seguito di segnali *root-shoot* attivati da stress idrico.	Miglioramento delle conoscenze su come gli idrolizzati elicitino risposte di difesa agli stress abiotici.	Valutazione in particolare dell'attivazione dei fattori di trascrizione (TF).
6	Determinazione delle modalità di applicazione di idrolizzati proteici contro patogeni della fase post-raccolta come *B. cinerea*, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp..	Contrasto a parassiti noti per le proprietà tossigene e pertanto dannosi per il consumatore.	Valutazione della presenza di funghi durante l'appassimento dell'uva.
7	Proporre un approccio innovativo per contrastare gli stress abiotici e biotici della vite.	Incremento di reddito delle aziende vitivinicole con il miglioramento dell'immagine "salubre" dell'uva e del vino.	Valutazione degli effetti della comunicazione e del trasferimento tecnologico delle informazioni,

2.2. Lista dei partecipanti e ruolo ricoperto nel progetto

I Partner che collaborano alla realizzazione del progetto Thirsty Grapes sono i seguenti:

Denominazione partner	Codice nel progetto
Università degli Studi di Verona – Dipartimento di Biotecnologie	R
Consorzio Tutela Vini Soave e Recioto di Soave	P1
Consorzio per la Tutela dei Vini Valpolicella	P2
Università degli Studi di Bari - Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti	P3
Cantina Sociale Valpolicella Classico di San Pietro in Cariano	P4
S.S. Agricola Tommasi Viticoltori	P5
Agricola F.lli Tedeschi s.r.l.	P6

I Soggetti Interessati coinvolti nel progetto Thirsty Grapes sono i seguenti:

Denominazione	Codice nel progetto
Vivaio Enotria s.s.	I1
Comune di Fumane	I2
Az. Agr. Monte dei Ragni di Zignoli Zeno	I3
Tenute Ugolini di Ugolini Giambattista	I4

La matrice delle responsabilità, di seguito rappresentata, illustra il ruolo e gli incarichi affidati a ciascun partner di progetto:

R= DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA
P1= CONSORZIO TUTELA VINI SOAVE E RECIOTO DI SOAVE
P2= CONSORZIO PER LA TUTELA DEI VINI VALPOLICELLA
P3= DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO, DELLA PIANTA E DEGLI ALIMENTI - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI
P4= CANTINA DI SAN PIETRO IN CARIANO
P5= S.S. AGRICOLA TOMMASI VITICOLTORI
P6= AGRICOLA F.LLI TEDESCHI s.r.l.
I1= VIVAIO ENOTRIA s.s.
I2= COMUNE DI FUMANE
I3= AZ. AGR. MONTE DEI RAGNI DI ZIGNOLI ZENO
I4= TENUTE UGOLINI DI UGOLINI GIAMBATTISTA

PARTNER / **ATTIVITÀ**	**R**	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**	**P6**	**I1**	**I2**	**I3**	**I4**
1. Elaborazione piano esecutivo di progetto e affidamento incarichi	**Cr**	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co
2. Studio della composizione chimica e molecolare di idrolizzati proteici di origine vegetale	**Cr**			Co							
3. Determinazione del bilancio idrico di piante sottoposte a diversi livelli di stress idrico e trattamenti con idrolizzati proteici di origine vegetale	**Cr**				Co	Co	Co	Co		Co	Co
4. Determinazione dei caratteri agronomici e tecnologici delle uve	**Cr**			Co	Co	Co	Co	Co		Co	Co
5. Determinazione di molecole segnale in piante trattate e soggette a stress idrico	**Cr**			Co							
6. Determinazione di *priming* a seguito di segnali *root-shoot* attivati da stress idrico	**Cr**			Co							
7. Controllo della sanità dell'uva in fruttaio	Co			**Cr**	Co	Co	Co				
8. Piano di comunicazione e diffusione informazioni	Co	**Cr**	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co
9. Gestione e monitoraggio progetto	**Cr**	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co	Co

Legenda:
Cr= Coordinatore responsabile dell'azione e del personale che collabora alla realizzazione della stessa.
Co= Soggetto che collabora alla realizzazione di attività/azioni coordinato da un soggetto responsabile dell'azione.

3. Elaborazione piano esecutivo di progetto e affidamento incarichi

3.1. Obiettivi dell'azione

La proposta progettuale intende affrontare, sulla base dell'esperienza condotta direttamente sul territorio con varie competenze specifiche e un lavoro interdisciplinare, vari aspetti relativi alle problematiche recentemente emerse relative in particolare all'applicazione delle pratiche di sostenibilità in viticoltura, intese come riduzione dell'uso dell'acqua di irrigazione nei vigneti e dei *chemicals* per il controllo delle malattie della vite.
La selezione dei partner e dei soggetti interessati ha l'obiettivo di ottimizzare l'efficienza e l'efficacia delle azioni programmate, sia riguardo all'attività di sperimentazione, sia per la fase di diffusione risultati.

3.2. Attività svolte e metodologia applicata

Il lavoro è stato impostato e organizzato secondo metodologie di Project Management, con utilizzo di strumenti quali Work Breakdown Structure (WBS), per l'articolazione delle attività e l'assegnazione dei compiti, e Diagramma di Gantt, per la programmazione temporale di dettaglio e il controllo delle attività. L'attività è stata suddivisa in task.

- Pianificazione delle attività;
- Coordinamento e controllo di avanzamento.

3.3. Output dell'azione

Per la realizzazione del Progetto THIRSTY GRAPE i partner si sono costituti in ATS.
La funzione di Project Management è stata curata dal soggetto capofila R dell'ATS supportata dal partner P3.
Come soggetto capofila dell'ATS, R ha svolto la funzione di interagire nei confronti di AVEPA, compiere gli adempimenti necessari e gestire il contributo e la sua ripartizione tra i partner.
Nel mese 1 è stato effettuato l'incontro per avanzamento fisico e procedurale per l'illustrazione e la ripartizione delle attività. Sono stati definiti i format per la raccolta di informazioni e per illustrare le attività svolte; sono stati attribuiti gli incarichi a ogni singolo partecipante e condivisi i vari documenti da predisporre e da compilare nel corso del progetto; sono state condivise le tempistiche degli incontri di avanzamento e degli incontri a carattere tecnico-organizzativo.

4. Studio della composizione chimica e molecolare di idrolizzati proteici di origine vegetale

4.1. Obiettivi dell'azione

Gli idrolizzati proteici derivati da legumi producono un gruppo distinto di metaboliti secondari chiamati collettivamente isoflavoni che comprendoni isoflavoni, come daidzeina e genisteina, e pterocarpani, come medicarpina e glyceollina, studiate anche per i loro benefici nei riguardi della salute umana.

Questi composti vegetali naturali svolgono un ruolo importante nelle risposte di difesa aumentando la resistenza ai vari agenti patogeni. Inoltre, essi agiscono come antibiotici e come precursori per la produzione di fitoalessine.

Lo scopo del presente task è di analizzare la componente proteica e peptidica di idrolizzati di diversa origine in modo da specificarne le eventuali caratteristiche funzionali.

4.2. Attività svolte e metodologia applicata

E' stata analizzata la composizione di diversi idrolizzati proteici prodotti dalla Ditta A. Costantino SpA e destinati all'industria farmaceutica e alimentare per verificare le possibilità di impiego di questi prodotti in campo agricolo.

Gli idrolizzati sono stati prodotti mediante idrolisi enzimatica controllata impiegando le seguenti materie prime: soia, lupino, caseina.

4.3. Output dell'azione

La composizione e le caratteristiche chimiche degli idrolizzati sono variate in base alla materia prima utilizzata.

Rispetto ai parametri che sono considerati importanti per questi prodotti, il carbonio organico è variato dal 47% della soia al 43% circa della caseina, al 40% circa del lupino, valori peraltro molto elevati e che danno dignità ai prodotti testati. L'azoto organico è stato di 10,60 % per la caseina, di 8,38% per la soia e di 8,23% per il lupino. Gli AA liberi sono variati da circa il 37% per la caseina, al 14% circa per il lupino, al 9% circa per la soia. La concentrazione di aminoacidi totali e liberi è variata notevolmente fra i tre idrolizzati proteici. La distribuzione dei pesi molecolari fa emergere la caseina per la percentuale di aminoacidi e peptidi al di sotto dei 5000 kDa.

5. Determinazione del bilancio idrico di piante sottoposte a diversi livelli di stress idrico e trattamenti con idrolizzati proteici di origine vegetale

5.1. Obiettivi dell'azione

La vite è sottoposta a diversi tipi di stress quali la siccità, la salinità dei suoli e dell'acqua, le alte e le basse temperature, l'acidità dei suoli, che ne limitano la diffusione a livello mondiale.
E' comunque lo stress idrico che rappresenta il principale fattore che influenza negativamente e riduce la produttività e la qualità della vite.
La stimolazione nella pianta di una migliore regolazione stomatica mediante induttori di resistenza di origine naturale (con l'adeguamento della traspirazione, della conduttanza stomatica e dei parametri di potenziale idrico) è considerata una strategia importante per controllare le perdite di acqua. Questi prodotti naturali comprendono gli idrolizzati proteici (PHs), che sono ampiamente usati come integratori nutrizionali delle colture per i loro effetti benefici attribuiti alla presenza di ormoni della crescita. Lo studio si propone di valutare l'effetto biostimolante di PHs di origine naturale nel migliorare la qualità e la resistenza allo stress idrico della vite, in questo caso migliorando la funzionalità stomatica.

5.2. Attività svolte e metodologia applicata

Le prove sul campo sono state effettuate per due stagioni di crescita (2013-2014) in un vigneto condotto in modalità biologica della varietà Corvina. I trattamenti con i PHs (Soy, Lup, and Cas) sono stati eseguiti per via fogliare ogni anno per tre volte ogni 10 giorni a partire dall'allegagione avvenuta (BBCH 71). Le dosi impiegate sono state di 1,6 e 6,4 g/L.
Semi *wild-type* della pianta modello *Arabidopsis thaliana* sono stati fatti germinare nel mezzo di crescita Murashige e Skoog (1962) e fatti sviluppare in condizioni controllate in una camera di crescita.
Sono state trattate le foglie completamente espanse (sette giorni dopo la germinazione dei semi) impiegando idrolizzati tal quale (Soy- e Cas- PHs) e solo con le proteine estratte da ciascuno di essi (Soy- and Cas-W-PHs) alle concentrazioni di 0,8-1,6-6,4 mg/mL.
L'indice di conduttanza stomatica (Ig) per la varietà Corvina e per *Arabidopsis* è stato determinato mediante una termocamera a infrarossi.
Le differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) sono state identificate utilizzando la procedura General Linear Model (GLM) con il Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

5.3. Output dell'azione

I risultati riportati sulla variazione di Ig durante i tre giorni successivi al trattamento hanno mostrato effetti significativi della Soy e Cas nel ridurre l'Ig rispetto al controllo. La percentuale di riduzione è variata da 51 a 63% nel caso dei trattamenti con Soy e tra 46 e 60% nel caso di Cas.
Applicando i due diversi PH su *Arabidopsis* è stata osservata una significativa riduzione di Ig. Vaporizzando Soy a 0,8 e 1,6 mg/mL, è stata registrata una generale e significativa diminuzione della conduttanza stomatica Ig, compresa fra il 33 e il 73%. Vaporizzando sia *entire* Cas-PH, sia purificato (Cas-W-PHs), è stata rilevata una significativa riduzione della conduttanza stomatica.
Pertanto, una strategia per ridurre il consumo di acqua di irrigazione è quello di diminuire la traspirazione netta della vite senza intaccare la produttività e la qualità.

6. Determinazione dei caratteri agronomici e tecnologici delle uve

6.1. Obiettivi dell'azione

Per migliorare l'efficienza dell'assorbimento dei nutrienti minerali e per ridurre l'inquinamento ambientale sono stati presi in considerazione molti composti in grado di migliorare la crescita e lo sviluppo delle piante quando applicati in piccole quantità al suolo o direttamente sulla superficie fogliare. Questi prodotti sono classificati come regolatori dello sviluppo, come potenziatori metabolici o come biostimolanti. Si conoscono vari esempi di prodotti amminoacidici e biostimolanti utilizzati in agricoltura e generalmente gli effetti sono multipli. In genere si notano delle modifiche metaboliche nella pianta delle attività di alcuni enzimi determinate dalla diversa composizione in aminoacidi dei prodotti.
Lo scopo del presente task ha inteso valutare gli effetti dell'applicazione fogliare di idrolizzati proteici di origine naturale sulle caratteristiche quali-quantitative del vitigno Corvina coltivato in Valpolicella.

6.2. Attività svolte e metodologia applicata

Le prove sono state effettuate negli anni 2013-2014 sul vitigno Corvina in tre vigneti privati. Sulle tesi impostate sono stati eseguiti 3 trattamenti fogliari a distanza di 10 giorni, a partire dall'allegagione avvenuta.
I prodotti (idrolizzati proteici di origine vegetale) e le dosi impiegate sono state le seguenti:
- Tesi E = B_PS145_a alla dose di 2,5 L/Ha;
- Tesi F = B_PS749 alla dose di 0,5 Kg/Ha;
- Tesi G = B_PS105 alla dose di 4 L/Ha;
- Tesi H = B_PS105 + B_PS145_alla dose di 4 L/Ha + 2,5 L/Ha, rispettivamente;
- Tesi I = B_PS105 + B_PS749 alla dose di 4 L/Ha + 0,5 Kg/Ha, rispettivamente.

Alla vendemmia sono stati rilevati i parametri agronomici, tecnologici e fenolici.
L'analisi statistica dei dati è stata realizzata applicando l'analisi della varianza (ANOVA) a tre criteri di valutazione per pesare gli effetti principali e le interazioni utilizzando il pacchetto STATISTICA, versione 10. Il confronto fra le medie è stato fatto usando il *multiple range test* di Duncan per $p \leq 0.05$.

6.3. Output dell'azione

I trattamenti con idrolizzati proteici hanno determinato significativi miglioramenti sia produttivi, sia qualitativi della varietà Corvina. In modo particolare sono state le componenti coloranti della buccia ad essere influenzate in positivo, in annate particolarmente problematiche dal punto di vista climatico e per una varietà che geneticamente non possiede un alto livello di polifenoli. Sulla componente zuccherina del mosto alla vendemmia i miglioramenti determinati dai trattamenti non sono stati univoci, ma peraltro non era auspicato un loro effetto sull'aumento del grado zuccherino stante il fatto che spesso, a causa del riscaldamento globale, l'alcol potenziale raggiunto alla raccolta risulta eccessivo per l'elaborazione di vini equilibrati, con una rimarchevole componente aromatica, freschi e fragranti, come richiesto dal consumatore attuale.

7. Determinazione di molecole segnale in piante trattate e soggette a stress idrico

7.1. Obiettivi dell'azione

Le cellule di guardia stomatiche giocano un ruolo decisivo nella regolazione degli scambi gassosi e nell'efficienza dell'uso dell'acqua. Molti stimoli fisiologici regolano le aperture stomatiche, inclusi l'acido abscissico (ABA), CO_2 e elicitori di vario tipo.

Un componente segnale che lega i diversi stimoli è la concentrazione del calcio citosolico libero ([Ca^{2+}]cyt), che induce la chiusura stomatica.

La sensibilità del modello basato sul Ca^{2+} recentemente proposto potrebbe spiegare molti dei risultati in campo. Recenti ricerche dimostrano che gli stimoli causati da ABA aumentano la sensibilità dei meccanismi di chiusura degli stomi incrementando il Ca^{2+}, definito *calcium sensitivity priming*.

In questo studio sono esaminati gli effetti di idrolizzati-induttori di resistenza nel determinare l'eventuale innalzamento del ([Ca^{2+}]cyt) in piante di vite.

7.2. Attività svolte e metodologia applicata

Nei diversi saggi sono state utilizzate sospensioni cellulari della varietà Gamay (*V. vinifera*). *Wild type* e sospensioni cellulari-equorina trasformate sono state coltivate nel mezzo Nitsch Nitsch sotto luce continua (2000 erg/cm^2). Per l'analisi della variazione di concentrazione del calcio citosolico libero, le cellule trasformate sono state raccolte e lavate con tampone M10. La ricostituzione in vivo dell'equorina è stata effettuata aggiungendo 5 mM di coelenterazina alle sospensioni cellulari per minimo 3 h al buio. La concentrazione di calcio citosolico libero è stata analizzata misurando la luminescenza dell'equorina.

7.3. Output dell'azione

I dati riportati in questo studio hanno mostrato la capacità di entrambi gli idrolizzati di soia e caseina nell'indurre una specifica variazione del [Ca^{2+}]cyt, considerato essenziale per l'attivazione della risposta di difesa e nell'indurre la chiusura stomatica. Le cellule elicitate con gli idrolizzati hanno mostrato un rapido aumento del [Ca^{2+}]cyt, rispetto al controllo rappresentato da acqua. Gli idrolizzati di soia e caseina hanno determinato due comportamenti diversi, caratterizzati da differenti cinetica e durata, che contribuiscono alla specificità della risposta per ciascun idrolizzato proteico, suggerendo la presenza di differenti molecole attive nello stimolo alla difesa.

8. Determinazione di *priming* a seguito di segnali *root-shoot* attivati da stress idrico

8.1. Obiettivi dell'azione

Diversi studi hanno cercato di indagare le differenze di espressione genica tra specie di *Vitis* esposte a una varietà di stress biotici e abiotici utilizzando DNA microarray. Tuttavia, questa tecnica presenta molte limitazioni analizzando il totale trascritto in particolare a causa dell'alta complessità del genoma della vite.

Pertanto, nel presente lavoro è stata impiegata la tecnologia *high-throughput deep-sequencing*, al fine di caratterizzare le dinamiche trascrizionali globali associate all'induzione di resistenza nella vite provocata dall'idrolizzato di soia.

8.2. Attività svolte e metodologia applicata

Piante di *V. vinifera* sono state coltivate in cella climatica. Le piante sono stati divise casualmente in due lotti, composti da 3 repliche di 3 piante ciascuno. Il primo è stato spruzzato fino a gocciolamento con idrolizzato di soia e il secondo con acqua. L'esperimento è stato ripetuto due volte.

Le foglie sono state raccolte a 0, 6, 12, 24 e 48 ore, congelate in azoto liquido, polverizzate e tenute a -80°C fino all'estrazione dell'RNA.

L'RNA totale è stato isolato e il DNAse trattato con Kit DNA/RNA *Isolation*.

Sono state preparate due librerie utilizzando il kit di preparazione del campione TruSeqTM RNA (Illumina, USA) da 4 µg di RNA totale *(Low-Throughput Protocol*). Successivamente, il cDNA ottenuto è stato sottoposto a elettroforesi su gel di agarosio all'1% e la dimensione verificata a circa 260 bp. Le biblioteche sono state quantificate con NanoDrop 2000 e Qubit 2.0 Fluorometer, unite, normalizzata la concentrazione a 7 pM e caricate nella cella di flusso. La *cluster generation* è stata eseguita in una stazione cluster di Illumina.

Il genoma di *V. vinifera* è stato caricato tra i file di *mapping*. I dati di espressione sono stati caricati e analizzati da un software per la visualizzazione MapMan della via metabolica indotta/repressa mediante l'applicazione dell'idrolizzato di soia dopo 24 ore.

La convalida dei profili di espressione ottenuti da RNA-Seq, qPCR è stata effettuata su 6 geni selezionati in modo casuale per alto o basso livello di espressione.

8.3. Output dell'azione

I dati hanno mostrato una forte induzione del metabolismo secondario in foglie di vite trattate con soia, tra triterpeni, fenilpropanoidi e vie biosintetiche dei flavonoidi, correlata con un accumulo di composti fenolici quali stilbeni, flavonoidi e lignina.

L'analisi trascrizionale di foglie di vite trattate con idrolizzato di soia ha rivelato una sovraregolazione di geni coinvolti nella risposta allo stress abiotici. In particolare, la modulazione del gene codificante la proteina di risposta allo stress termico, come DnaJ (gsvivt01026352002), è di 39 volte maggiore rispetto al controllo.

In aggiunta, i geni di risposta allo stress idrico e salino, come ATHLAC3A (gsvivt01007555001) sono espressi 39 volte in più rispetto al controllo non trattato.

La sovraregolazione dei geni selezionati risultante dall'analisi di RNA-Seq, ha dimostrato di essere confermato dai profili di espressione qPCR. In particolare, PAL e STS sono stati sovraespressi da 52- a 6 volte rispetto al controllo non trattato. Per concludere, l'analisi dei dati di RNA-Seq ha permesso di svolgere un'indagine globale di modulazione trascrizionale in foglie di vite dopo 24 ore di applicazione dell'idrolizzato di soia. L'idrolizzato di soia ha dimostrato di essere un elicitore efficiente in grado di regolare più risposte agli stress abiotici della vite.

9. Controllo della sanità dell'uva in fruttaio

9.1. Obiettivi dell'azione

La vite è altamente sensibile a *Botrytis cinerea* Pers., determinando gravi perdite in campo e durante la fase di postraccolta; queste ultime sono particolarmente gravi per quelle uve sottoposte al processo di appassimento (Corvina, Corvinone e Rondinella) per l'ottenimento di vini speciali come "Amarone" e "Recioto". Pertanto, è necessario un controllo efficace della muffa grigia per ridurre le perdite in resa e migliorare la qualità dei vini prodotti.
Scopo della sperimentazione è stato quello di studiare l'attività di otto idrolizzati proteici (PH) ottenuti da varie materie prime quali soia (soyA e soyB), lupino (lupF e lupP), pisello (Pea), lievito (yeast), caseina (cas), e malto (cer), contro la muffa grigia dell'uva.

9.2. Attività svolte e metodologia applicata

Il ceppo FV32 di *B. cinerea*, depositato nella collezione del Dipartimento di Scienze Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Università degli Studi di Bari Aldo Moro), è stato coltivato in piastre di PDA per 10 giorni a 24 ± 1 °C. Le soluzioni madre degli idrolizzati sono state preparate 24 h prima dell'uso. Le diverse soluzioni a base di idrolizzati sono stati aggiunte al PDA fuso prima di versare in piastre Petri, per ottenere le concentrazioni finali desiderate (0.8, 1.6, 6.4 e 12.8 g/L). Le prove sono state effettuate durante la campagna vitivinicola 2013 e 2014 in un vigneto biologico della cv. Corvina. Gli idrolizzati, selezionati in base ai risultati delle prove di laboratorio, sono stati spruzzati sulle viti (0,8 e 1,6 g/L) ogni 15 giorni, dallo stadio di post-fioritura (BBCH-71) fino all'invaiatura (BBCH-81). Sono stati eseguiti trattamenti pre- e postraccolta contro il marciume botritico in conservazione. Ulteriormente, le viti sono state trattate in campo con gli idrolizzati selezionati (0,8 g/L) una settimana prima della raccolta. Successivamente, 10 grappoli per pianta trattata, esenti da lesioni o sintomi della malattia visibili, sono stati raccolti (BBCH-89), messi in cassette di plastica ventilate e subito immersi in 0,8 g/L di soluzione per 30 s. Come controllo sono state utilizzate piante e grappoli trattati con acqua. I campioni sono stati tenuti un mese in condizioni naturali di appassimento. La malattia sui grappoli è stata valutata mediante una scala empirica con valori compresi tra 0 (grappolo sano) e 6 (più del 75% bacche infette) con sviluppo dell'indice di McKinney.

9.3. Output dell'azione

Sull'uva della varietà Corvina con applicazioni sia di campo, sia durante la fase di appassimento, *soyA* e *cas* hanno ridotto significativamente l'incidenza della muffa grigia in vigneto, rispetto al controllo, rispettivamente del 65 e del 92%. Con la doppia somministrazione, in pre- e postraccolta, *soyA* e *cas* hanno portato ad una riduzione dei marciumi nella fase di conservazione rispettivamente del 56 e 40%. Nel complesso *soyA* ha mostrato la migliore efficacia.
I risultati ottenuti, dimostrano come gli idrolizzati proteici a base di caseina e di soia applicati sia in campo che in postraccolta possono rappresentare una sicura ed efficace alternativa a fungicidi di sintesi contro lo sviluppo della muffa grigia dell'uva.

10. Piano di comunicazione e diffusione informazioni

10.1. Obiettivi dell'azione

L'intensa attività di trasferimento dei risultati è tesa a raggiungere i seguenti risultati complessivi e finali:
- coinvolgimento nelle attività di progetto di vari soggetti esterni al gruppo, in particolare le aziende vitivinicole venete, le istituzioni, le strutture commerciali italiane ed estere;
- diffusione dei risultati scientifici presso la comunità scientifica nazionale e internazionale;
- divulgazione delle nuove conoscenze ad un vasto numero di professionisti del settore, attraverso strumenti (convegni, seminari, articoli tecnici) che consentano l'approfondimento alle diverse categorie di persone (tecnici, operatori, proprietari d'azienda).

10.2. Attività svolte e metodologia applicata

Per la diffusione si prevedono all'interno del Progetto le seguenti attività:
- organizzazione di un convegno in itinere e finale di illustrazione del progetto e presentazione dei risultati, con la partecipazione di produttori e istituzioni;
- realizzazione di pubblicazioni scientifiche da parte dei ricercatori partner R e P3 in collaborazione con gli altri partner del Progetto;
- diffusione dei risultati del Progetto tramite iniziative autonome di comunicazione dei partner.

10.3. Output dell'azione

Presentazione del progetto presso "la Feltrinelli": sabato 5 aprile 2014 dalle ore 18.30 alle ore 22.30; Location: la Feltrinelli – via 4 Spade n. 2 – Verona.

Convegno congiunto che ha coinvolto i seguenti progetti:
- Progetto "CO2 Reduction System" - DGR 1354 del 03/08/2011, ID. domanda: 2308769;
- Progetto "Residuo 0" - DGR 1354 del 03/08/2011, ID. domanda: 2307785;
- Progetto "Thirsty Grapes" - DGR 1604 del 31/07/2012, ID. domanda: 2307790;
- Progetto "Molecular Wine" – L.R. 18.05.2007, n. 9 - DGR n. 4222 del 30.12.2008 e n. 156 dell'11.02.2013.

Presentazione del progetto alla fiera Vinitaly (ed. 2014): mercoledì 9 aprile 2014 ore 10.00; Location: fiera Vinitaly (presso lo stand del Consorzio di Tutela Vini Soave e Recioto di Soave).
Convegno congiunto che ha coinvolto i seguenti progetti:
- Progetto "CO2 Reduction System" - DGR 1354 del 03/08/2011, ID. domanda: 2308769;
- Progetto "Residuo 0" - DGR 1354 del 03/08/2011, ID. domanda: 2307785;
- Progetto "Thirsty Grapes" - DGR 1604 del 31/07/2012, ID. domanda: 2307790;
- Progetto "Molecular Wine" – L.R. 18.05.2007, n. 9 - DGR n. 4222 del 30.12.2008 e n. 156 dell'11.02.2013.

Presentazione del progetto alla fiera Vinitaly (ed. 2015): mercoledì 25 Marzo 2015 ore 10.00; Location: fiera Vinitaly (presso lo stand del Consorzio di Tutela Vini Soave e Recioto di Soave).
Convegno congiunto che ha coinvolto i seguenti progetti:
- Progetto "CO2 Reduction System" - DGR 1354 del 03/08/2011, ID. domanda: 2308769;
- Progetto "Residuo 0" - DGR 1354 del 03/08/2011, ID. domanda: 2307785;
- Progetto "Thirsty Grapes" - DGR 1604 del 31/07/2012, ID. domanda: 2307790;
- Progetto "Molecular Wine" – L.R. 18.05.2007, n. 9 - DGR n. 4222 del 30.12.2008 e n. 156 dell'11.02.2013;
- Progetto "EcoOrt" - DGR 1354 del 03/08/2011, ID. domanda: 2307792.

Convegno di presentazione dello stato di avanzamento del progetto: giovedì 19 Febbraio 2015 ore 15.00; Location: Aula Berni, Dipartimento di Biotecnologie - Villa Lebrecht, San Floriano-VR.

Convegno di fine progetto: mercoledì 8 luglio 2015 ore 20.30; Location: Sala riunioni, Cantina Sociale di San Pietro in Cariano (VR).

Pubblicazioni scientifiche inerenti il progetto:

1. Lachhab N., Sanzani S.M., Adrian M., Chiltz A., Balacey S., Boselli M., Ippolito A., Poinssot B., 2015. Control of grapevine downy mildew by protein hydrolisates. Italian Phytopathological Society Congress. Turin 21-23 sept.
2. Lachhab N., Sanzani S.M., Bahouaoui M.A., Boselli M., Ippolito A., 2015. Effect of protein hydrolysates against gray mould of table and wine grapes. European Journal of Plant Pathology, submitted.
3. Boselli M., Bahouaoui M.A., Lachhab N., Sanzani S.M., Ippolito A., 2015. Vite: idrolizzati proteici contro lo stress idrico. Inf. Agr., 22: 39-42.
4. Lachhab N., Sanzani S.M., Adrian M., Chiltz A., Boselli M., Ippolito M., Poinssot B., 2014. Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against *Plasmopara viticola*. Frontiers in Plant Science, Vol. 5, Article 716: 1-10 | doi: 10.3389/fpls.2014.00716. PMID: 25566290.
5. Lachhab N., Sanzani S.M., Boselli M., Ippolito A., 2014. Idrolizzati proteici come induttori di resistenza a malattie pre- postraccolta. Giornate tecniche SOI, Ancona, 29-30 maggio.

Tesi di dottorato e di laurea inerenti il progetto:

1. Lachhab N., 2014. Protein hydrolysates as resistance inducers to pre- and postharvest fungal diseases of grapevine. Corso di Dottorato di Ricerca in Protezione delle colture (Università di Bari – XXVI ciclo). PhD Coordinator and Supervisor Prof. Antonio Ippolito, Co-Supervisor Prof. Maurizio Boselli.
2. Fiorella R., a.a. 2013-2014. Risultati di trattamenti con prodotti biostimolanti sulle caratteristiche qualitative della varietà Corvina – discussione marzo 2014; relatore Prof. Maurizio Boselli.
3. Gastaldelli C., a.a. 2013-2014. Effetti di trattamenti con prodotti a base aminoacidica sulla produttività e la qualità dell'uva Corvina – discussione luglio 2014; relatore Prof. Maurizio Boselli.
4. Rossignoli E., a.a. 2013-2014. Effetto di trattamenti con biostimolanti contenenti estratti vegetali sulla produttività e qualità della varietà Corvina – discussione luglio 2014; relatore Prof. Maurizio Boselli.

11. Gestione e monitoraggio progetto

11.1. Obiettivi dell'azione

Durante lo svolgersi della sperimentazione i partner si mantengono in costante contatto con il coordinatore del progetto al quale invieranno relazioni intermedie sull'andamento della ricerca svolta dal proprio gruppo entro la fine dei mesi di gennaio e giugno di ogni anno. Il coordinatore del progetto, avvalendosi eventualmente della collaborazione dei partner, provvederà alla redazione di relazioni intermedie d'insieme.
Il gruppo di lavoro si incontra periodicamente.

11.2. Attività svolte e metodologia applicata

Le attività svolte sono state relative alla collezione di documenti relativi all'avanzamento dei costi del progetto e alla rendicontazione (m 1-24) ed in particolare i *timesheets* individuali per ciascuna risorsa coinvolta e le note riassuntive delle spese dei partner e relativa documentazione contabile.
E' stato effettuato altresì il controllo contabile sui documenti di spesa (m 1-24) come la coerenza delle singole voci di spesa al budget (in termini di importi e voci di costo) e il rispetto delle scadenze fissate per i pagamenti;
E' stata anche eseguita la gestione di eventuali criticità legate al progetto (m 1-24) applicando diversi indicatori.
Con il monitoraggio si è inteso applicare un sistema che, sulla base dell'utilizzo di specifici ed appropriati criteri, ha avuto l'obiettivo di tenere sotto controllo, in maniera strutturata e con *step* ricorrenti e prefissati, la durata e i risultati del progetto.

11.3. Output dell'azione

Il progetto THISTY GRAPE è costituito dall'insieme di un numero elevato di attività che, pur connotate da diverse natura e da specifiche finalità, concorrono tutte alla realizzazione di uno specifico obiettivo, entro un predefinito arco temporale e rispettando il preassegnato budget.
Non sono stati registrati ritardi, inefficacie o inefficienze in nessuna delle singole attività tant'è che gli obiettivi programmati del progetto sono da considerare pienamente raggiunti senza manchevolezze in termini di sforamenti di tempi e spesa.

12. Conclusioni e proposte

Il progetto THIRSTY GRAPE ha avuto il suo svolgimento e raggiunto gli obiettivi prefissati in modo coerente a quanto programmato inizialmente.

Il progetto e il finanziamento avuto dalla Regione Veneto ha consentito di avviare e consolidare, in alcuni casi, stretti rapporti di collaborazione tecnico-scientifica con la Aziende e i Consorzi coinvolti nel progetto, che si sono sempre dimostrati assai collaborativi.

Il progetto ha permesso anche di sviluppare una stretta collaborazione con due Unità di ricerca francesi (UMR e INRA, Université de Bourgogne, Dijon, France), presso le quali ha svolto una parte del dottorato la Dott.ssa Nihed Lachhab PhD, collaboratrice del progetto e assegnista aggregata alla Cattedra di Viticoltura, Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona.

Sono stati compiuti una serie di studi tutti propedeutici l'uno all'altro, partendo dall'analisi di base dei prodotti testati, fino a compiere approfondimenti per quanto riguarda i loro effetti in vigneto, integrati con le conoscenze di base, derivate dall'analisi trascrittomica e metabolomica, l'individuazione di *biomarkers* (trascritti e metaboliti) associati ai trattamenti con gli idrolizzati proteici, seguiti dall'identificare degli aspetti genetico-molecolari e metabolomici connessi agli effetti determinati dai trattamenti.

Secondo anche ai presupposti di base, gli idrolizzati proteici hanno dimostrato di essere degli elicitori efficienti in grado di regolare più risposte agli stress abiotici e biotici della vite, dimostrando che applicazioni fogliari di biostimolanti sulla vite possono giocare un ruolo multifunzionale.

Riguardo alla composizione fenolica delle bacche, i trattamenti con idrolizzati proteici hanno determinato significativi miglioramenti sia produttivi, sia qualitativi della varietà Corvina. In modo particolare sono state le componenti coloranti della buccia ad essere influenzate in senso positivo

Per gli quanto riguarda la protezione contro lo stress idrico, i dati riportati in questo studio hanno mostrato la capacità degli idrolizzati di indurre una specifica variazione del $[Ca^{2+}]$cyt, considerato essenziale per l'attivazione delle risposte di difesa e nell'indurre la chiusura stomatica, consentendo alla pianta di economizzare l'acqua.

Per concludere, l'analisi dei dati di RNA-Seq ha permesso di svolgere un'indagine globale di modulazione trascrizionale in foglie di vite dopo 24 ore di applicazione in particolare dell'idrolizzato di soia, evidenziando le vie importanti. L'idrolizzato di soia ha dimostrato di essere un elicitore efficiente in grado di regolare più risposte agli stress abiotici della vite.

In termini di proposta, emerge in modo sempre più pressante l'esigenza da parte della filiera produttiva vitivinicola del raccordo con le istituzioni di ricerca per trasferire specifiche problematiche legate alla produzione che, presso le istituzioni, devono trovare accoglimento e soluzioni, nel concetto generale del *problem solving*. Importante, a questo proposito, come le osservazioni in campo che spesso trovano difficoltà nell'essere interpretate e nel trovare il legame causa-effetto, siano approfondite con le tecniche illustrate nel presente progetto e che le soluzioni siano trasferite agli utilizzatori in modo diffuso.

Iniziativa finanziata dal Programma di Sviluppo Rurale per il Veneto 2007 – 2013.

Organismo responsabile dell'informazione: A.T.S. Thirsty Grapes; soggetto capofila: Università degli Studi di Verona – Dipartimento di Biotecnologie; partner: Consorzio Tutela Vini Soave e Recioto di Soave, Consorzio per la Tutela dei Vini Valpolicella, Università degli Studi di Bari - Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Cantina Sociale Valpolicella Classico di San Pietro in Cariano, S.S. Agricola Tommasi Viticoltori, Agricola F.lli Tedeschi s.r.l..

Autorità di Gestione: Regione Veneto - Direzione Piani e Programmi Settore Primario.