

Relazione attività scientifica (SAL1)

Nel periodo compreso tra ottobre 2022 e gennaio 2023 è stata effettuata la ricerca bibliografica sulla banca dati di letteratura scientifica PubMed utilizzando le seguenti parole chiave: “yeast; identification; characterization; method*; wine”. Lo scopo della ricerca era quello di trovare dei protocolli utili all’identificazione e caratterizzazione dei lieviti presenti nel vino. Tra i numerosi articoli scientifici il più calzante si è rivelato un lavoro di Kurtzman del 1998 dal titolo “Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences”. In base alle indicazioni fornite dal suddetto lavoro scientifico sono stati disegnati ed acquistati dei primer oligonucleotidici specifici che consentissero l’amplificazione mediante PCR della molecola di RNA 26S:

Primer forward: 5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG

Primer reverse: 5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG.

Il campionamento è stato effettuato il 18 settembre 2023 presso la vigna della ditta Sidero Cosima (Figura 1):



Figura 1. Area del campionamento

Il campionamento è stato effettuato utilizzando tamponi e provette coniche da 50 mL sterili. I vitigni campionati sono stati il Montonico (uva bianca) e il Magliocco

(uva nera). In particolare, sono stati prelevati campioni sia dagli acini che dai raspi (Figura 2).



Figura 2. Campionamento.

Sono stati prelevati in totale 10 campioni, 5 per ogni tipologia di uva che sono stati poi piastrati per 36 ore a 30 °C su terreno YPD sterile avente la seguente composizione:

- estratto di lievito (10g/L)
- peptone (20g/L)
- D-glucosio (20g/L)
- acqua deionizzata (1L).

Poiché le piastre non contenevano terreno selettivo, sono cresciuti sia lieviti, che muffe e batteri (Figure 3-5).



Figura 3. Muffe



Figura 4. Lieviti



Figura 5. Batteri e muffe.

I lieviti cresciuti su terreno YPD sono stati selezionati su terreno DRBC contenente il rosa bengala e cloramfenicolo per impedire la crescita di microrganismi diversi dai lieviti (Figura 6). Per la preparazione del terreno DRBC sono stati sciolti 15 g della polvere di DRBC in 500 mL di acqua bidistillata. Dopo avere autoclavato il terreno, è

stato aggiunto cloramfenicolo (100 mg/L) e la soluzione è stata distribuita su piastre Petri dove è avvenuta la solidificazione a temperatura ambiente. Successivamente, le piastre sono state asciugate in incubatore a 30 °C prima di essere utilizzate.



Figura 6. Semina su DRBC

Dopo 24 ore a 30°C abbiamo potuto osservare la crescita di colonie di lievito di colore rosa (Figura 7).

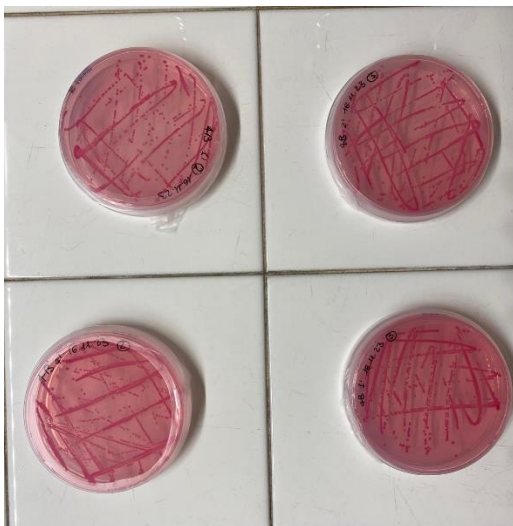


Figura 7. Lieviti cresciuti su DRBC

Il terreno DRBC è servito a discriminare i lieviti (cellule di colore rosa in figura 7) da diversi ceppi di *Aspergillus* (colonie bianche, marroni o nere), figura 8.

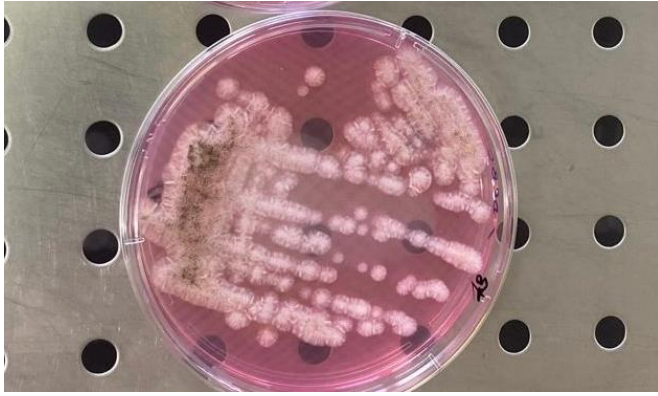


Figura 8. Colonie di *Aspergillus*.

A partire dalle piastre che presentavano colonie di lievito, si è proceduto con la selezione di colonie che sono state inoculate in 5 mL di terreno YPD overnight a 30 °C a 200 rpm. Il giorno seguente, dopo aver misurato la torbidità (assorbanza a 600 nm di lunghezza d'onda) della sospensione cellulare mediante un biofotometro, la coltura è stata centrifugata a 6000 x g per 10 minuti a 4 °C per ottenere il pellet contenente i lieviti. Partendo da due campioni è stato estratto il DNA genomico mediante il kit genomic DNA buffer set della Qiagen. Dopo aver estratto il DNA genomico sono state realizzate delle reazioni di amplificazione mediante PCR utilizzando il seguente protocollo:

- 1µL di gDNA
- 1µL di dNTPs
- 0.6 µL primer forward
- 0.6 µL primer reverse
- 10 µL buffer GC 5X
- 2.5 µL DMSO
- 0.6 µL Taq polimerasi
- 33.7 µL di H₂O

Il profilo termico utilizzato è indicato in figura 9 ed è stato ripetuto per 36 cicli.

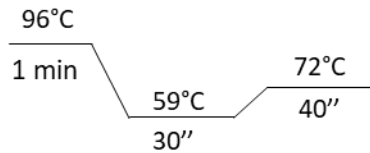


Figura 9. Profilo termico della PCR.

Il prodotto di PCR è stato caricato su un gel di agarosio allo 0.8% (Figura 10).

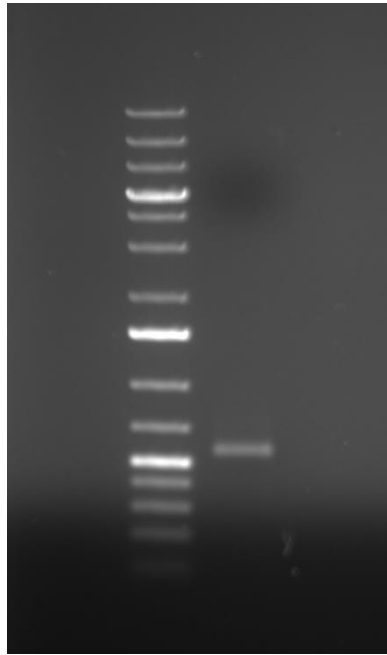


Figura 10. Amplificazione mediante PCR

Il DNA amplificato è stato estratto dal gel di agarosio con il kit SV gel extraction della Promega ed è stato sottoposto a sequenziamento del DNA con il metodo di Sanger modificato. La sequenza ottenuta è stata allineata mediante il programma BLAST con la banca dati di DNA di lievito per identificare il ceppo di lievito presente (Figura 11).

Range 1: 1 to 283[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	510 bits(276)	6e-140	281/283(99%)	2/283(0%)	Plus/Minus	
Query	3		TAG-TTT-GATGGAATTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTC			60
Sbjct	283		TAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTC			224
Query	61		GAAAAAGTCTTACAGAGAAAAGGTATCCTCGCCAAACGGGATTCTCACCTCTATGACGT			120
Sbjct	223		GAAAAAGTCTTACAGAGAAAAGGTATCCTCGCCAAACGGGATTCTCACCTCTATGACGT			164
Query	121		CCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGACCTAATCAAAGACAAATTCTACAAATTACAACCTC			180
Sbjct	163		CCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGACCTAATCAAAGACAAATTCTACAAATTACAACCTC			104
Query	181		GGGCACTGAAAGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTACCGCTTCACTCGCCGTTACTAA			240
Sbjct	103		GGGCACTGAAAGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTACCGCTTCACTCGCCGTTACTAA			44
Query	241		GGTAATCCCAGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCA	283		
Sbjct	43		GGTAATCCCAGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCA	1		

Lodderomyces elongisporus strain CBS 2605 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MK394128.1](#) Length: 2674 Number of Matches: 1

Range 1: 2332 to 2615[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	507 bits(274)	8e-139	282/285(99%)	3/285(1%)	Plus/Plus	
Query	6		GAAGAAGAA-TTTG-AAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT			63
Sbjct	2332		GAA-AAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT			2390
Query	64		GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGG			123
Sbjct	2391		GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGG			2450
Query	124		GCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGAGAATTGCGTAGGAATGTGGCTCGGCCTCGGTCGAG			183
Sbjct	2451		GCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGAGAATTGCGTAGGAATGTGGCTCGGCCTCGGTCGAG			2510
Query	184		TGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGAT			243
Sbjct	2511		TGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGAT			2570
Query	244		GTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGGACCAA	288		
Sbjct	2571		GTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCCGTCTTGAAACACGGACCAA	2615		

Figura 11. Allineamenti in banca dati.

Come si può osservare dalla figura 11, il sequenziamento del DNA genomico ha consentito di identificare i ceppi di lievito *Hanseniaspora uvarum* e *Lodderomyces elongisporus*. Lo step successivo sarà quello di continuare con la caratterizzazione degli altri ceppi di lievito dai pellet ottenuti in precedenza.

Il responsabile scientifico

Prof. Michele Galluccio

A handwritten signature in brown ink, appearing to read 'Michele Galluccio', written in a cursive style.