



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



Università degli Studi  
di Sassari

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE**

**Università degli studi di Sassari**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI AGRARIE E BIOTECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI**

**SEZIONE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA**

**Studio dell'aggregazione cellulare  
in ceppi vinari di *Saccharomyces  
cerevisiae***

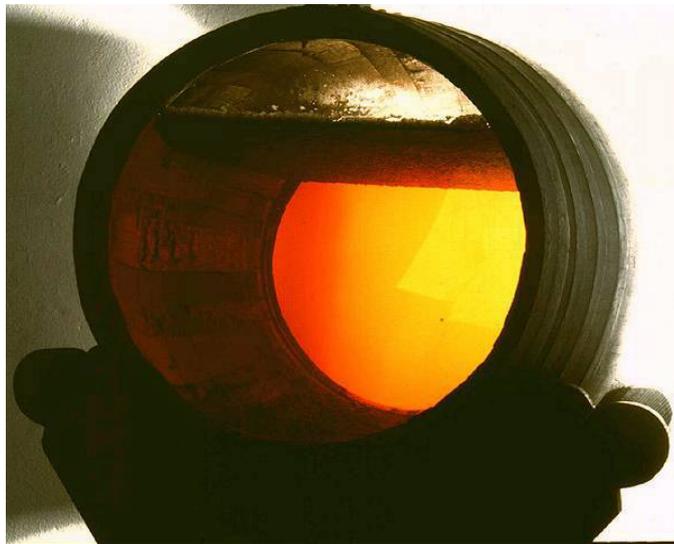
Tutor:  
Prof.ssa Marilena Budroni

Tesi di Dottorato di:  
Dott. ssa Claudia Pinna

Coordinatore:  
Prof. Giovanni Antonio Farris

## I lieviti flor

I lieviti flor appartengono alla specie *Saccharomyces cerevisiae* (Kurtzman and Fell, 1988). Al termine della fermentazione alcolica sono in grado di risalire sulla superficie del vino, contenente quantità elevate di alcol (circa 15% v/v), e di formare un biofilm chiamato flor, passando da un metabolismo di tipo fermentativo ad uno di tipo ossidativo (fig. 1).



**Figura 1.** Formazione del biofilm (flor) nella produzione dello "Sherry".

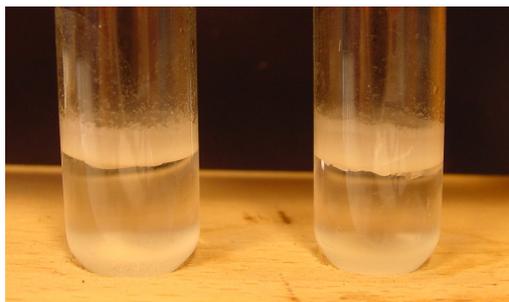
I lieviti flor producono importanti quantità di acetaldeide, come risultato dell'ossidazione dell'etanolo per mezzo dell'alcoldeidrogenasi Adh3 (Garçia Maiquez, 1995). Normalmente questo composto è considerato negativo nei vini bianchi da consumarsi giovani, dove è particolarmente ricercata la freschezza, la fragranza e la sapidità; è apprezzato invece in quelli invecchiati biologicamente, dove è responsabile di peculiari aromi e sapori. Farris et al.(1978) hanno dimostrato che la formazione del velo e la produzione di acetaldeide sono correlate alla temperatura. Infatti a 10° C sono stati riscontrate produzioni di acetaldeide di 200-210 mg/l, con temperature comprese tra i 20 e i 25° C di 320-360 mg/l e con temperature di 40° C di 70 mg/l. La produzione di acetaldeide è inoltre

influenzata dalla presenza di ossigeno, dalla composizione del mezzo di coltura, dal tipo di chiarificante utilizzato, dalla concentrazione di anidride solforosa e dall'aerazione (Romano *et al.*, 1994; Berlanga *et al.*, 2001).

I ceppi flor assumono una grande importanza nell'affinamento biologico di vini quali gli Sherry spagnoli e vini tipici della Sardegna, come la Vernaccia di Oristano, la Malvasia di Bosa e l'Arvisionadu di Benetutti. Nella tecnologia di affinamento di questi vini infatti le botti non vengono riempite completamente, ma vengono lasciate scolme per 1/3 del volume. In questo modo la presenza di un'interfaccia aria-vino permette al lievito di risalire in superficie e formare il flor (Fatichenti and Farris, 1983). Sotto l'azione del biofilm, precludendo ogni contatto diretto del vino con l'aria, numerosi composti organici vengono metabolizzati con meccanismi ossidativi. Il prodotto finale assume perciò caratteristiche organolettiche, cromatiche ed aromatiche particolari, che lo differenziano dagli altri vini bianchi.

Il fenomeno della florizzazione è associato al cosiddetto *shift diauxico*, ovvero la riprogrammazione dell'espressione genica, che avviene durante la crescita in carenza di glucosio e presenza di etanolo e determina il passaggio da un metabolismo di tipo anaerobio, quale quello fermentativo, ad uno aerobio (DeRisi *et al.*, 1997), permettendo al lievito di crescere e svilupparsi una volta che le condizioni del mezzo divengono proibitive.

La formazione di un velo sulla superficie del vino offre inoltre un modello sperimentale di studio per la regolazione della formazione di biofilm. Il fenomeno può essere riprodotto in laboratorio con l'utilizzo di un terreno minimo di coltura, contenente etanolo come unica fonte di carbonio (Zara *et al.*, 2002) (fig. 2).



**Figura 2.** Riproducibilità del biofilm formato da un ceppo flor di *Saccharomyces cerevisiae* su terreno sintetico.

## **La risalita dei lieviti flor sulla superficie**

I lieviti flor si sviluppano sulla superficie del vino, che contiene in genere oltre il 15% di etanolo (v/v) e si ritiene che questo sia una risposta adattativa che consente al lievito di sfuggire a condizioni stressanti. Le condizioni di stress sono rappresentate dalla carenza di fonti carboniose fermentescibili, di sostanze azotate dall'elevato grado alcolico e dalla mancanza di ossigeno (Suarez Lepe e Inigo Leal, 1990; Zara *et al.*, 2008). E' stato dimostrato che i ceppi in cui la crescita è inibita da maggiori concentrazioni di etanolo producono il biofilm più velocemente (Martinez *et al.*, 1997). Le cause che determinano la risalita dei lieviti in superficie non sono state ancora chiarite, sono però state formulate alcune ipotesi. Secondo Cantarelli e Martini (Cantarelli and Martini, 1969), la risalita delle cellule è imputabile ad un maggiore contenuto dei lipidi totali in fase esponenziale di crescita, ciò comporterebbe la risalita delle cellule, dovuta ad una diminuzione del loro peso specifico. Imura *et al.*, (1980) propongono che l'aumento dell'idrofobicità della superficie cellulare, conseguente all'aumento degli acidi grassi insaturi sulla superficie della cellula, sia la causa della risalita. E' stato infatti rilevato un incremento del livello di insaturazione degli acidi grassi totali nel passaggio dalla fase non-flor alla fase flor (Farris *et al.*, 1993). Martinez *et al.* (1997) ipotizzano che la CO<sub>2</sub> trattenuta dagli aggregati cellulari, determini una minore densità delle cellule e consenta il trasferimento delle stesse dalla fase planctonica a quella superficiale. Recentemente il modello proposto da Zara *et al.*, (2005), individua il livello di espressione del gene *FLO11*. Questo gene codifica una proteina di parete che incrementa l'idrofobicità della superficie della cellula, che a sua volta si traduce nella formazione di aggregati cellulari. Gli aggregati idrofobici intrappolano l'anidride carbonica prodotta dalla fermentazione degli zuccheri residui; le bolle di CO<sub>2</sub> favorirebbero la risalita delle cellule sulla superficie dando luogo alla formazione del biofilm.

## **La Biodiversità dei ceppi flor**

La maggior parte dei ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae* mostra una grande propensione all'instabilità genetica (Pretorius, 2000), che si manifesta con riarrangiamenti cromosomali dovuti a traslocazioni mediate da Ty (Rachidi *et al.*, 1999), crossingover mitotici (Aguilera *et al.*, 2000), conversioni geniche (Puig, 2000), che consentono a questi ceppi di adattarsi alle variazioni ambientali. Recentemente alcuni autori (Johnston *et al.*, 2000; Mortimer, 2000, Fernandez-Espinar, 2001) hanno analizzato la stabilità genetica di diversi caratteri enologici, mettendo in evidenza sia la possibilità di poter migliorare geneticamente alcuni ceppi già in commercio, sia la presenza, sul mercato, di ceppi identici ma commercializzati con nomi diversi. La stabilità genetica è anche influenzata dal ciclo vitale (Budroni *et al.*, 2000). L'elevata pressione di selezione a cui sono sottoposti i lieviti vinari e quelli flor in particolare, si ripercuote sulla riproduzione sessuale di questi ceppi, generando aneuploidia (Delneri *et al.*, 2003). Le elevate concentrazioni di etanolo (15% v/v nei vini florizzati), possono incrementare l'aneuploidia (O'Neill and Kaufman, 1987). La maggior parte dei ceppi vinari è descritta come altamente polimorfica a livello cromosomale (Codon *et al.*, 1998) e la costituzione genetica è fortemente influenzata, oltrechè da aneuploidie e poliploidie, anche da amplificazioni e delezioni di regioni cromosomali o di singoli geni, e dalla presenza di cromosomi ibridi (Adams *et al.*, 1992; Biddenne *et al.*, 1992; Rachidi *et al.*, 1999).

## **La Biodiversità dei ceppi flor sardi**

Lo studio della biodiversità in zone quasi incontaminate da LSA è importante da un punto di vista applicativo perché consente di raggiungere due obiettivi: la salvaguardia dei ceppi naturali e la loro caratterizzazione per la messa a punto di starter adattati a particolari condizioni tecnologiche.

Per differenziare e identificare i ceppi enologici sono stati utilizzati diversi metodi di analisi molecolare. L'analisi di restrizione di DNA genomico e

mitocondriale (RFLP), la generazione casuale di polimorfismi di amplificazione di DNA genomico (RAPDs) e la analisi di restrizione di frammenti generati tramite PCR da regioni complete ITS and NTS di DNA ribosomale (rDNA), costituiscono un potente strumento di analisi della microflora indigena delle fermentazioni spontanee (Vezinhet *et al.*, 1990; Querol *et al.*, 1992 ; Vezinhet *et al.*, 1992) e dei vini affinati biologicamente (Budroni *et al.*, 2001; Pinna *et al.*, 2001; Fernandez-Espinar *et al.*, 2001).

L'analisi su gel di agarosio in campi pulsati (PFGE) é stata utilizzata per caratterizzare ceppi flor di *Saccharomyces cerevisiae* (Budroni *et al.*, 1996), e per determinare la loro distribuzione geografica (Budroni *et al.*, 2001). Budroni *et al.* (2000) hanno riscontrato un diffuso polimorfismo cromosomale nei ceppi flor isolati da Vernaccia. In particolare sono stati individuati 8 cariotipi ed è stata rilevata la presenza di un cariotipo dominante rispetto ad altri meno diffusi e rappresentati. Gli stessi autori propongono che la presenza di un cariotipo dominante possa essere una conseguenza della pressione di selezione esercitata dall'intervento antropico, nel corso del tempo. Inoltre, il marcato polimorfismo di lunghezza cromosomica riscontrato nei ceppi flor, probabilmente dovuto a riarrangiamenti inter ed intracromosomali, é in accordo con il vasto numero di cariotipi riscontrati. Di conseguenza non è possibile identificare un cariotipo standard per i ceppi flor (Budroni *et al.*, 1996). Come proposto per altri ceppi selvatici e industriali di *Saccharomyces cerevisiae*, è stato dunque ipotizzato un vantaggio selettivo per i ceppi flor che, grazie al forte polimorfismo cromosomico, possono evolversi adattandosi rapidamente ai cambiamenti ambientali (Budroni *et al.*, 1996).

Infante *et al.*, (2003) hanno proposto i ceppi flor per lo studio dei fenomeni di speciazione nella specie *Saccharomyces cerevisiae*, individuando nei riarrangiamenti cromosomali un importante fattore per l'evoluzione adattativa dei ceppi naturali.

L'analisi del profilo di restrizione del DNA mitocondriale è risultato utile per identificazioni interspecifiche. Questa tecnica è stata ampiamente

utilizzata per caratterizzare la microflora spontanea in fermentazione, per identificare differenze intraspecifiche, per studi ecologici e per studiare la risposta mitocondriale dei ceppi flor.

Pinna *et al.* (2000), hanno utilizzato questa tecnica per analizzare i ceppi flor precedentemente analizzati tramite PFGE: questi autori hanno riscontrato che ceppi isolati da Vernaccia, con cariotipo dominante, avevano lo stesso profilo di restrizione del DNA mitocondriale. Questo fatto suggerisce che probabilmente nell'Oristanese è ampiamente diffuso e utilizzato un solo ceppo.

## **I vini florizzati sardi**

Nei vini florizzati le caratteristiche sensoriali sono strettamente legate alla fase dell'affinamento in botte, che avviene ad opera dei lieviti *flor* i quali determinano un arricchimento aromatico del vino. L'influenza che il ceppo di lievito ha sulle caratteristiche qualitative di un vino è ormai accertata (Farris *et al.*, 1994; Fatichenti *et al.*, 1975; Fatichenti e Farris, 1973) e questa influenza nell'affinamento sotto flor è amplificata anche dal fattore tempo, che gioca un ruolo importantissimo; ne consegue che uno starter per la produzione di vino florizzato, deve possedere caratteri peculiari che lo distinguono dai normali starter enologici. Infatti, un buon ceppo flor, oltre a fermentare e produrre buone quantità di etanolo (15/16°), deve florizzare velocemente, evitando inquinamenti del velo da parte di altri microrganismi, "marcare" aromaticamente il vino e garantire stabilità genetica di questi caratteri per lunghi periodi di tempo (2-5 anni).

### Vernaccia di Oristano

La *Vernaccia di Oristano* a Denominazione d'Origine Controllata (DOC) è un vino tipo *Xères (Sherry)*, affinato biologicamente in botte grazie all'azione di lieviti detti *flor*. Purtroppo negli ultimi 20 anni (Idda, 1995) questo vino è andato incontro ad un calo di interesse da parte sia dei consumatori, che hanno preferito altre tipologie di vino, sia dei produttori che hanno progressivamente abbandonato la coltivazione di questo

vitigno. Attualmente nella zona DOC sono presenti non più di 400 ettari coltivati a Vernaccia, contro i 1375 ettari registrati nel 1991 (Idda, 1995); inoltre, circa il 70% delle uve raccolte è destinato alla produzione di Vernaccia giovane ad Indicazione Geografica Tipica (IGT), (Camera di Commercio di Oristano 2002) in quanto non raggiungono i requisiti minimi per la produzione della Vernaccia DOC.

Tuttavia, i lieviti flor, responsabili “dell’affinamento biologico” della Vernaccia, non vengono citati nel disciplinare DOC (DPR 11/08/1971 G.U. n° 247 del 30/08/1971); nell’articolo 5 si parla di “invecchiamento” in botte di castagno o rovere ma non vengono specificate le modalità. La scelta del ceppo di lievito da utilizzare risulta di importanza fondamentale per l’incremento di qualità del vino.

In base al disciplinare di produzione, che regola la produzione e la commercializzazione della Vernaccia di Oristano, per godere della DOC, il vino deve essere prodotto dall’omonimo vitigno (art. 2), nei comuni indicati nell’art. 3 e ricadenti nel Campidano di Oristano; la resa massima di uva ammessa (art. 4) è di 80 q.li/ha e la resa massima delle uve in vino (art. 4) non deve superare il 65% espresso come peso/volume. Inoltre la Vernaccia di Oristano DOC può essere prodotta con diverse denominazioni, in relazione alle caratteristiche chimiche e al tempo di invecchiamento in botte. Le tipologie di prodotto indicate negli art. 5, 7, 8, 9 e 10 sono: “Vernaccia di Oristano DOC”, “Vernaccia di Oristano superiore DOC”, “Vernaccia di Oristano liquoroso DOC”, “Vernaccia di Oristano liquoroso secco (dry)” e “Vernaccia di Oristano Superiore Riserva”.

### Malvasia di Bosa

Il disciplinare di produzione del vino Malvasia di Bosa (DPR 21 luglio 1972) prevede che per l’ottenimento della DOC il vino deve essere prodotto da uve del vitigno Malvasia di Sardegna, nei territori dei comuni di Bosa, Suni, Tinnura, Flussio, Magomadas, Tresnuraghes e Modolo.

Il vino nuovo viene conservato in botti di legno di castagno di piccola capacità (2-4 ettolitri) e subisce due travasi (generalmente a gennaio e ad aprile). La scolmatura non rappresenta una pratica comunemente adottata dai produttori; per lo più avviene casualmente e solo in tal caso si sviluppa il biofilm superficiale. Il vino deve invecchiare per almeno 2 anni. Al secondo anno infatti si raggiunge un equilibrio tra gli aromi primari derivati dall'uva e quelli secondari e terziari legati alla fermentazione e all'affinamento biologico.

La Malvasia di Bosa DOC è commercializzata nelle tipologie "Dolce Naturale, Secca, Liquorosa Dolce Naturale, Liquorosa Secca".

### Arvisionadu

Il vino Arvisionadu, sebbene sia prodotto in tutto il Goceano, subisce l'invecchiamento sotto flor solo nella zona di Benetutti. Questo vino non è regolato da un disciplinare di produzione. Il vitigno è probabilmente autoctono. Raramente è prodotto in purezza ed è spesso accompagnato in uvaggio con *Arriadorza* e *Vermentino*. La vinificazione avviene in piccole cantine con tecniche tradizionali. Il vino appena ottenuto ha una gradazione alcolica del 13% circa (v/v) e al momento della svinatura, viene trasferito in piccole botti di castagno. Il processo di florizzazione prende inizio quando i primi prelievi lasciano leggermente scolma la botte. Considerando che nel vino Arvisionadu di Benetutti la florizzazione non è determinata da una attenta gestione da parte dei produttori, talvolta si verificano inconvenienti tecnici dovuti alla presenza di microrganismi inquinanti.

## **Caratterizzazione molecolare**

Lo studio della biodiversità delle popolazioni microbiche tramite tecniche molecolari, ha recentemente riscosso un crescente interesse. La salvaguardia del patrimonio biologico è di fondamentale importanza sia per l'ottenimento di ceppi starter capaci di marcare aromaticamente i vini

derivati da diverse cultivar (Nikolau *et al.*, 2006), sia per assicurare la conservazione di una diversità genetica nell'ambito di attività produttive basate su processi tecnologici mediati da lieviti.

I metodi molecolari proposti per l'identificazione e la differenziazione dei ceppi vinari sono numerosi (Onno and Russel, 1994). Uno strumento importante col quale caratterizzare in modo efficiente ed univoco ceppi diversi all'interno della specie *Saccharomyces cerevisiae* è rappresentato dall'analisi di bersagli molecolari tramite PCR. Il DNA genomico contiene sequenze ripetute, gli SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphisms*), di lunghezza variabile e impiegabili come marcatori genetici per la caratterizzazione molecolare. I microsatelliti rappresentano i bersagli molecolari di elezione e ciò è dovuto alla loro distribuzione omogenea lungo tutto il genoma, mentre i minisatelliti sono tendenzialmente localizzati nelle regioni terminali dei cromosomi (Brown, 1999).

I minisatelliti sono costituiti da una successione di sequenze variabili, che differiscono l'una dall'altra per uno o più nucleotidi (Jeffreys *et al.*, 1990) e questa proprietà li rende altamente polimorfici. I minisatelliti localizzati nelle regioni subtelomeriche sono formati da unità ripetute di 36 bp e il loro numero può variare da 7 a 26 (Paques *et al.*, 2001); nei minisatelliti diffusi nei geni le unità hanno dimensioni variabili. È interessante notare, che la metà dei geni che contengono minisatelliti, sono geni di parete, molti dei quali codificano per proteine legate in modo covalente ai polisaccaridi della parete cellulare (Klis *et al.*, 2002).

In particolare si conoscono due tipi di SSLP: i minisatelliti (VNTR: variable number tandem repeats) e i microsatelliti (STR: simple tandem repeats). Nei minisatelliti la lunghezza dell'unità ripetitiva è di qualche decina di nucleotidi, mentre nei microsatelliti le unità ripetitive sono molto più corte, di-, tri-, o tetra-nucleotidiche.

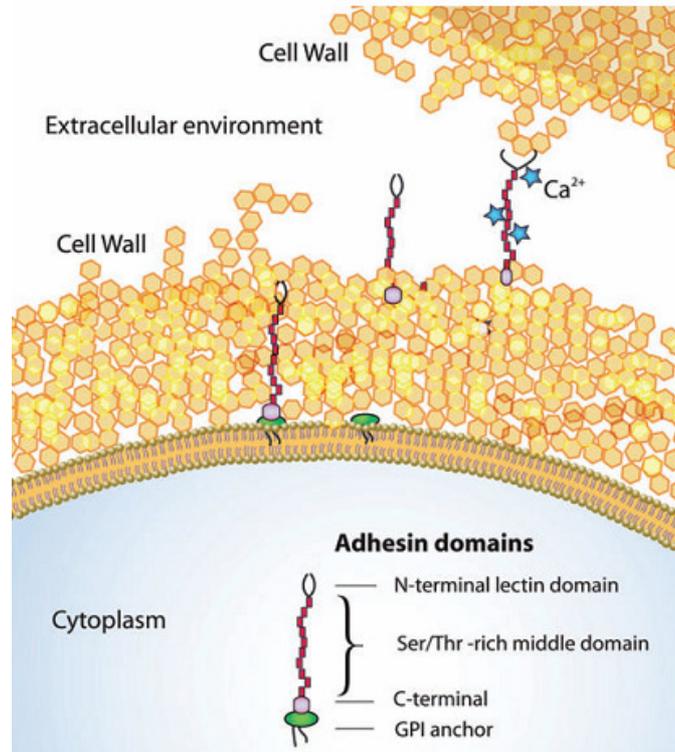
In particolare i geni di parete di *Saccharomyces cerevisiae* costituiscono bersagli molecolari preferenziali per la biotipizzazione dei ceppi. I minisatelliti contenuti nei geni *AGA1*, *DAN4*, *HSP150* e *SED1* sono stati

utilizzati per la caratterizzazione di ceppi vinari (Mannazzu *et al.*, 2002, Marinangeli *et al.*, 2004).

I minisatelliti contenuti all'interno delle ORFs dei geni considerati si comportano come siti di ricombinazione e generano polimorfismi di lunghezza dei geni che vengono utilizzati per distinguere e caratterizzare individui diversi all'interno delle popolazioni naturali di *Saccharomyces cerevisiae* (Mannazzu *et al.*, 2002, Marinangeli *et al.*, 2004). I primers specifici per questi geni generano profili stabili e di immediata identificazione, con un livello di risoluzione che rende univoca la discriminazione tra ceppi diversi, e li ha resi una valida alternativa ad altri strumenti molecolari precedentemente utilizzati quali i microsattelliti, o l'analisi delle sequenze interdelta.

## Struttura delle adesine

L'adesione fungina è conferita da proteine della parete cellulare altamente specializzate, chiamate 'adesine' o 'floculine', che riconoscono specifici aminoacidi o residui zuccherini sulla superficie di altre cellule o promuovono il legame con superfici di varia natura (fig. 3).

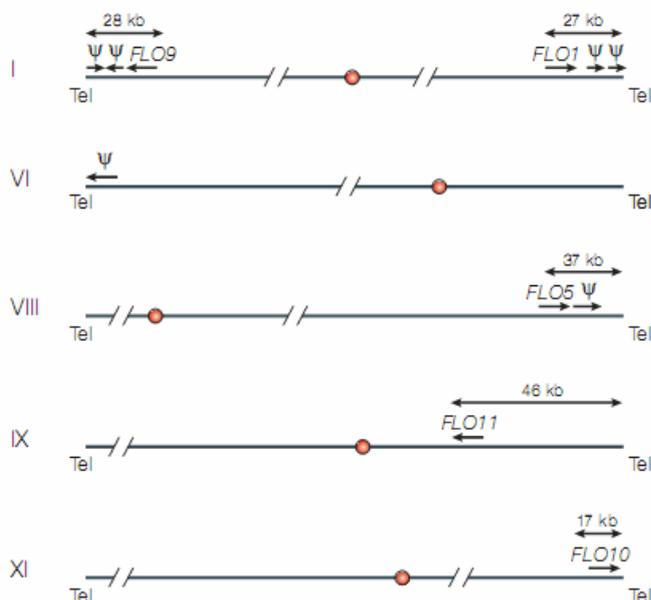


**Figura 3. Secrezione e ancoraggio cellula-superficie delle adesine fungine.** Nella struttura proteica delle adesine si distinguono tre domini (Hoyer *et al.*, 1998). Durante il trasporto attraverso il pathway di secrezione, le adesine subiscono una serie di modificazioni post-traduzionali. Nel reticolo endoplasmatico il peptide segnale N-terminale viene rimosso mentre il peptide segnale C-terminale è sostituito da una GPI ancora; inoltre, in tale sede, hanno inizio le N-glicosilazioni e le O-glicosilazioni a carico dei residui di serina e treonina presenti nei domini centrali. Un ulteriore processamento della GPI ancora e della catena oligosaccaridica avviene nel Golgi (Udenfriend and Kodukula, 1995; Bony *et al.*, 1997; Tiede *et al.*, 1999; De Groot *et al.*, 2003; Frieman and Cormack, 2003). Si ritiene che le corte catene oligosaccaridiche O-legate consentano alle adesine di assumere una lunga struttura semirigida che viene stabilizzata da ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (Jentoft, 1990).

Una volta raggiunta la membrana plasmatica, l'adesina si lega covalentemente al  $\beta$ -1,6 glucano attraverso il GPI (Lu *et al.*, 1995; Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2002) (da Verstrepen and Klis, 2006).

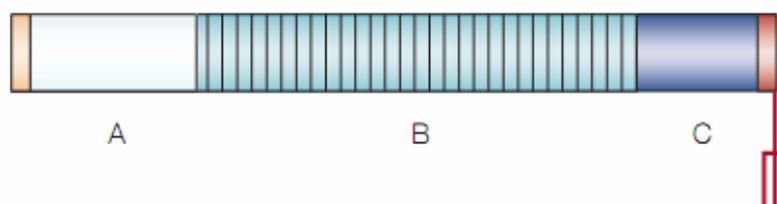
In *Saccharomyces cerevisiae* sono stati individuati cinque geni *FLO* (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11*) che codificano per adesine

(flocculine) di parete; *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* e *FLO10* sono adiacenti ai telomeri (fig. 4).



**Figura 4.** Localizzazione cromosomica dei geni che codificano per le adesine e dei pseudogeni nel ceppo di laboratorio di *Saccharomyces cerevisiae* S288C. I numeri alla sinistra indicano i cromosomi del lievito sui quali sono collocati i geni *FLO*; i pallini rossi rappresentano i centromeri. Ψ indica i siti dei pseudogeni *FLO* sui cromosomi. I geni *FLO* silenti e i pseudogeni sono tutti situati entro le 40 kb dai telomeri (Tel). *FLO11* non è né centromerico né telomerico (Verstrepen *et al.*, 2004).

Tutte le adesine possiedono una struttura comune costituita da tre domini (fig.5): nella porzione N-terminale (A) che protrude dalla superficie della cellula, sono presenti domini di legame per carboidrati o peptidi (Kobayashi *et al.*, 1998; Groes *et al.*, 2002; Rigden *et al.*, 2004). La porzione C-terminale (C) contiene la sequenza consenso per l'incastro del gruppo glicosil-fosfatidilinositolo (GPI-ancora), il quale è coinvolto nell'ancoraggio della proteina alla parete cellulare (Bony *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). La regione carbossi-terminale è altamente conservata tra alcuni membri della famiglia di geni *FLO* di *Saccharomyces cerevisiae* (*FLO1*, *FLO5* e *FLO9*).



**Figura 5.** La struttura modulare delle adesine comprende tre domini: A) dominio N-terminale che conferisce l'adesione; B) regione centrale ricca in residui di serina e treonina; C) dominio carbossi-terminale che contiene un sito di legame per l'ancora-GPI (Verstrepen *et al.*, 2004).

Pinna Claudia

13

Il dominio centrale dell'adesina, la cui lunghezza è estremamente variabile, è caratterizzato dalla presenza di zone ripetute ricche di serina e treonina (nel gene *FLO11* il 60% del dominio è costituito da residui di serina e treonina). Questa regione è codificata da sequenze di DNA altamente conservate che rappresentano una fonte di variabilità genetica dovuta alla elevata frequenza di ricombinazioni che si verificano in tali siti. Le adesine subiscono una serie di modificazioni post-traduzionali: si spostano dal reticolo endoplasmatico (RE) al Golgi, successivamente attraversano la membrana plasmatica per poi raggiungere la parete cellulare che rappresenta la loro destinazione finale (Bony *et al.*, 1997; Hoyer *et al.*, 1998). Nel RE, il gruppo glicosil-fosfatidilinositolo (GPI-ancora) viene legato covalentemente alla regione C-terminale della proteina; nel Golgi, i residui di mannosio vengono aggiunti ai residui di serina e treonina del dominio centrale (Udenfriend and Kodukula, 1995; Bony *et al.*, 1997). In questa sede avvengono anche le glicosilazioni sui gruppi ossidrilici di serina e treonina. Infine le adesine si legano al  $\beta$ -1,6-glucano attraverso la GPI-ancora (Lu *et al.*, 1995; Klis *et al.*, 2002). Gli ioni calcio hanno un ruolo fondamentale nel garantire la conformazione attiva dell'adesina (Stratford, 1992).

Nel ceppo di laboratorio di *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b è espresso solo il gene *FLO11* (Liu *et al.*, 1997). Tranne *FLO11*, gli altri geni *FLO* si trovano in posizione subtelomerica e sono trascrizionalmente silenti, tuttavia è stato possibile valutare le loro funzioni in un ceppo  $\Delta$ flo11 inducendone l'espressione sotto il controllo del promotore GAL1 (Guo *et al.*, 2000). I risultati ottenuti mostrano che i geni silenti controllati da *GAL1* sono funzionali. *FLO10* e *FLO11*, promuovono l'adesione all'agar e alla plastica e lo sviluppo pseudoifale. *FLO1* e, in misura inferiore, *FLO5*, *FLO9* e *FLO10*, inducono l'adesione cellula-cellula (flocculazione) (Guo *et al.*, 2000). Pertanto, l'espressione di ognuna delle proteine Flo è in grado di determinare differenti caratteristiche adesive della cellula (Lo and Dranginis, 1998; Guo *et al.*, 2000).

## I meccanismi di adesione cellulare

Sebbene tutte le adesine modulino le interazioni cellula-cellula e cellula-substrato, i meccanismi con cui si realizzano queste interazioni sono tra loro differenti. In particolare possono essere individuati due tipologie di adesione: adesione tipo-lectina (zucchero-sensibile) e adesione zucchero-indifferente. Come suggerisce il nome, nell'adesione tipo-lectina le mannoproteine del lievito riconoscono i carboidrati presenti sulla superficie di altre cellule. Il dominio di legame si trova in posizione N-terminale. L'aggiunta di alcuni carboidrati inibisce competitivamente l'adesione e fornisce una facile via per determinare la specificità delle adesine. Esempi di adesine tipo-lectina sono le proteine *Flo* implicate nella flocculazione in *Saccharomyces cerevisiae* (fatta eccezione per Flo11p), (Stratford, 1992; Guo *et al.*, 2000) e le proteine Epa del fungo patogeno *Candida glabrata* (Cormack *et al.*, 1999). I lieviti patogeni si legano ai glucosidi (N-acetil lattosammina) delle cellule di mammifero (Cormack *et al.*, 1999), mentre le cellule di *Saccharomyces cerevisiae* riconoscono gli oligomeri di mannosio sulla superficie di altre cellule, determinando così l'aggregazione (Kobayashi *et al.*, 1998). In *Saccharomyces cerevisiae*, l'adesione tipo-lectina si divide in due sottocategorie, Flo1 e NewFlo. Nel fenotipo Flo1 i recettori sono identificati fondamentalmente come branche laterali di catene esterne di  $\alpha$ -mannosio N-legati. Tale tipo di flocculazione denominata mannospecifica, è mediata dai geni *FLO1*, *FLO5* e *FLO8*, mentre vengono indicati come fenotipo newFlo quei ceppi che differiscono per lo zucchero recettore (mannosio, glucosio e oligomeri di glucosio come il maltosio) (Sato *et al.*, 2002).

La maggior parte dei ceppi impiegati nell'industria della birra appartengono al tipo NewFlo; l'inibizione competitiva ad opera di alcuni carboidrati presenti nel mezzo impedisce la flocculazione cellulare prima che tutti gli zuccheri fermentescibili vengano convertiti in etanolo.

L'adesione "zucchero-indipendente" è mediata da adesine in grado di riconoscere una proteina o un legante peptidico, o che incrementano l'idrofobicità della superficie cellulare, promuovendo le interazioni

idrofobiche cellula-superficie (Kang and Choi, 2005). In *Saccharomyces cerevisiae* ad esempio, l'adesina Flo11 altamente idrofobica, conferisce alla cellula proprietà adesive (Guo *et al.*, 2000) mentre le proteine Als del patogeno *Candida albicans*, riconoscono alcuni peptidi delle cellule ospiti (Klotz *et al.*, 2004).

### **L'adesione è indotta da vari fattori ambientali**

I geni che codificano per le adesine non sono costitutivamente espressi; la loro attivazione avviene in risposta a una serie di fattori ambientali quali ad esempio, carenza di sostanze azotate e di carboidrati, variazioni di pH o dei livelli di etanolo (Verstrepen *et al.*, 2003; Sampermans *et al.*, 2005). Il passaggio dal fenotipo non-adesivo a quello adesivo, probabilmente rappresenta un sistema di adattamento alle situazioni di stress (Verstrepen and Klis, 2006). L'attivazione di *FLO11* in condizioni di carenza di azoto, per esempio, induce l'adesione del lievito e l'invasione del substrato alla ricerca di elementi nutritivi (Kron, 1997; Gagliano *et al.*, 2002).

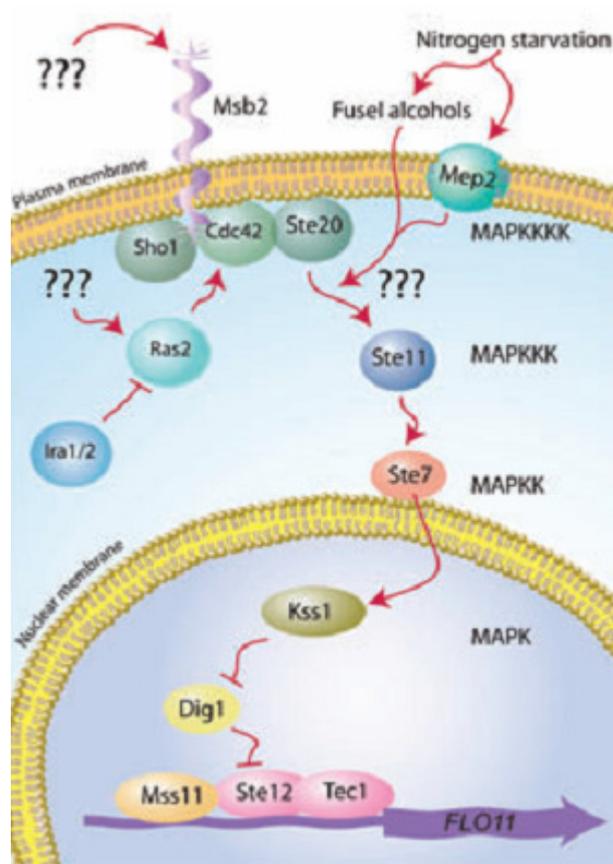
Nel fenomeno della flocculazione, dovuto all'aggregazione cellulare, le cellule che si trovano all'interno del flocculo sono protette dall'esposizione ambientale. Inoltre, i flocculi sedimentando nel mezzo o galleggiando sulla superficie, vengono trasportati passivamente e allontanati da condizioni avverse (elevate concentrazioni di etanolo e accumulo di metaboliti secondari) (Verstrepen and Klis, 2006).

L'adesione fungina, oltre a rappresentare un sistema di difesa da un ambiente ostile, ha un ruolo determinante nella patogenicità dei funghi: le adesine conferiscono un alto grado di adattabilità del fungo nelle interazioni con l'ospite. Esse, infatti, consentono di mantenere relazioni di equilibrio con l'ospite allorché il fungo si comporta come commensale, mentre offrono decisivi vantaggi a quest'ultimo quando nell'ospite vengono meno i meccanismi di difesa (Prusty *et al.*, 2004).

## **Il fenomeno di adesione è controllato da diverse vie metaboliche**

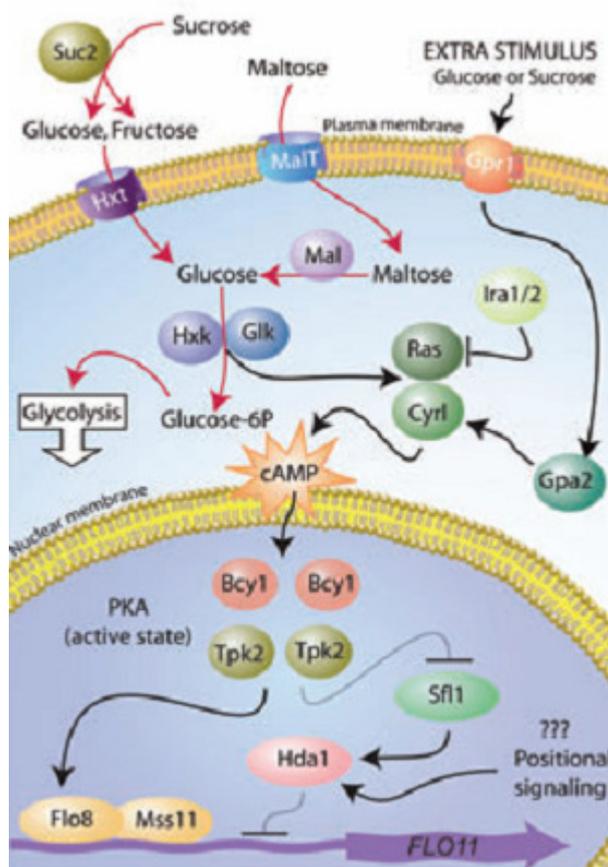
Uno degli aspetti meglio indagati dell'adesione fungina riguarda i vari segnali a cascata che traducono gli stimoli ambientali in risposte geniche. Le vie di trasduzione del segnale sono state descritte inizialmente per il gene *FLO11* di *Saccharomyces cerevisiae*, l'unico gene *FLO* attivo nel ceppo di laboratorio  $\Sigma 1278b$ . Simili meccanismi di regolazione sono stati successivamente osservati anche per gli altri geni *FLO* di *Saccharomyces cerevisiae* e nelle adesine di funghi patogeni. Infatti, recenti studi confermano che nella specie *Candida* spp., i comportamenti adesivi dovuti all'espressione dei geni *ALS* sono regolati da vie metaboliche ortologhe a quelle che regolano l'adesione in *S. cerevisiae* (Lengeler *et al.*, 2000; Liu, 2001; Kaur *et al.*, 2005; Maidan *et al.*, 2005).

L'adesione cellulare mediata da *FLO11* viene attivata in seguito all'adattamento a condizioni di stress ambientale e/o alla carenza di nutrienti. Sono stati ampiamente descritti tre segnali a cascata che regolano l'espressione di *FLO11* in risposta agli stimoli ambientali: la via metabolica Ras-cAMP, la MAPK e la via della repressione da glucosio (Madhani and Fink, 1997; Rupp *et al.*, 1999; Gagiano *et al.*, 2002; Vyas *et al.*, 2003; Schwartz and Madhani, 2004). Nelle figure 6A, 6B e 6C sono riportati gli schemi delle vie di trasduzione del segnale.



**Figura 6A. La via della MAP chinasi.** Tra le varie vie di traduzione del segnale, un ruolo predominante viene svolto dalle protein chinasi mitogeno-attivate, che comprendono tre protein chinasi agenti in serie: MAPK chinasi chinasi chinasi (MAPK4KKK, o Ste20), MAPK chinasi chinasi (MAPK3KK, o Ste11) e MAPK chinasi (MAPK2K, o Ste7) (Cooper, 1994; Marshall, 1994; Cobb and Goldsmith, 1995; Gagiano *et al.*, 2002). Quando la cascata è attivata, Ste20 fosforila Ste11, che a sua volta fosforila Ste7. La mucina Msb2 e la MAPK4KKK Ste20, due proteine a monte della MAPK, regolano lo sviluppo pseudoifale e la crescita invasiva di *S. cerevisiae*. Si ritiene che Msb2 funga da sensore a monte della pathway, ma i fattori che la attivano non sono noti. Altri segnali di attivazione del promotore di *FLO11* attraverso la MAPK comprendono la carenza di azoto (con il coinvolgimento della permeasi Mep2) e l'elevata concentrazione di alcoli come il butanolo (Lorenz *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2000; Zeitlinger *et al.*, 2003). Tali alcoli vengono prodotti in condizioni di carenza di azoto ed è possibile fungano da molecola-segnale. Il gene chiave a valle della MAPK filamentazione-invasione è *KSS1* (Cook *et al.*, 1997; Madhani *et al.*, 1997), che viene fosforilato da Ste7. Recenti studi (Andersson *et al.*, 2004) hanno evidenziato come lo *scaffold* di questa via metabolica sia Ste5, il quale attiva Kss1 generando un pool attivo di MAPK3KK (Ste11). Due promotori rappresentano i target della cascata: una sequenza a valle del trasposone Ty (Baur *et al.*, 1997; Madhani and Fink, 1997) e il promotore di *TEC1* (Madhani and Fink, 1997).

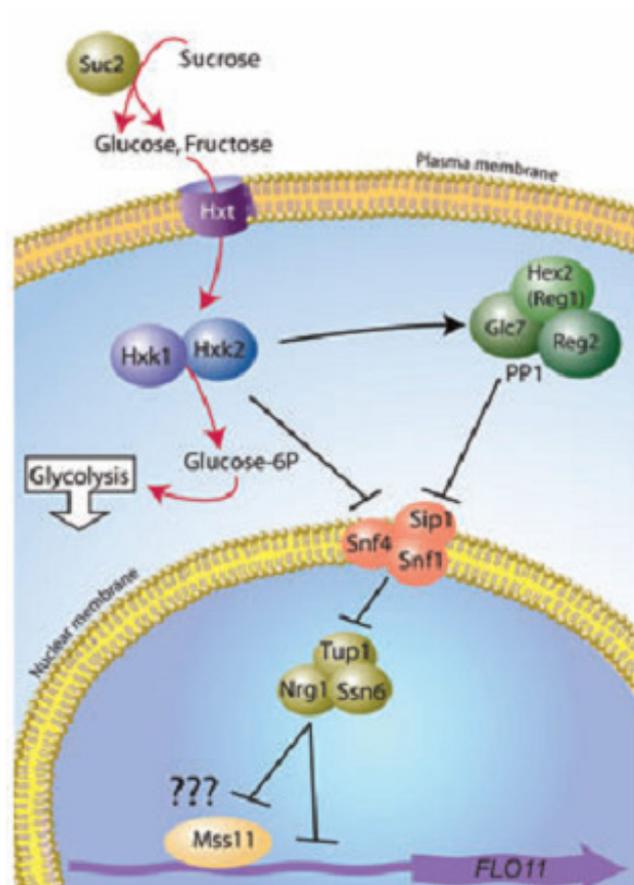
Entrambe le sequenze contengono una sequenza denominata PRE (Pheromone Response Element) (Kronstad *et al.*, 1987; Hagen *et al.*, 1991), sito di legame per il fattore di trascrizione Ste12 (Dolan *et al.*, 1989). Ste12 contiene un sito di legame aminoterminale e uno di attivazione trascrizionale carbossil-terminale. In seguito a particolari segnali, Ste7 fosforila Kss1 e questo, a sua volta, fosforila il complesso Ste12, Dig1 e Dig2. La fosforilazione di quest'ultimo porta alla dissociazione del complesso (Bardwell *et al.*, 1998), facendo sì che Ste12 possa attivare *TEC1* (Oehlen and Cross, 1998) e interagire col prodotto di questo gene: la proteina Tec1 (Bardwell *et al.*, 1998). Anche Dig1 e Dig2 interagiscono con Tec1. Ste12 e Tec1 si legano cooperativamente agli elementi FRE (Filamentous growth Response Element) (Madhani and Fink, 1997), che permettono l'attivazione trascrizionale del promotore di *FLO11* (Lo *et al.*, 1997; Madhani and Fink, 1997; Mosch and Fink, 1997; Lo and Dranginis, 1998; Mosch *et al.*, 1999; Rupp *et al.*, 1999;) attraverso segnali di attivazione a monte (Madhani and Fink, 1997; Mosch and Fink, 1997). Ste12 attiva così *FLO11* (Rupp *et al.*, 1999).



**Figura 6B. La via metabolica Ras/cAMP/PKA.** La via metabolica Ras/cAMP/PKA viene attivata in risposta alla presenza di glucosio o saccarosio nel mezzo. I targets di questa

via metabolica sono proteine chiave coinvolte nel controllo dell'accrescimento cellulare, del metabolismo del glucosio, nella resistenza agli stress, nella flocculazione e nello sviluppo pseudoifale (Gagiano *et al.*, 2002). La via metabolica è attivata da due fattori indipendenti: il primo è rappresentato dalla fosforilazione intracellulare del glucosio che comporta un aumento dell'attività dell'adenilato ciclasi Cyr1. Il secondo, da un sistema di G protein-accoppiata a un recettore costituito dal recettore Gpr1 e dalla proteina Gpa2, rileva il glucosio e il saccarosio extracellulare (Rolland *et al.*, 2000; Lemaire *et al.*, 2004). L'attivazione del complesso Gpr1/Gpa2 provoca un ulteriore incremento dell'attività di Cyr1, che comporta un temporaneo incremento di cAMP (Colombo *et al.*, 1998; Kraakman *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2000; Versele *et al.*, 2001). Successivamente, il cAMP attiva la protein chinasi A (chiamata comunemente PKA), comportando la dissociazione della subunità Bcy1 dalla subunità catalitica Tpk del PKA (Toda *et al.*, 1987a,b). Le tre diverse subunità Tpk, Tpk1, Tpk2 e Tpk3 giocano ruoli differenti nella crescita pseudoifale e nel metabolismo del ferro. Tpk2 regola negativamente i geni coinvolti nel trasporto del ferro all'interno delle cellule e positivamente quelli coinvolti nella degradazione del trialosio e nell'omeostasi dell'acqua. Tpk1 è richiesta invece per la biosintesi degli aminoacidi e sembra avere un ruolo secondario nel mantenimento dei livelli del ferro e stabilità del DNA mitocondriale (Robertson *et al.*, 1998). Per quanto riguarda la crescita pseudoifale, mentre Tpk3 la inibisce, Tpk1 sembra non avere nessun ruolo nello sviluppo di pseudoife (Robertson and Fink, 1998) e Tpk2 è invece attivatrice del processo (Robertson and Fink, 1998).

Una volta rilasciata dalla subunità Bcy1, la chinasi Tpk2 inattiva Sfl1 (soppressore della flocculazione) e attiva il fattore di trascrizione Flo8 (Gagiano *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; van Dyk *et al.*, 2005). Sfl1 agisce col complesso della RNA polimerasi II, reprimendo l'espressione genica (Song and Carlson, 1998). Tpk2, invece, inibisce Sfl1 ed in questo modo *FLO11* può essere espresso (Robertson and Fink, 1998). *FLO8* codifica per il fattore di trascrizione Flo8, che agisce a valle della PKA, promuovendo l'espressione di *FLO11* e la crescita filamentosa (Pan and Heitman, 2002).



**Figura 6C. La principale pathway di inibizione da glucosio.** I trasportatori (Hxt) captano il glucosio presente nel mezzo. Una volta raggiunto l'interno della cellula, il glucosio viene fosforilato a glucosio 6-fosfato da una delle esochinasi (Hxk). Questo processo di fosforilazione e/o di esaurimento di AMP dovuto all'aumento di produzione di ATP, inattiva la proteina-chinasi Snf1 (Wilson *et al.*, 1996). A seguito dell'inattivazione di Snf1, le proteine Mig1 e Nrg1 si legano al promotore di *FLO11*, attivando così i repressori Tup1 e Ssn6, che provocano la repressione di *FLO11*. Snf1 viene attivato da un aumento dei livelli di glucosio. Successivamente Snf1 fosforila Mig1, che trasloca dal nucleo al citoplasma, perdendo così l'effetto di repressione della trascrizione di *FLO11* (Gancedo, 1998; Winderickx *et al.*, 2003).

Una quarta via metabolica, chiamata TOR (Target of Rapamycin), è stata recentemente implicata nella regolazione di *FLO11*. Si ritiene che la sua attivazione sia conseguente alla carenza di fonti azotate, ma il meccanismo non è stato studiato dettagliatamente (Cutler *et al.*, 2001).

Una quinta (parziale) via di regolazione coinvolge i fattori di trascrizione Sok2, Phd1 e Ash1, i quali sembrano funzionare in maniera congiunta (Gimeno and Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995; Pan and Heitman, 2000). Screening genetici condotti su larga scala hanno mostrato il coinvolgimento di numerosi geni nel fenomeno dell'adesione fungina. Alcuni di questi geni non sono direttamente correlati con l'adesione ma la influenzano in via indiretta.

Mentre le vie di trasduzione del segnale che regolano l'adesione sono state ben caratterizzate, sono scarse le conoscenze relative ai recettori che attivano i vari segnali a cascata. È comunque chiaro che questi sensori agiscono in risposta a stimoli che attivano il processo di adesione, come la carenza di nutrienti, stress o la vicinanza a siti facilmente colonizzabili. Recentemente, è stato dimostrato che la proteina transmembrana tipo-mucina Msb2, è un recettore posto a monte della via metabolica della MAPK ed è implicata nelle risposte a condizioni di stress ambientale (Cullen *et al.*, 2004). Anche Mep2, una ammonio-permeasi, è un recettore situato a monte della MAPK e viene attivata in situazioni di carenza di azoto (Gagiano *et al.*, 1999) (fig. 6A). Altri autori riportano che l'attivazione di *FLO11* conseguente alla carenza di azoto, è mediata dalla via metabolica MAPK-indipendente, nella quale sono interessati due regolatori del metabolismo dell'azoto già noti, Gcn2 e Gcn4 (Braus *et al.*, 2003). Questa via coinvolge Flo8, indicando l'esistenza di una interazione con la via cAMP/PKA (fig. 6B). In *Candida albicans*, a seguito del contatto con una superficie, viene attivata la proteina Mkc1 (che appartiene alla famiglia di serina-treonina chinasi MAPK), la quale induce l'adesione e la formazione di biofilm (Kumamoto, 2005). Mkc1 consente così alla cellula di interagire con l'ospite e di determinare se le condizioni sono ottimali per l'insediamento del biofilm. Questo meccanismo possiede interessanti similitudini con il fenomeno noto come 'inibizione da contatto' che regola la moltiplicazione cellulare e il comportamento negli organismi multicellulari (Kumamoto, 2005). Sebbene siano noti i recettori e i segnali a cascata che agiscono in risposta a determinati fattori ambientali, il quadro complessivo

appare poco chiaro. Ad esempio, l'adesione è indotta in condizioni limitanti di glucosio (Sampermans *et al.*, 2005). Ciò trova una spiegazione attraverso la via di repressione del glucosio, che reprime *FLO11* fintanto che è disponibile nel terreno di coltura (fig. 6C). Tuttavia, la via Ras/cAMP/PKA richiede glucosio o saccarosio per l'attivazione (Fig. 6B). Pertanto, semplificando i modelli, il glucosio reprime l'adesione attraverso la via metabolica che coinvolge *SNF1*, mentre è richiesto per l'induzione dei geni *FLO* tramite l'attivazione della via metabolica Ras/cAMP/PKA. Diventa perciò chiaro che i modelli metabolici proposti sono semplicistici e non devono essere considerati come entità indipendenti, ma come un sistema integrato che regola l'adesione cellulare (Gagiano *et al.*, 2002; Pan and Heitman, 2002; Schwartz and Madhani, 2004). La proteina Ras, ad esempio, attiva le vie Ras/cAMP/PKA e MAPK. Un altro componente in comune tra i vari segnali a cascata è rappresentato da Mss11. Questa proteina si comporta come regolatore-chiave, che controlla gli input di tutte le vie metaboliche (van Dyk *et al.*, 2005).

## **Il controllo epigenetico dell'adesione**

I geni che codificano per le adesine, oltre ai vari segnali a cascata che ne regolano l'espressione, sono soggetti a un controllo epigenetico (Frieman and Cormack, 2004; Halme *et al.*, 2004). In una popolazione omogenea di *Saccharomyces cerevisiae* coesistono sia cellule nelle quali *FLO11* è trascritto sia cellule nelle quali il gene è silente. Lo stato di espressione di *FLO11* è metastabile e viene normalmente ereditato per diverse generazioni; è inoltre reversibile e le cellule possono "accendere" o "spegnere" il gene. Le cellule diploidi ad esempio sono in grado di formare filamenti in condizioni di carenza d'azoto, ma la risposta è comunque eterogenea: alcune cellule iniziano il processo di filamentazione, mentre altre adiacenti continuano a esistere nella loro forma tipo-lievito (Halme *et al.*, 2004). Il silenziamento è sia promotore specifico che posizione genomico-dipendente; infatti, la sostituzione del promotore di *FLO11* con

un altro promotore o la ricollocazione del gene su un altro cromosoma, elimina la regolazione epigenetica.

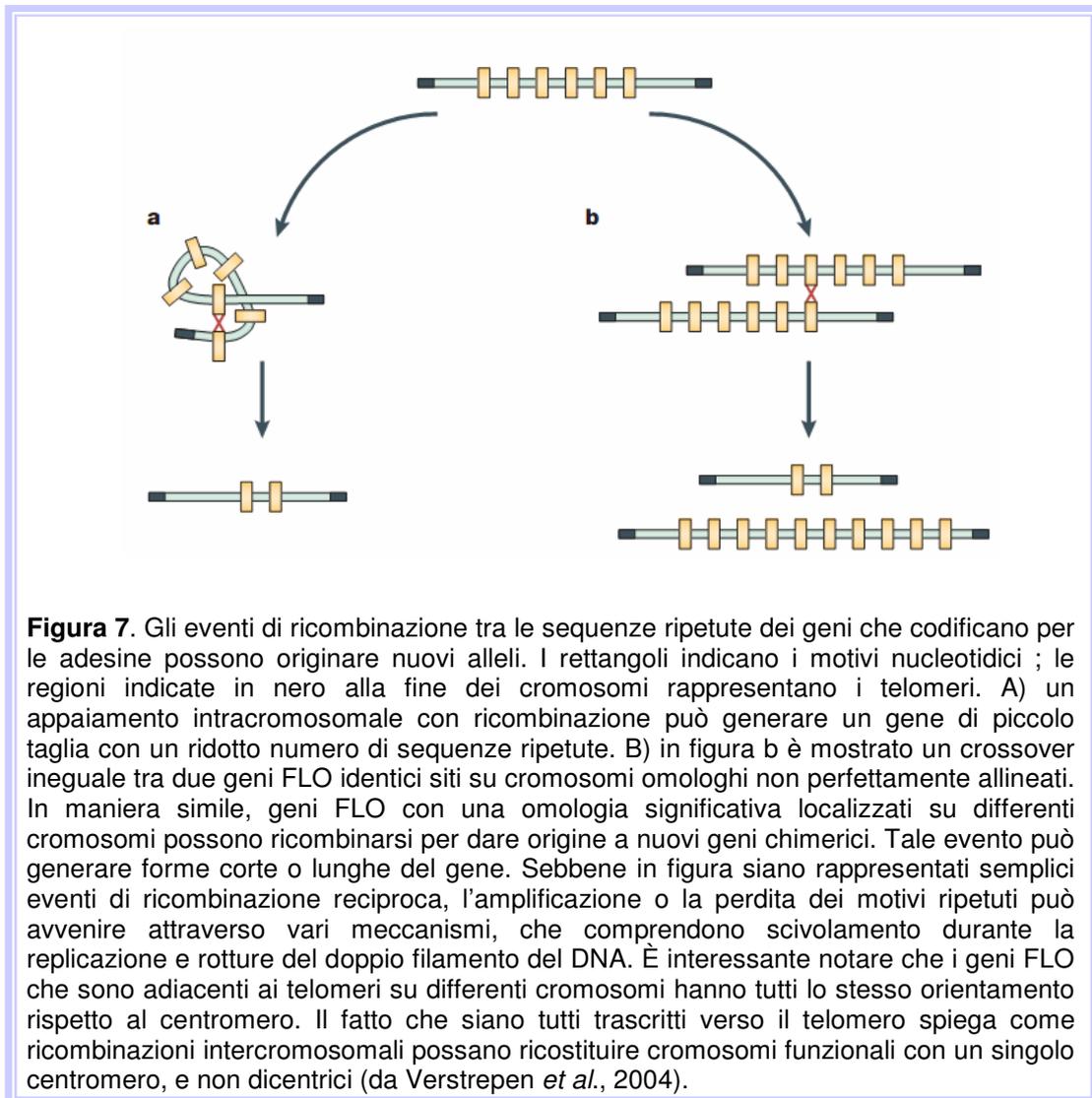
Il passaggio da una forma attiva a una repressa è sotto la regolazione delle proteine Hda1 (deacetilasi istonica) e Sfl1 (repressore della trascrizione). In *S. cerevisiae* il controllo epigenetico è stato osservato anche per il gene *FLO10* (Halme *et al.*, 2004). A differenza di *FLO11*, però, il silenziamento di *FLO10* non dipende da Hda1 ma dalle deacetilasi istoniche Hst1 e Hst2 e dal regolatore del silenziamento telomerico Sir3.

Il silenziamento epigenetico delle adesine può avere molteplici scopi. In una popolazione microbica, il silenziamento genico mantiene l'equilibrio tra cellule che aderiscono al substrato colonizzandolo, e cellule non adese che possono raggiungere nuovi siti da colonizzare. Il sistema di "switching" rappresenta un meccanismo con il quale le cellule anticipano le mutevoli condizioni ambientali (Kussell and Leibler, 2005).

Inoltre, i cambiamenti morfologici della superficie cellulare legati alla capacità di modulare l'espressione delle adesine, permettono al lievito di aderire in maniera specifica alle superfici. Infine, nei funghi patogeni, il notevole repertorio di adesine, può essere differenzialmente espresso a seconda della morfologia del fungo e ciò rappresenta un sistema di resistenza alla risposta immunitaria dell'ospite (Verstrepen and Klis, 2006).

## **Gli eventi di ricombinazione originano nuove adesine**

Sebbene i lieviti posseggano un numero limitato di geni che codificano adesine la variabilità delle adesine isolate da ceppi strettamente correlati è spesso molto ampia. Questa variabilità genetica ha come conseguenza una marcata differenziazione dei fenotipi adesivi tra i diversi ceppi e specie (Verstrepen *et al.*, 2003). Recenti ricerche hanno dimostrato che le sequenze di DNA altamente ripetute presenti nella porzione centrale dei geni che codificano per le adesine, costituiscono la base per la formazione di nuove adesine (Verstrepen *et al.*, 2004a; 2005).



A causa della ripetitività e dell'elevata similarità di sequenza, le unità ripetute sono sede di frequenti eventi di ricombinazione durante la replicazione del DNA (fig. 7). La rimozione o l'aggiunta di unità ripetute comporta, rispettivamente, una contrazione o una espansione del gene. Lunghe adesine, generalmente conferiscono grande aderenza, mentre adesine di piccola taglia comportano una diminuzione dell'adesione, probabilmente perchè il dominio N-terminale rimane incluso nella parete cellulare (Frieman *et al.*, 2002; Verstrepen *et al.*, 2005). In maniera non

dissimile dalla regolazione epigenetica, questo meccanismo permette ai lieviti di generare variabilità all'interno della popolazione e di regolare il proprio comportamento adesivo in funzione dell'ambiente circostante. Inoltre, gli eventi di ricombinazione tra le sequenze ripetute di geni diversi possono generare forme chimeriche del gene, con proprietà adesive differenti (Verstrepen *et al.*, 2005). Per i funghi patogeni come *C. albicans* e *C. glabrata*, le frequenti ricombinazioni a carico dei geni che codificano per le proteine di parete, rappresentano un ulteriore sistema che permette di creare una variabilità della superficie cellulare (Verstrepen *et al.*, 2004a; 2005).

## **Adesine e biofilm**

In questi ultimi anni si è assistito ad una notevole recrudescenza di manifestazioni morbose indotte da lieviti del genere *Candida* e ciò, in particolare, nel contesto di ambienti ospedalieri, soprattutto, per cause strettamente correlate con le condizioni immunitarie dei ricoverati (Wenzel and Pfaller, 1991; Li and Palecek, 2003).

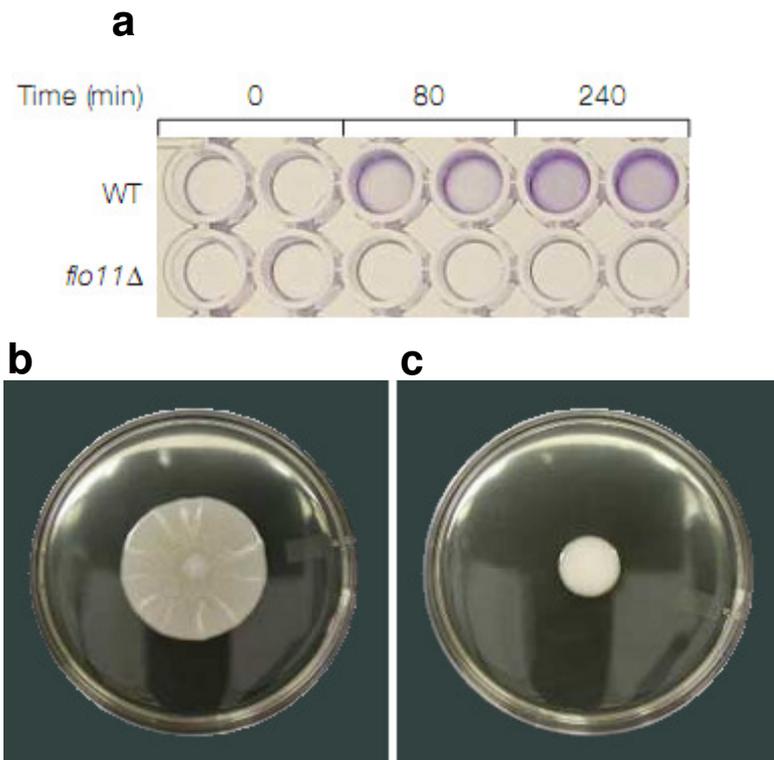
Le proprietà adesive espresse dai lieviti trovano riscontro in strutture di superficie coinvolte in processi di adesività e di invasività, suggerendo il loro ruolo fondamentale nei processi infettivi. Le candidasi sono normalmente associate ad impianti medici, come ad esempio i cateteri che rappresentano un veicolo per l'invasione del fungo (Eggimann and Pittet, 2002; Hawser and Douglas, 1994). Considerato l'elevato tasso di mortalità (41%) e l'incremento della degenza media ospedaliera associato alle infezioni sistemiche da *Candida spp.*, le adesine rappresentano un punto cruciale della medicina moderna (Nguyen *et al.*, 1995).

Sono stati impiegati diversi approcci sperimentali per valutare le proprietà adesive dei funghi nei confronti di alcune superfici plastiche. Chandra *et al.*, (2001) hanno dimostrato come in *Candida albicans*, i geni *ALS1* siano sovraespressi quando le cellule aderiscono a materiali plastici tipo polivinilcloruro o poliuretano rispetto a cellule sviluppatesi in assenza di

tali superfici. La proteina Eap1 è stata identificata facendo esprimere geni di *Candida* in mutanti non adesivi di *Saccharomyces cerevisiae* (Li and Palecek, 2003). Questa adesina di *Candida albicans*, presenta alcune omologie con la flocculina Flo1 di *Saccharomyces cerevisiae* (Li and Palecek, 2003). Le proprietà dei ceppi mutanti di *Saccharomyces cerevisiae* che esprimono *EAP1* sono estremamente informative: infatti, oltre a conferire la capacità di aderire alla plastica, il gene *EAP1* ripristina la crescita invasiva e lo sviluppo pseudoifale. Tale risultato indica che *EAP1* è coinvolto nei meccanismi di patogenicità di *Candida albicans*.

Sebbene non esista una definizione di biofilm universalmente accettata, vari autori hanno tentato di fornire una descrizione per distinguere questa modalità di associazione cellulare rispetto ad altre forme di crescita batteriche. Tra le definizioni proposte si ricordano: "...comunità di microorganismi adesi a una superficie" (O'Toole *et al.*, 2000) ; "...insieme di microbi che sono adesi ad una superficie (Davey and O'Toole, 2000); e "...popolazione microbica avvolta da una matrice adesiva e protettiva" (Darby *et al.*, 2002). Considerata l'estrema diversità microbica, nessuna di queste definizioni è comune a tutte le strutture descritte come biofilm. Ad esempio, il biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* è composto da cellule sospese in arginato esopolisaccaridico (Wingender *et al.*, 2001). Il batterio *Mycobacterium smegmatis* invece non produce matrice extracellulare, ma forma un film sia su agar a bassa concentrazione, che su polivinilcloruro (PVC) (Martinez *et al.*, 1999); queste proprietà dipendono dai glicopeptidolipidi della capsula, e non dalla secrezione di molecole.

In *S. cerevisiae* il gene *FLO11*, è fondamentale sia per la formazione di biofilm su plastica e agar semisolido (Reynolds and Fink, 2001) (fig. 8), sia per lo sviluppo del biofilm su superficie liquida (Ishigami *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005, Fidalgo *et al.*, 2006) (fig. 9).



**Figura 8. Il gene *FLO11* è fondamentale per l'adesione alla plastica e per la formazione del mat cellulare.** **a)** Cellule wild-type (WT) e mutanti  $\Delta flo11$  sono stati incubati per 0, 80 e 240 minuti in microtiter di polistirene. Le cellule sono state colorate con cristal violetto; i pozzetti sono poi stati lavati per allontanare le cellule non aderenti. Il test mostra che le cellule WT aderiscono alla plastica mentre le cellule  $\Delta flo11$  no. **b)** Formazione del film su piastra con 0,3% di agar: gli individui WT si differenziano morfologicamente e originano una struttura chiamata mat. **c)** Le cellule con *FLO11* deleta sono incapaci di formare il mat (da Verstrepen *et al.*, 2004).



**Figura 9.** Biofilm formato da un ceppo flor di *Sacch. cerevisiae* su terreno di florizzazione.

Reynolds and Fink (2001) hanno effettuato le delezioni dei geni *FLO11* e *FLO8*, fattore di trascrizione che regola l'espressione di *FLO11* nel ceppo  $\Sigma 1278b$ . Questi mutanti mostrano una scarsa adesione alle superfici di polistirene, anche a basse concentrazioni di glucosio. Il ruolo di Flo11 nell'adesione di *S. cerevisiae* alla plastica potrebbe essere simile a quello dei glicopeptidolipidi (GPLs) espressi sulla superficie cellulare di *Mycobacterium smegmatis*, un batterio non flagellato, dotato di motilità di superficie chiamata *sliding motility*.

I mutanti *flo11* inoltre presentano una minore idrofobicità rispetto al wild type. Questa diversa idrofobicità potrebbe ridurre le interazioni tra le cellule con la superficie acquosa e favorire il movimento delle cellule lungo la piastra Petri nella formazione di *mat* su superfici a bassa concentrazione di agar (Reynolds and Fink, 2001).

## **La matrice extracellulare**

Un biofilm è un aggregato di cellule microbiche associate ad una superficie e normalmente incluse in una matrice polimerica extracellulare da esse prodotta (Davey and O'Toole, 2000).

L'inizio della formazione del biofilm è caratterizzato dall'interazione della cellula con la superficie. Una volta che la cellula ha aderito alla superficie, il biofilm comincia a maturare con la produzione di una matrice extracellulare che generalmente contribuisce all'architettura della comunità. Malgrado la presenza della matrice extracellulare sia universale, essa è molto varia sia nella composizione sia nei tempi di sintesi (Davey and O'Toole, 2000).

Le caratteristiche più importanti della matrice sono correlate alla composizione e alla struttura del polisaccaride che determinano la conformazione primaria del biofilm. Infatti, la quantità di EPS (extracellular polymeric substances) varia a seconda dell'organismo e aumenta all'aumentare dell'età del biofilm (Davey and O'Toole, 2000; Varon and Choder, 2000; Branda *et al.*, 2005). L'EPS contribuisce anche a conferire

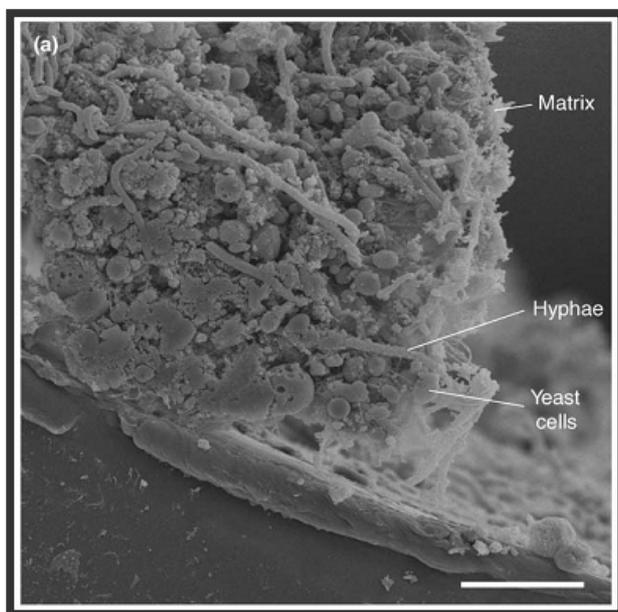
resistenza agli antibiotici impedendo il passaggio dell'antibiotico stesso e quindi la penetrazione nelle cellule batteriche (Donlan, 2002).

La matrice è un ambiente dinamico dove possono accumularsi nutrienti e dove le cellule microbiche mantengono il giusto grado di omeostasi. Essa mostra un alto grado di eterogeneità, infatti al suo interno possono coesistere diversi microambienti. La natura della matrice polimerica, oltre ad essere correlata alle strutture esopolisaccaridiche, dipende anche da diversi fattori estrinseci, come le proprietà chimico-fisiche dell'ambiente dove il biofilm è localizzato, e da fattori intrinseci, come il genotipo delle cellule che lo compongono (Davey and O'Toole, 2000).

Ne consegue che la struttura della matrice del biofilm può variare a seconda dello stato fisiologico delle cellule, della disponibilità di nutrienti, dell'ambiente in cui si forma, e delle specie microbiche che lo compongono (Sutherland, 2001).

Nei batteri, la matrice è formata da un insieme di microcolonie composte da cellule e polimeri extracellulari (polisaccaridi, glicoproteine e proteine), attraversate da una miriade di piccoli canali che permettono il passaggio dell'acqua (Davey and O'Toole, 2000). I polisaccaridi batterici extracellulari sono composti da omo ed eteropolisaccaridi tra i componenti dei quali figurano il glucosio, il fucosio, il mannosio, il galattosio, il fruttosio, il piruvato, l'acido mannuronico e complessi acido-base dell'acido glucuronico. I diversi tipi di legame tra i saccaridi costituiscono alcuni polisaccaridi tra cui i levani, i polimannani, i destrani, la cellulosa, l'amilopectina, il glicogeno e l'alginato. I tipi di legame che si formano tra queste catene polisaccaridiche portano alla formazione di una struttura molto complessa e molto stabile, estremamente resistente a quasi tutti gli agenti fisico-chimici utilizzati sia in campo medico-chirurgico che in condizioni sperimentali. A seconda delle specie coinvolte, le microcolonie possono essere formate per circa il 25% di cellule e per il restante 75% di matrice (Donlan, 2002).

Le proprietà di superficie delle cellule di lievito sono fondamentali nella formazione delle comunità multicellulari e nella loro interazione con l'ambiente. Il lievito patogeno opportunistico *Candida albicans*, è il maggior agente eziologico di infezioni micotiche nosocomiali gravi in soggetti immunosoppressi (Wenzel and Pfaller, 1991; Li and Palecek, 2003). *Candida albicans* è un fungo patogeno dimorfico, che può esistere in due forme morfologiche, micelio o pseudomicelio, oppure come lievito a forma rotondeggiante. La transizione è indotta dal cambiamento di condizioni ambientali, quali pH, temperatura, presenza di prolina o N-acetilglucosamina (Ryley and Ryley, 1990; Cutler, 1991; Odds, 1994). La transizione dalla forma rotondeggiante a quella ifale sembra contribuire alla patogenicità di questo microrganismo, oltre ad influire sullo sviluppo di biofilm (Ryley and Ryley, 1990; Cutler, 1991; Odds, 1994; Baillie and Douglas, 1999). Il biofilm formato da *Candida albicans* è composto da cellule lievitiformenti, ife e pseudoife e materiale extracellulare (Nobile and Mitchell, 2006) (fig. 10).

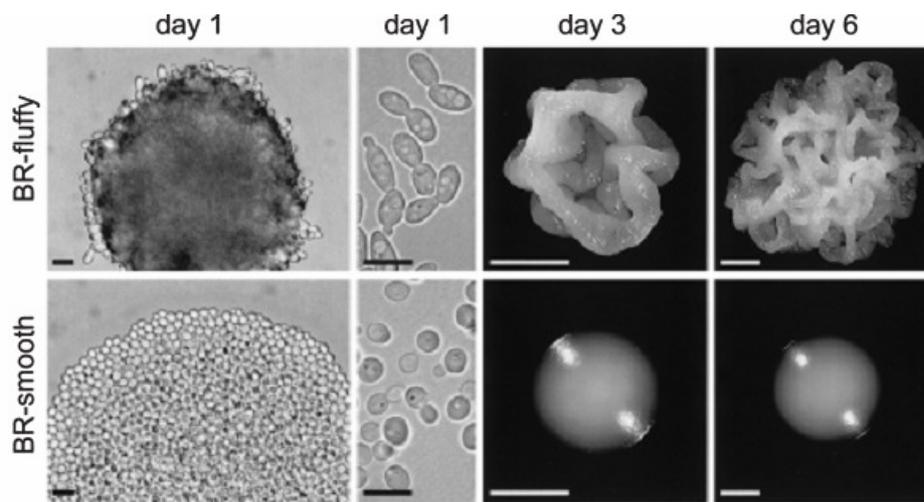


**Figura 10** . Microfotografia del biofilm di *C. albicans* formato all'interno di un catetere vascolare. Sezione del biofilm. Cellule lievitiformenti e filamentose rivestite dalla matrice (da Nett and Andes, 2006).

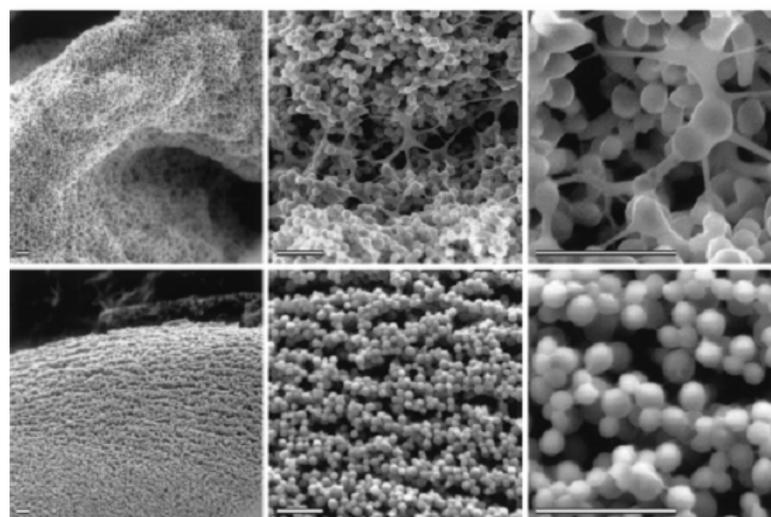
La sintesi della matrice che avviene durante la formazione del biofilm di *C. albicans*, è in funzione delle condizioni di incubazione: in condizioni

statiche la produzione di EPS è minima, mentre aumenta considerevolmente quando il biofilm si sviluppa in terreno liquido in movimento (Baillie and Douglas, 2000).

In un recente lavoro, Kuthan *et al.*, (2003), osservando l'ultrastruttura delle colonie sviluppate su terreno agarizzato di alcuni ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* (fig.11), hanno scoperto la presenza di materiale extracellulare (fig. 12).



**Figura 11.** Confronto delle colonie fluffly e smooth cresciute su terreno GMA. Morfologia e taglia delle colonie al 1°, 3° e 5° giorno di sviluppo. Aspetto delle cellule delle colonie fluffly e smooth al 1°giorno. Scala: barra nera 10 mm, barra bianca 1 mm (da Kuthan *et al.*, 2003).



**Figura 12.** Ultrastruttura delle colonie fluffly e smooth dopo 7 giorni di sviluppo su terreno GMA. Aspetto della superficie delle colonie osservate con il microscopio a scansione ambientale, usando un protocollo che preserva il materiale extracellulare. Scala: 20 mm (da Kuthan *et al.*, 2003).

La presenza di filamenti intercellulari nelle colonie giovani indica che la produzione di ECM che riveste e connette le cellule, non è una conseguenza dell'invecchiamento della colonia come invece è stato osservato da Varon and Choder (2000). Tale struttura osservata nelle colonie fluffy sembra essere importante per distanziare le cellule e proteggere l'intera colonia contro le avversità dell'ambiente. Questo fenomeno è stato osservato in vari ceppi di *S. cerevisiae* indipendentemente dall'ambiente di isolamento. Kuthan *et al.*, (2003), dopo aver osservato la sovraespressione del gene *FLO11* nelle cellule delle colonie fluffy, hanno ipotizzato il coinvolgimento di Flo11p nel legame tra le cellule e materiale extracellulare e un suo ruolo attivo nel determinare la struttura della colonia.

Le informazioni circa la composizione chimica della matrice di *S. cerevisiae* sono invece scarse: la sua resistenza alle endoglicosidasi rende l'analisi di spettrometria di massa difficoltosa (Kuthan *et al.*, 2003). Come per le glicoproteine di superficie dei batteri la resistenza della matrice alle endoglicosidasi indica l'esistenza di catene di carboidrati che formano la componente extracellulare nelle colonie "fluffy" di lievito.

## **Il gene *FLO11***

La regolazione del gene *FLO11* di *Saccharomyces cerevisiae* può essere utilizzata come modello per la comprensione di come il controllo dell'espressione genica, da parte di diversi segnali, influenzi processi fisiologici complessi (Pan and Heitman, 2002). Il gene *FLO11*, la cui ORF copre una regione di 4104 bp, è localizzato a circa 46 kb dal telomero destro del cromosoma IX. E' stato anche chiamato col nome di *MUC1*, data la sua omologia con la mucina intestinale umana *MUC2* (Gum *et al.*, 1992). Il gene codifica per Flo11, una glicoproteina di superficie contenente glicosil-fosfatidilinositolo, che permette l'adesione tra cellula

madre e figlia, l'adesione tra cellule in generale e la capacità di invadere i substrati (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo and Dranginis, 1998). La sua espressione è essenziale per processi che includono transizioni dimorfiche nello sviluppo del lievito, quali l'adesione a superfici di agar con concentrazioni inferiori alle standard (0.3% anziché 2%) e superfici plastiche, la mobilità di superficie (*sliding motility*), la crescita invasiva e pseudoifale e la formazione di biofilm su superficie liquida (Lo and Dranginis, 1998; Gagiano *et al.*, 1999; Reynolds and Fink, 2001, Zara *et al.*, 2005). L'attivazione del gene *FLO11* può avvenire attraverso diverse vie metaboliche, quali la via della MAP chinasi (chiamata semplicemente MAPK), la via della protein-chinasi A (PKA) e la via mediata dallo cAMP, che coinvolge il gene *SNF1*, in condizioni di carenza di glucosio.

*Candida albicans* contiene un gene, *EAP1*, che codifica per un'adesina di superficie, contenente anch'essa un sito di ancoraggio costituito da glicosilfosfatidilinositolo, omologa quindi a Flo11 e ad altre proteine di membrana di lievito. Si è visto come l'espressione di Eap1 in mutanti di *S. cerevisiae flo8* e *flo11* sia in grado di reinstaurare la crescita invasiva negli aploidi e la crescita pseudoifale nei diplodi. L'espressione della suddetta proteina è regolata dal fattore di trascrizione Efg1; ciò suggerisce che l'espressione di *EAP1* può essere attivata dalla via metabolica della protein-chinasi cAMP-dipendente (Li and Palecek, 2003). Il gene *FLO11* di *S. cerevisiae* permette di identificare una somiglianza di *S. cerevisiae* con *Candida albicans* e sottolinea come lo studio sui biofilm di *S. cerevisiae* fondi le basi per una maggiore comprensione dei fenomeni di adesione di *Candida*.

## La proteina Flo11p

Il prodotto genico di *FLO11* è una idrolasi, appartenente alla classe delle proteine di lievito ancorate alla parete cellulare tramite il gruppo glicosilfosfatidil-inositolo (GPI) e ricche in serina e treonina. Comprende un dominio aminoterminale contenente una sequenza segnale idrofobica e un dominio carbossiterminale che presenta zone omologhe alle proteine

aventi gruppi GPI-ancora, separati da un dominio centrale contenente sequenze altamente ripetute, ricche in serina e treonina. La presenza di questi tre domini e in particolare le caratteristiche del dominio centrale, rendono Flo11p simile alle flocculine Flo1p, Flo5p, Flo10p, Flo1p (Teunissen *et al.*, 1993). Inoltre, la sequenza carbossiterminale è simile a quella di altre proteine di lievito ancorate alla parete cellulare, come le  $\alpha$ -agglutinine (Roy *et al.*, 1991), la proteina Gas1p/GGp1p (Nuoffer *et al.*, 1991; Vai *et al.*, 1991) e la proteina Kre1p (Boone *et al.*, 1990). La proteina prodotta da *FLO11* è 37% simile a Flo1p (26% identica), ed è 36% simile (24% identica) alla mucina intestinale umana (*MUC2*) (Gum *et al.*, 1992).

Studiando la ripartizione di ceppi wild-type *FLO11* e di ceppi mutanti  $\Delta$ flo11 in fase acquosa ed in ottano, è stato possibile verificare che solo il 12% dei ceppi *FLO11* si ripartisce in fase acquosa, contro il 91% dei ceppi  $\Delta$ flo11. Ciò ha dimostrato che Flo11p è molto idrofobica (Reynolds e Fink, 2001).

## **Il promotore di *FLO11***

La regione non codificante di *FLO11*, posta a monte della sequenza di inizio della regione codificante ATG e in corrispondenza dell'estremità 5' del gene, comprende 3.600 bp. Di questa, solo una parte è implicata nel controllo dell'attività del gene. Il promotore del gene *FLO11* è costituito da 2.800 bp, ed è uno fra i più grandi e complessi che ci siano nel genoma di lievito (Lo and Dranginis, 1996). *FLO11* infatti, come altri geni quali *HO* e *IME1*, è un gene chiave dei processi che accompagnano lo sviluppo cellulare e come tale, è regolato da segnali di diversa natura.

Contiene almeno quattro sequenze di attivazione e nove domini di repressione (Rupp *et al.*, 1999). Sono indicate con URS (Upstream repression site) le sequenze del promotore la cui delezione comporta un incremento nell'espressione di *FLO11* di almeno 3 volte rispetto al wild-type, mentre con UAS (Upstream activation site) si indicano le sequenze la cui delezione comporta la riduzione dell'espressione di *FLO11* del 30%

rispetto al wild-type. Molte di queste regioni di regolazione rappresentano il target della via metabolica MAPK, della cascata dell'AMP-ciclico, e della via di traduzione del segnale controllata da Gnc4p (Pan and Heitman, 1999; Rupp *et al.*, 1999; Braus *et al.*, 2003; Barrales *et al.*, 2008).

I lieviti flor, appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, sono responsabili della fermentazione e dell'affinamento biologico di alcuni vini speciali tipo *Sherry*. L'effetto di questi lieviti sul vino è legato non solo ai prodotti della fermentazione, ma anche alle trasformazioni da essi promosse nel corso della maturazione e dell'affinamento. Ne consegue che uno starter per la produzione di un vino florizzato tipo-*Sherry* deve possedere caratteri peculiari che lo distinguano dai normali starter enologici. In particolare, oltre a fermentare e produrre etanolo deve florizzare velocemente evitando inquinamenti del velo da parte di altri microrganismi e "marcare" aromaticamente il vino.

Considerate tali premesse, il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato valutare i caratteri tecnologici di una popolazione di lieviti flor autoctoni per selezionare ceppi da utilizzare come starter di fermentazione e affinamento di vini Vernaccia, Malvasia e Arvisionadu.

Il secondo obiettivo è stato quello di approfondire le conoscenze riguardanti il ruolo del gene *FLO11* nella formazione del biofilm. A tale scopo si è proceduto inizialmente con uno studio approfondito del polimorfismo di lunghezza di questo gene.

Successivamente con lo scopo di comprendere la relazione tra polimorfismo di lunghezza di *FLO11* e fenotipo flor, si è proceduto con l'analisi di espressione di *FLO11* in cinque ceppi flor, caratterizzati da alleli *FLO11* di taglia differente, e con l'analisi fenotipica di ceppi isogenici che si differenziassero per l'espressione di tre di questi alleli.

Infine per meglio comprendere i meccanismi di regolazione del gene *FLO11*, è stata svolta l'analisi delle sequenze del promotore.

## Materiale biologico

### Lieviti e batteri

I ceppi di lievito flor utilizzati in questo lavoro sono depositati nella collezione del DISAABA (Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Università degli Studi di Sassari), e sono elencati in tabella 1. Tali ceppi sono stati isolati direttamente dal velo di vini florizzati Vernaccia di Oristano (V), Malvasia di Bosa (M) ed Arvisionadu di Benetutti (A).

**Tabella 1** Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* flor utilizzati nelle prove di selezione

AREA DI ISOLAMENTO	CEPPI
<b>Vernaccia</b>	
Cabras	V3 V5 V9 V11 V14 V16
Zeddiani	V19 V22 V23 V27 V30
Narbolia	V42 V44 V45 V48 V53
Nurachi	V83 V90
Baratili	V56 V59 V63 V66 V69 V72
Riola Sardo	V75 V80
San Vero Milis	V91 V95 V99
<b>Malvasia</b>	
Bosa	M3 M4 M8 M12 M19 M23 M25 M26 M38 M39 M45 M46 M49
Magomadas	M66
Tresnuraghes	M83 M85
<b>Arvisionadu</b>	
Benetutti	A9 A43 A28 A58 A68 A56 A33 A51 A12 A18 A41 A77 A22

I ceppi **CBS1171** (*Saccharomyces cerevisiae*), **CBS380** e **CBS395** (*Saccharomyces bayanus*) e **S288c**, utilizzati come ceppi di riferimento nel lavoro di caratterizzazione tecnologica e molecolare sono stati acquistati presso il Centraalburau voor Schimmelcultures (<http://www.cbs.knaw.nl>).

Il ceppo **BY4742** (*MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 –EUROSCARF*) è stato utilizzato per lo studio dei fenotipi legati all'espressione del gene *FLO11*; deriva dal ceppo S288c (*MAT $\alpha$  SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1*) e, come S288c, presenta una mutazione a carico del gene *FLO8*,

principale attivatore trascrizionale di *FLO11* (Liu *et al.*, 1996). Tutti i lieviti vengono conservati in terreno YEPGLY a  $-80^{\circ}\text{C}$  e mantenuti su piastre di YEPD.

Le cellule elettrocompetenti di *Escherichia coli* (F' (*lacI<sup>q</sup>* Tn10 (Tet<sup>R</sup>) *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*), utilizzate per il clonaggio genico, sono state fornite con il kit pYES2.1 TOPO TA Expression (Invitrogen).

## Terreni colturali

YEPD liquido: Estratto di lievito 1%, peptone 2%, glucosio 2%, ddH<sub>2</sub>O.

YEPD agarizzato: Estratto di lievito 1%, peptone 2%, glucosio 2%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O.

YEPGLY: Estratto di lievito 1%, peptone 2%, glucosio 2%, glicerolo 3%, ddH<sub>2</sub>O.

YEPD + G418: Estratto di lievito 1%, peptone 2%, glucosio 2%, G418 (geneticina SIGMA) 0,2 gr/l, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O.

WL (*Wallerstein Laboratoty Nutrient Agar*, OXOID): Estratto di lievito 0,4%, caseina 0,5%, destrosio 5%, fosfato monopotassio 0,055%, cloruro di potassio 425 mg/l, cloruro di calcio 125 mg/l, solfato di magnesio 125 mg/l, cloruro di ferro 2,5 mg/l, solfato di manganese 2,5 mg/l, verde di bromocresolo 22 mg/l, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O

LB (Luria-Bertani): triptone 1%, estratto di lievito 0,5%, cloruro di sodio 1%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O

LB+ ampicillina: triptone 1%, estratto di lievito 0,5%, cloruro di sodio 1%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O, ampicillina 100  $\mu\text{g/ml}$ , ddH<sub>2</sub>O

Terreno di florizzazione (MF): Bacto Yeast Nitrogen Base (YNB-Difco) + 4% di alcol etilico al 96%, ddH<sub>2</sub>O.

Biggy-Agar (DIFCO): Bismuto ammonio citrato 0,5%, sodio solfito 0,3%, glucosio 1%, glicina 1%, estratto di lievito 0,1%, agar 1,6%, ddH<sub>2</sub>O

SLAD: (Synthetic low ammonia dextrose) solfato di ammonio 50  $\mu\text{M}$ , yeast nitrogen base senza amminoacidi e solfato di ammonio 0,67 g/l, glucosio 2%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O

Soft-agar: Estratto di lievito 1%, peptone 2%, glucosio 2%, agar 0,3%, ddH<sub>2</sub>O

SOC: triptone 2%, estratto di lievito 0,5%, NaCl 10mM, mM MgCl<sub>2</sub> 2,5, mM MgSO<sub>4</sub>10, glucosio 20 mM, ddH<sub>2</sub>O.

SC agarizzato: Yeast Nitrogen Base *wo amino acid* 0,67%, glucosio 2%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O

SC liquido: Yeast Nitrogen Base *wo amino acid* 0,67%, glucosio 2%, ddH<sub>2</sub>O

SC 0,1% glucosio: Yeast Nitrogen Base *wo amino acid* 0,67%, glucosio 0,1%, ddH<sub>2</sub>O

SC-URA: Yeast Nitrogen Base *wo amino acid* 0,67%, glucosio 2%, leucina 10 ml/l, lisina 3 ml/l, istidina 2 ml/l, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O.

YNB-BTB liquido: yeast nitrogen base 6,7 g/l, zucchero (galattosio o maltosio) 2%, indicatore blu di bromotimolo 4%, ddH<sub>2</sub>O.

YNB-BTB agarizzato: yeast nitrogen base 6,7 g/l, zucchero (galattosio o maltosio) 2%, indicatore blu di bromotimolo 4%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O.

K-acetato: potassio acetato 1%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O.

N-acetato: sodio acetato 1%, cloruro di potassio 0,5%, agar 2%, ddH<sub>2</sub>O.

Mosto arricchito: mosto di Vernaccia sterile addizionato di glucosio fino al 30%, estratto di lievito 1%, peptone 1% g/l, ammonio fosfato bibasico 1%

## **Identificazione molecolare**

L'identificazione molecolare, mediante PCR-RFLP delle regioni ITS dell'RNA ribosomiale, ha previsto l'estrazione del DNA genomico dei ceppi (Adams *et al.*, 1997), l'amplificazione delle regioni ITS (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) e l'analisi di restrizione degli ampliconi (Guillamòn *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

### **Estrazione del DNA genomico di lievito (Adams et al., 1997)**

I lieviti sono stati coltivati in 10 ml di YEPD liquido a 25 °C in agitatore termostato (200 rpm) fino a raggiungere una densità di 2x10<sup>8</sup> cellule/ml. Le colture sono state centrifugate a 5000 rpm per 5 minuti ed è stato

eliminato il surnatante; il pellet è stato risospeso nel liquido residuo e sono stati aggiunti i tamponi di estrazione 1 (Triton X 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl pH8 10mM, Na<sub>2</sub> EDTA 1mM) e 2 (fenolo 50%, cloroformio 49%, alcol isoamilico 1%), e 0,3 g di sfere di vetro da 710-1,180 µm (Sigma, Milano). La miscela ottenuta è stata vortexata per 3 minuti e centrifugata a 14000 rpm per 5 minuti; dopo la centrifugazione il surnatante è stato prelevato e trasferito in una nuova Eppendorf. Il DNA è stato precipitato con due volumi di etanolo al 95% e nuovamente centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato lavato con etanolo 70%, asciugato sottovuoto e risospeso in 50 µl di H<sub>2</sub>O milliQ. La rimozione del RNA dai campioni è stata effettuata mediante l'aggiunta di 1 µl di RNAasi A (1mg/ml) seguita da incubazione per 10 minuti a 37 °C. Successivamente il DNA è stato precipitato con 2 volumi di etanolo 100% e acetato di sodio 3M ed i campioni sono stati messi a -80°C per 20 minuti. Il DNA è stato poi centrifugato a 14000 rpm per 15 minuti, asciugato sottovuoto per 10 minuti e risospeso in 50 µl di TE.

### **Amplificazione delle regioni ITS**

É stato utilizzato 1µl (50 ng/µl) di DNA genomico, secondo il protocollo descritto in tabella 2.

**Tabella 2. Protocollo termico - ITS**

<b>FASE</b>	<b>T °C</b>	<b>Tempo</b>	<b>Cicli</b>
Denaturazione iniziale	95	5'	1
Denaturazione	95	1'	35
Appaiamento	57	2'	35
Estensione	72	2'	35
Estensione finale	72	10'	1

I primers utilizzati sono ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') ed ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), che amplificano la sequenza del

DNA comprendente la regione 5,8 S e gli spaziatori ITS1 ed ITS2 dell'RNA ribosomiale tra i quali è compreso (fig.13) (Esteve Zarzoso *et al.*, 1999).



**Figura 13. Regione genica dell'RNA ribosomiale.** I geni 18S, 5,8S e 28S sono separati dagli spaziatori trascritti (ITS1 e ITS2); la regione amplificata è quella compresa tra le frecce in celeste (ITS1) e in viola (ITS4).

Un'aliquota di 4 µl del prodotto di amplificazione è stata sottoposta a migrazione elettroforetica su gel di agarosio all'1,5%, in TAE buffer a 70V per 60 minuti. Il gel è stato colorato con bromuro di etidio in soluzione (0,5 µg/ml) e fotografato al transilluminatore *Chemi Doc XRS Imaging System* (BioRad, Milano). Il *DNA Ladder 1KB* (Sigma) (10 - 0,5 kb) è stato utilizzato come marcatore di peso molecolare per la determinazione della dimensione delle bande.

### **Analisi di restrizione**

Sono state utilizzate le endonucleasi di restrizione *HaeIII*, *CfoI* e *HinfI* (BioLabs, New England). Le reazioni di restrizione sono state condotte a 37°C per 90 minuti al termine dei quali miscele di reazione sono state trattate per 20 minuti a 80°C per inattivare le endonucleasi di restrizione. In tabella 3 sono riportati i reagenti utilizzati per la miscela di reazione.

**Tabella 3 Reazioni di restrizione**

Reagenti	HaeIII	HinfI	CfoI
Prodotto PCR	1 µg	1 µg	1 µg
Buffer 10 X	2 µl	2 µl	2 µl
Enzima	1,25 U	1,25 U	1,25 U
BSA			0,2 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	A volume	A volume	A volume

Volume finale	20 µl	20 µl	20 µl
---------------	-------	-------	-------

Dieci µl del prodotto di restrizione sono stati sottoposti a migrazione elettroforetica su gel di agarosio al 3% in 1X TAE buffer a 70V per 120 minuti. Il gel è stato colorato con bromuro di etidio e fotografato al transilluminatore *Chemi Doc XRS Imaging System* (BioRad Laboratories Inc., California). Il *DNA Ladder 50bp* (Sigma, Milano) (1,35 kb - 0,05 kb), è stato utilizzato come marcatore di peso molecolare.

### **Caratterizzazione tecnologica**

I ceppi di lievito sono stati precoltivati in 5 ml di YPD liquido overnight a 25°C, in agitazione a 200 rpm. I 5 ml di coltura contenenti circa  $2 \times 10^8$  cellule/ml sono stati centrifugati per 5 minuti a 3000 rpm. Il pellet è stato lavato con soluzione fisiologica (0,9% di NaCl), centrifugato per 5 minuti a 3000 rpm e, dopo eliminazione del surnatante, risospeso in 1ml di H<sub>2</sub>O sterile.

Le sospensioni cellulari così ottenute sono state sottoposte all'analisi di potere filmogeno, capacità di sviluppo alle temperature 4, 30, 37 °C, produzione di idrogeno solforato, capacità sporigena, assimilazione e fermentazione di maltosio e galattosio, potere fermentativo, vigore fermentativo e potere schiumogeno. Per ciascun ceppo e per ciascun carattere le prove sono state condotte in triplo.

### **Capacità di formare biofilm**

La capacità di formare biofilm è stata valutata risospendendo il pellet in tubi di saggio contenenti 2 ml di terreno di florizzazione (MF) ed incubando i ceppi in statico a 25 °C per 7 giorni. La formazione di biofilm è stata monitorata a partire dal giorno successivo all'inoculo.

### **Sviluppo a temperature controllate**

Le prove di sviluppo a temperature controllate sono state condotte mediante spot assay su piastre contenenti YPD, incubate alle temperature

di 4°C, 30°C e 37°C. Lo sviluppo dei ceppi è stato determinato sulla base dello spessore dello spot alle 24 ore e dopo 48 ore.

### **Produzione di idrogeno solforato**

La produzione di idrogeno solforato è stata testata su terreno Biggy-Agar (DIFCO), a 25°C valutando alle 24 e alle 48 ore la produzione di H<sub>2</sub>S, in funzione del diverso grado di colorazione assunto dallo sviluppo dei ceppi.

### **Test di sporificazione**

Il test di sporificazione è stato condotto su K-acetato e Na-acetato a temperatura ambiente per 30 giorni. L'esame microscopico della formazione degli aschi è stato effettuato dopo tre giorni dall'inoculo ed è proseguito ad intervalli regolari di 4 giorni nell'arco di un mese.

### **Assimilazione e fermentazione degli zuccheri maltosio e galattosio**

L'assimilazione di galattosio e maltosio è stata valutata su terreno minimo YNB-BTB + 2% agar (soluzione stock 50 mg di BBT in 75 ml di acqua distillata). Il pH del terreno è stato portato a 7,0 con NaOH 1M dopo la sterilizzazione. L'inoculo è avvenuto per replica plating a partire da piastre master su YPD. I ceppi sono stati incubati a 25 °C per una settimana; la loro capacità di assimilare gli zuccheri è stata valutata sulla base del viraggio del colore del terreno colturale (da blu a giallo) intorno alla colonia (Kurtzman and Fell, 1998) per effetto della variazione di pH.

I test di fermentazione di galattosio e maltosio sono stati condotti su YNB-BTB liquido (6ml), in tubi di saggio contenenti campanelle di Durham. I ceppi inoculati ( $1,5 \times 10^7$  cellule/ml) sono stati trasferiti in cella termostata a 25 °C per 28 giorni. La variazione di colore del terreno di coltura (viraggio da verde scuro a giallo) e la formazione di bolle di CO<sub>2</sub> all'interno delle campanelle, ha permesso di individuare i ceppi con attività fermentativa.

### **Potere fermentativo**

Il potere fermentativo è stato determinato come indicato da Castelli (Zambonelli, 2003) in beute da 100 ml contenenti 50 ml di mosto arricchito e inoculate con 2 ml di precoltura. Le beute sono state chiuse con le valvole di Müller, contenenti 5 ml di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 96%; poste ad incubare in statico a 25 °C, e pesate giornalmente, per misurare il calo ponderale. La stabilizzazione del peso, per due giorni consecutivi, ha indicato la fine della fermentazione.

### **Vigore fermentativo**

Il vigore fermentativo è stato misurato sulla base dei grammi di CO<sub>2</sub> svolta nei primi cinque giorni della fermentazione (Zambonelli, 2003). È stato calcolato il valore medio dei grammi di CO<sub>2</sub> svolti.

### **Potere schiumogeno**

Il potere schiumogeno è stato valutato inoculando 320 µl delle precolture (1,5x10<sup>7</sup> cellule/ml) dei ceppi da testare in tubi di saggio contenenti 8 ml di mosto arricchito, posti in cella termostata a 25 °C. L'altezza della schiuma (misurata in centimetri) è stata valutata quotidianamente per 7 giorni (Zambonelli, 2003).

## **Caratterizzazione molecolare**

La caratterizzazione molecolare dei ceppi oggetto di studio (tabella 4) è stata fatta attraverso i marcatori molecolari minisatelliti. Sono stati impiegati primers specifici per quattro geni di parete di *S. cerevisiae*: *AGA1 DAN4 HSP150* e *SED1* (Marinangeli *et al.*, 2004).

**Tabella 4. Ceppi impiegati nella caratterizzazione molecolare**

CEPPI	
<b>Vernaccia</b>	V3, V14, V23, V45, V63, V66, V95
<b>Malvasia</b>	M19, M46, M49, M66, M83
<b>Arvisionadu</b>	A43, A51, A58, A68

Le reazioni di PCR sono state condotte secondo i protocolli termici riportati in tabella 5 impiegando il termociclatore “MyCycler Thermal Cycler System” (Biorad, Milano).

**Tabella 5. Protocolli termici - Minisatelliti**

FASE	AGA1			DAN4 (*)			HSP150			SED1		
	T°C	Tempo	Cicli	T°C	Tempo	Cicli	T°C	Tempo	Cicli	T°C	Tempo	Cicli
Denat. iniz.	94	3'	1	94	3'	1	94	3'	1	94	3'	1
Denaturazione	94	1'	35	94	45''	30	94	45''	35	94	1'	35
Appaiamento	64	1'	35	68	30''	30	68	30''	35	64	1'	35
Estensione	72	2'	35	72	1'	30	72	1'	35	72	2'	35
Estensione fin	72	7'	1	72	7'	1	72	7'	1	72	7'	1

(\*): il protocollo termico di 30 cicli indicato è preceduto da uno stage di 9 cicli (denaturazione 94x45'', appaiamento 70x30'', estensione 72x1') nei quali ad ogni ciclo si ha la riduzione di 0,5°C della temperatura di appaiamento.

Le reazioni sono state condotte in un volume finale di 25 µl utilizzando 50 ng di templat. La sequenza dei primer e la composizione delle miscele di reazione è riportata di seguito.

AGA1: 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 3 pmol AGA1f (5'-GTGACGATAACCAAGACAAACGATGCAA-3'); 3 pmol AGA1r (5'-CCGTTTCATGCATACTGGTTAATGTGCT-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf, North America), 1X Taq buffer.

DAN4: 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 30 pmol DAN4f (5'-AGCGCTTTCAAAGGATGGTATTT ACA-3'); 30 pmol DAN4r (5'-CCGTTTCATGCATACTGGTTAATGTGCT-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

HSP150: 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 30 pmol HSP150f (5'-CACTTTGACTCCAACAGCCACTTACA-3'); 30 pmol HSP150r (5'-TACCGGACAAACATTGGTAGAAGACA-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

SED1: 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 2 pmol SED1f (5'-ATGAAATTATCAACTGTCCTATTATCTGCCGG-3'); 2 pmol SED1r (5'-

TTATAAGAATAACATAGCAACACCAGCCAAACC-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

Un µl di tutti i prodotti di amplificazione è stato visualizzato su gel di agarosio all'1,4% dopo corsa elettroforetica in 1X TAE buffer, a 60V per 80 minuti. È stato utilizzato il *DNA Ladder 100bp* (Sigma) (100-1517 bp) come marcatore di peso molecolare.

### **Amplificazione di *FLO11* e delle zone intrageniche ripetute**

Cento ng del DNA genomico sono stati utilizzati come templatato per la reazione di PCR con il termociclatore (My-Cicler, Biorad, Milano). I reagenti impiegati in volume totale di 25 µl per reazione sono: 3mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM per ciascun dNTP; 50 pmol primer Up; 50 pmol primer Lo; 0,5 U Taq DNA polymerase (EuroTaq, Celbio Milano). I primer utilizzati (progettati con il software OLIGO 4.0) sono: MUC1up (5'-AGGTTCAAATGGTGCCAAGA-3') e MUC1lo (5'-AGCCACGCTAGAAGCAGAAG-3') per l'amplificazione del gene *FLO11*. Il protocollo termico ha previsto un primo ciclo a 95 °C per 5 minuti seguito da 40 cicli a 95 °C per 1 min, 52,9 °C per 50 sec e 72 °C per 4 minuti e un'estensione finale di 15 minuti a 72 °C.

Le sequenze interne ripetute del gene *FLO11* sono state amplificate utilizzando i primers Up776-flo11

5'CAAGGTAGTGCCGCTCAATA3' e Lo2973flo11

5'CAGTAGTGCCAGTAGAAAAG 3' (progettati con il software OLIGO 4.0), secondo il seguente protocollo termico: denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min seguita da 30 cicli a 94 °C per 1 min, 60 °C per 50 sec e 72 °C per 3 min e infine un'estensione a 72 °C per 10 min. I prodotti di PCR ottenuti sono stati visualizzati su gel di agarosio all'1% in TAE buffer a 70V per 80 minuti.

### **Osservazione dei biofilm al SEM**

L'allestimento dei campioni è stato effettuato presso il Centro di Microscopia Elettronica dell'Università degli Studi di Sassari come di seguito riportato.

Preparazione del campione: le cellule del biofilm, sviluppatosi per una settimana su vino diluito al 50% con acqua deionizzata sterile, sono state prelevate con un vetrino coprioggetto e sottoposte a una serie di passaggi preparativi: fissazione, disidratazione e metallizzazione.

Fissazione: Il primo passaggio ha previsto una fissazione primaria aldeidica (glutaraldeide al 2,5% in tampone cacolinato per 3 ore, pH 7.2 e 0,2M). Successivamente sono stati eseguiti 3 lavaggi di 5-10 minuti ciascuno in tampone (lo stesso in cui si diluisce il fissativo) e una post-fissazione in tetrossido di osmio ( $OsO_4$  1% in tampone cacodilato) per circa un'ora.

Lavaggi: i campioni sono stati lavati per 3 volte in tampone per 5-10 minuti e poi 3 volte in acqua distillata.

Disidratazione: L'etanolo è stato preparato in concentrazioni crescenti, al fine di effettuare una disidratazione graduale del campione (al 20% per 10', al 50% per 10', al 70% per 10', all'80% per 10', al 95% per 15' e al 100% 3 volte per 20' ciascuna).

Il successivo allontanamento dei solventi è stato effettuato mediante un apparecchio, il "critical point dryer" (CPD), nel quale è possibile eliminare il solvente passando dalla fase liquida a quella gassosa senza attraversare la fase critica di vapore.

Montaggio del campione: Il campione sottoposto ai trattamenti sopradescritti è stato montato per l'osservazione su uno stub di alluminio (supporto portacampioni), per consentire la formazione di un'immagine interpretabile.

Metallizzazione: La ricopertura del campione è avvenuta mediante bombardamento con particelle di gas inerte ionizzato con lo scopo di erodere superficialmente una placca di materiale idoneo (oro-palladio).

Osservazione: L'osservazione dei campioni è stata fatta con l'apparecchio Zeiss DSM (Digital Scanning Microscopy) 962.

## **Test fenotipici per valutare le capacità adesive dei ceppi flor**

### **Prova idrofobicità con ottano (Reynolds & Fink, 2001)**

La prova è stata condotta utilizzando due terreni colturali liquidi: terreno di florizzazione e terreno SC. Le cellule coltivate overnight su SC liquido (20 ml) in agitazione a 30 °C sono state centrifugate (3000 rpm per 5 minuti), sottoposte a lavaggio con acqua sterile per eliminare i residui di terreno e risospese in terreno colturale. I campioni con una OD<sub>600</sub> pari a 1 sono stati risospesi in terreno di florizzazione e incubati in statico a 25 °C per 48 ore per consentire la formazione del biofilm. Nella prova su SC, i campioni sono stati risospesi su SC allo 0,1% di glucosio e il periodo di incubazione è stato di 3 ore a 25 °C. Successivamente, 1,2 ml di ciascun ceppo sono stati trasferiti in un nuovo tubo di saggio nel quale sono stati aggiunti 0,6 ml di ottano (Sigma, Milano). Il sistema bifasico è stato vortexato per 3 minuti. Dopo 5 minuti circa, necessari per consentire la separazione delle due fasi, due aliquote della fase acquosa (0,5 ml ciascuna) sono state prelevate, trasferite in cuvette e sottoposte a lettura spettrofotometrica (Biophotometer Eppendorf, Milano). La percentuale di cellule legate all'ottano è stata calcolata indirettamente misurando la densità ottica della fase acquosa a 600 nm, con la seguente formula:

$$\%IDROFOBICITÀ = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

A<sub>1</sub> : media delle letture della fase liquida (OD 600)

A<sub>0</sub> : OD 600 del campione tal quale (dopo la florizzazione o su SC).

Ogni prova è stata condotta in triplo a partire dalla stessa precoltura.

### **Adesione su superfici di polistirene (Reynolds & Fink, 2001)**

La formazione di biofilm su superfici di polistirene è stata testata su piastre microtiter da 96 pozzetti, utilizzando il cristal violetto come colorante. La lettura dell'assorbanza del cristal violetto è proporzionale alla concentrazione delle cellule che aderiscono alla superficie della piastra.

Anche in questo caso sono state fatte due prove in parallelo: una su terreno di florizzazione e una su SC (per ogni ceppo e per ogni terreno sono state previste cinque ripetizioni). Le precolture sono state preparate inoculando i ceppi in su SC liquido al 2% di glucosio e incubandoli overnight a 30 °C, in agitatore termostato (200 rpm). Al termine dell'incubazione le precolture sono state centrifugate a 3000 rpm per 5 minuti e le cellule sono state lavate con acqua sterile. Il pellet è stato risospeso in terreno di florizzazione e SC allo 0,1% di glucosio fino ad ottenere una sospensione cellulare con OD<sub>600</sub> pari a 1. Cento µl di ciascuna sospensione cellulare sono stati aliquotati nei microtiter in quintuplo e incubati in statico per 48 ore a 25 °C in terreno di florizzazione e a 25 °C per 3 ore su SC allo 0,1%. Trascorso il tempo di incubazione sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione di cristal violetto all' 1% (p/v). Dopo 20 minuti i pozzetti sono stati lavati ripetutamente con acqua distillata, tamponati con carta assorbente e quindi fotografati; sono stati quindi aggiunti 100 µl etanolo in ogni pozzetto per consentire il rilascio del colorante. Trascorsi 25 minuti a 25 °C, i campioni sono stati trasferiti in una nuova piastra microtiter e sono state fatte le letture allo spettrofotometro (Spectra MAX M2 d, Molecular Devices) alla lunghezza d'onda di 570 nm.

### **Quantificazione del biofilm**

Lo sviluppo del biofilm è stato indotto sia su terreno di florizzazione (MF), sia su un substrato costituito da vino diluito al 50% con acqua sterile deionizzata e concentrazione alcolica del 5,5%. I ceppi sono stati coltivati overnight, in agitazione a 30 °C, in tubi di polipropilene da 50 ml contenenti 30 ml di YPD liquido. Le colture ottenute sono state centrifugate a 3000

rpm per 5 minuti e le cellule sono state lavate con acqua distillata. Il pellet è stato trasferito in becker da 200 ml contenenti 150 ml di MF e incubato in statico a 25°C per 7 giorni. Il biofilm è stato recuperato impiegando un sistema costituito da un tubo di silicone portante ad una estremità un puntale e collegato all'altra estremità con una beuta. La beuta è stata collegata alla pompa del vuoto; la pressione negativa ha aspirato il biofilm che è stato raccolto in tubi Falcon. Il materiale cellulare è stato raccolto su filtri di nitrocellulosa di peso noto (diametro filtri 0,2 µm) ed essiccato in stufa a 50° C per 72 ore. I filtri con il pellet essiccato sono stati nuovamente pesati: la quantità di biofilm, espressa in grammi, è stata calcolata per differenza tra il peso del filtro con le cellule del biofilm meno il peso del filtro tal quale. Per ogni ceppo la prova è stata condotta in triplo.

#### **Test di crescita invasiva (Guo et al. 2000)**

I ceppi sono stati strisciati su piastre di YPD e messi ad incubare a 30° C per 3 giorni. L'abilità di aderire all'agar è stata valutata come capacità delle cellule di resistere alla rimozione dalla superficie del terreno colturale provocata da un getto d'acqua. Le piastre sono state fotografate prima e dopo il lavaggio. La prova è stata condotta in triplo e su ogni piastra era presente il ceppo di laboratorio S288c come controllo negativo.

#### **Test di crescita pseudoifale (Guo et al. 2000)**

É stata saggiata strisciando i ceppi su terreno SLAD in maniera tale da separare le singole cellule; le colonie formatesi dopo una settimana di incubazione a 30 °C sono state osservate al microscopio ottico e fotografate. La prova è stata condotta in triplo.

#### **Formazione del mat cellulare (Reynolds & Fink, 2001)**

La formazione di strutture multicellulari complesse chiamate *mat*, è stata osservata pipettando 25 microlitri di una coltura cellulare su piastre di YPD allo 0,3% di agar (*soft agar*). Le piastre, messe ad incubare a 25° C per 14

giorni, sono state fotografate al 7° e al 14° giorno. Per ogni ceppo sono state fatte tre repliche.

## **Real Time-PCR**

### **Estrazione RNA e retrotrascrizione**

Le cellule sono state precoltivate in doppio su YPD e incubate overnight a 25 °C in agitazione (200 rpm); sono state successivamente raccolte per centrifugazione a 3000 g x 5 minuti e, dopo aver eliminato il surnatante, sono state lavate con acqua sterile per allontanare i residui di terreno. Una parte è stata trasferita su MF e dopo 24 ore sono state raccolte per centrifugazione. Il pellet è stato quindi conservato a -80 °C per facilitare la lisi cellulare. L'estrazione di RNA è stata fatta con il Kit RNAqueous®-4PCR (Ambion). Per garantire la completa rimozione di eventuali tracce di DNA i campioni sono stati trattati con 4U/μl di DNAasi per 7 minuti a 30 °C. Gli RNA sono stati conservati a -80 °C.

Per la sintesi del cDNA è stato impiegato il kit Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Milano).

### **Reazione di qPCR**

Per la reazione di PCR Real-Time sono stati utilizzati 50 ng del cDNA come template. Le reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando il termociclatore "i Cyclor iQ Real-Time PCR detection system instrument" (Biorad, Milano). Mix di ligazione: 2mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTPs; 1 μl SYBR Green (1:20000); 0,2 μM Primer Up; 0,2 μM Primer Lo; 0,5 U Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Milano). Primer utilizzati: FLO11Rtup (5'-AGGTTCAAATGGTGCCAAGA-3') e FLO11Rtlo (5'-AGCCACGCTAGAAGCAGAAG-3') per l'amplificazione di *FLO11* e ACT1 up (5'-CGTTCCAATTTACGCTGGTT-3') e ACT1 lo (5'-TCAGCAGTGGTGGAGAAAGA-3') per l'amplificazione di *ACT1*. Il volume totale del mix di ligazione era di 25 μl. Il protocollo termico ha previsto un primo ciclo a 95 °C per 5 minuti per consentire l'attivazione della Taq

polimerasi Hot-Start utilizzata. Successivamente sono stati eseguiti 45 cicli a 95 °C per 20 sec, 60 °C per 30 sec e 72 °C per 30 sec. La fluorescenza è stata misurata durante la fase di estensione. Al termine della reazione di PCR è stata effettuata la curva di *melting* che consente di evidenziare una eventuale contaminazione dei campioni. Per poter confrontare il livello di espressione tra ceppi diversi, è stato utilizzato come riferimento il valore dell'espressione del gene *housekeeping ACT1*.

Per la normalizzazione dei risultati ottenuti è stata utilizzata la formula:

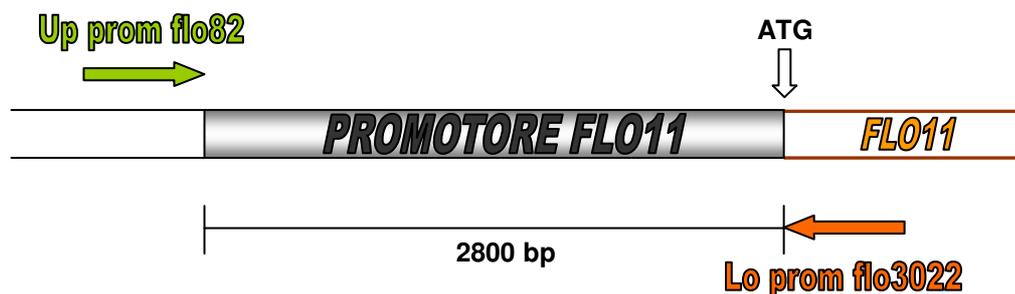
$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

dove

$\Delta\Delta C_T = (\text{media del ciclo soglia del gene target} - \text{media del ciclo soglia di } ACT1)$

### Amplificazione e sequenziamento del promotore di *FLO11*

Cinquanta ng di DNA genomico sono stati utilizzati come template nella reazione di PCR per l'amplificazione della regione del promotore del gene *FLO11*. A tale scopo sono stati progettati due primer omologhi alle sequenze a monte (Up prom flo82 5' CCAACTAAATCTGAATAACAA 3') e a valle (Lo prom flo3022 5' AAGCGAAAGGACCAAATAAGC 3') del promotore (fig.14).



**Figura 14** . Schema della PCR per l'amplificazione del promotore di *FLO11*.

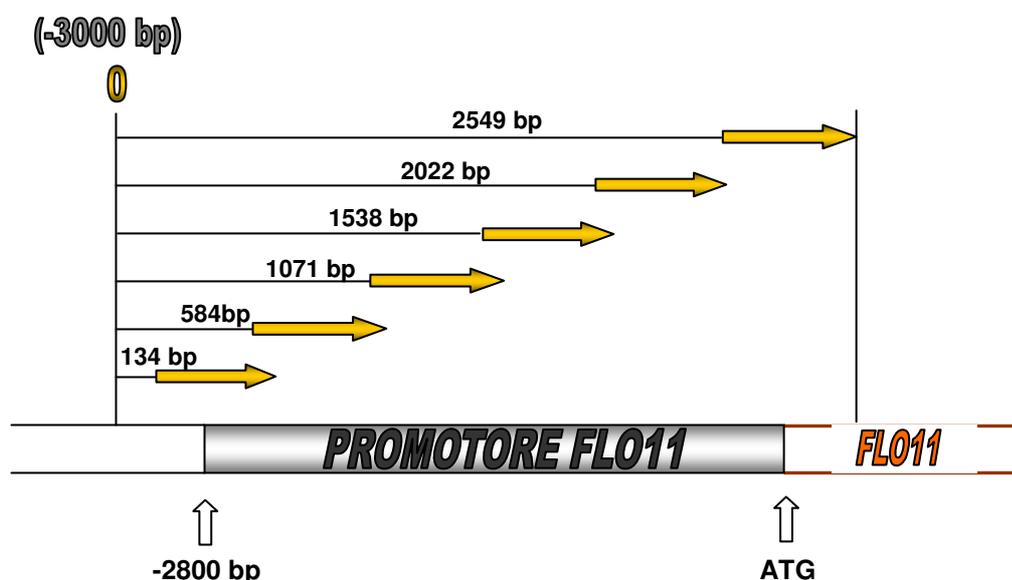
In un volume totale di 25 µl di reazione sono stati impiegati: buffer 1x, 100 nM dei due primer, 200 µM per ogni dNTP, 1U di Taq DNA polimerasi

(EuroTaq, Celbio, Milano) e 2 mM di MgCl<sub>2</sub>. Il protocollo termico ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min, 30 cicli a 94 °C per 1 min, 56 °C per 50 sec e 72 °C per 3 min seguiti da 10 min a 72 °C di estensione finale. I prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio all'1% in TAE buffer a 70V per 70 minuti.

Per il sequenziamento sono stati progettati 6 primers (tabella 6) della lunghezza di 20 bp, distanti circa 500 bp ciascuno con un certo grado di sovrapposizione (fig.15).

**Tabella 6.** Primers utilizzati per il sequenziamento del promotore di *FLO11*

PRIMERS DI SEQUENZA DEL PROMOTORE DI <i>FLO11</i>	
Seq prom flo134	5' GCAATGATTATGTGGTAT 3'
Seq prom flo584	5' AGCTGAAAAGTCCATCTA 3'
Seq prom flo1071	5' ACATCTTTGCTCCCTTAC 3'
Seq prom flo1538	5' GGTGAGATTTGTTTTATG 3'
Seq prom flo1837	5' AATGTCGCCCAAAGAGTT 3'
Seq prom flo2022	5' TGCGACAGTGGCTTCAAA 3'
Seq prom flo2549	5' TGTGGGTCATCTTTTTAG 3'



**Figura 15 .** Schema della PCR di sequenza del promotore

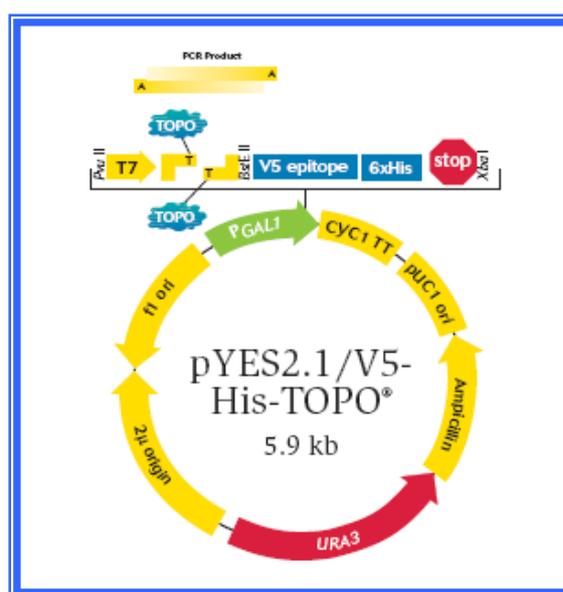
Il sequenziamento del promotore del gene *FLO11* è stato realizzato dal servizio di sequenziamento DNA dell'Università degli Studi di Padova BMR Genomics.

## Clonaggio ed espressione del gene *FLO11*

### Plasmidi di clonaggio utilizzati

Il plasmide impiegato in questo lavoro è il pYES TOPO TA Expression Kit (Invitrogen, Milano) (fig.16).

Il marcatore selettivo presente nel plasmide conferisce alle cellule di *E. coli* che lo acquisiscono, la resistenza all'antibiotico Ampicillina mentre il gene *URA3* complementa l'auxotrofia del ceppo di lievito BY4742.



**Figura 16.** Schema del plasmide di espressione utilizzato in questo

**Tabella 7.** Plasmidi utilizzati in questo studio

NOME	CARATTERISTICHE	FONTE
PYES2.1/V5-HIS TOPO	Vettore di espressione	Invitrogen
PYESFLO11-A9	Vettore di espressione	Questo lavoro
PYESFLO11-M23	Vettore di espressione	Questo lavoro
PYESFLO11-V23	Vettore di espressione	Questo lavoro

### Reazione di ligazione

Per ricavare il rapporto molare tra vettore e inserto da clonare è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{numero di moli} = \text{grammi/peso molecolare}$$

È pratica comune considerare statisticamente uguale il peso molecolare di ogni singolo paio di basi il cui peso medio è di 660 Dalton. Pertanto risulta che:

$$\text{numero di moli} = \text{grammi}/660 \times n^\circ \text{ bp}$$

Sviluppando la proporzione e mantenendo il rapporto molare fra vettore e DNA a 1:3 si ottiene:

$$\frac{\text{ng}_{\text{vettore}}}{\text{Kb}_{\text{vettore}} \cdot 660} : \frac{X \text{ ng}_{\text{inserto}}}{\text{Kb}_{\text{inserto}} \cdot 660} = 1:3$$

dove:  $\text{ng}_{\text{vettore}}$  = peso espresso in ng del plasmide,

$\text{Kb}_{\text{vettore}}$  = lunghezza in Kb del plasmide;

$X \text{ ng}_{\text{inserto}}$  = incognita

$\text{Kb}_{\text{inserto}}$  = lunghezza in Kb dell'inserto di DNA

da cui deriva che:

$$X \text{ ng}_{\text{inserto}} = \frac{\text{ng}_{\text{vettore}} \cdot \text{Kb}_{\text{inserto}}}{\text{Kb}_{\text{vettore}}} \cdot 3$$

Per stabilire le concentrazioni da utilizzare nelle tre reazioni di ligazione, si è tenuto conto delle diverse dimensioni degli inserti da clonare (*FLO11-M23* 3,2 Kb; *FLO11-V23* 3,5 Kb; *FLO11-A9* 4,7 Kb); in base ai calcoli, le quantità di prodotto di PCR da impiegare sono risultate: 16 ng per l'inserto di 3,2 Kb, 18 ng per quello di 3,5 Kb e 24 ng per il più grande di 4,7 Kb. Poiché è possibile che la resa della ligazione sia inferiore rispetto a quanto calcolato, si è deciso di triplicare queste concentrazioni.

Il mix di ligazione è stato effettuato in accordo con il manuale delle istruzioni di pYES TOPO TA Expression Kit (Invitrogen, Milano). Sono stati aggiunti 4 µl di prodotto di PCR, 1 µl di soluzione salina diluita (1,2M NaCl, 0,06M MgCl<sub>2</sub>) e 1 µl di vettore. Il tempo di incubazione, rispetto a quanto indicato nelle istruzioni del manuale, è stato portato a 60 minuti per i due inserti più piccoli e a 90 minuti per quello di 4,7 Kb. Le reazioni di ligazione sono avvenute alla temperatura di 22 °C.

### **Trasformazione per elettroporazione di Escherichia coli**

Tre µl della miscela di ligazione sono stati aggiunti a 50 µl di cellule elettrocompetenti di *E. coli*, fornite col kit. La sospensione cellulare è stata mixata e trasferita in una cuvetta da 0,1 cm (Biorad, Milano) precedentemente tenuta in ghiaccio. I parametri settati per l'elettroporazione sono: capacità 25 µF, resistenza 200 Ω e voltaggio 2,5 KV. L'apparecchio utilizzato è il Gene Pulser II System" (Biorad, Milano). Dopo lo shock elettrico, alle cellule sono stati aggiunti 250 µl di terreno SOC previamente mantenuto a 37 °C; la coltura è stata trasferita in tubi Falcon da 15 ml e tenuta in agitazione a 37 °C per 1 ora a 200 rpm. Aliquote di 70 µl sono state poi inoculate per spandimento in piastre di terreno LB+ampicillina e messe in incubatore a 37 °C overnight.

### **Isolamento del plasmide da E. coli (Zhou, 1990)**

Per ogni trasformazione dieci colonie sono state inoculate in 2 ml di LB + ampicillina (200 mg/l) incubate a 37 °C overnight. Le colture sono state

centrifugate a 14000 giri x 10 secondi. Il pellet è stato trasferito in tubi Eppendorf, vortexato e risospeso in 300 µl di soluzione TENS (TE buffer 1x, 0,1M NaOH, 0,5% SDS) e nuovamente vortexato per 3 secondi. Successivamente sono stati aggiunti 150 µl di sodio acetato 3M a pH 5,2. Il campione è stato vortexato e poi centrifugato a 14000 rpm x 2 minuti. 500 µl di surnatante sono stati trasferiti in una nuova eppendorf e, dopo l'aggiunta di un uguale volume di isopropanolo, miscelati per inversione. Dopo 10 minuti a temperatura ambiente, il DNA plasmidico è stato pellettato a 14000 giri x 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato prima lavato con etanolo al 70% e poi centrifugato per altri 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante il pellet è stato asciugato sottovuoto per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in 40 µl di TE e vortexato. I campioni sono stati trattati con 1mg/ml di RNAasi e tenuti per 15 minuti a 37 °C. Per confermare l'inserimento dell'inserto all'interno del plasmide, è stata effettuata una reazione di PCR avente come template il DNA plasmidico e utilizzando i seguenti primers, fiancheggianti i siti di clonaggio, forniti con il kit: GAL1 Forward: 5'-AATATACCTCTATACTTTAACGTC- 3' e V5 C-term Reverse: 5' -ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'. Le condizioni della reazione di PCR hanno previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 94 °C per 2 minuti; successivamente sono stati eseguiti 25 cicli a 94 °C per 1 minuto, 55 °C per 1 minuto e 72 °C per 1 minuto, e un'estensione finale di 7 minuti a 72 °C.

### **Trasformazione di *Saccharomyces cerevisiae* (David Amberg, 2005)**

Il ceppo BY4742 è stato inoculato in 5 ml di YPD in un tubo Falcon da 15 ml e incubato in agitazione overnight a 30 °C. Successivamente una aliquota della coltura è stata inoculata in 50 ml di YPD in una beuta da 250 ml sino alla concentrazione di  $5 \times 10^6$  cellule/ml, e posta in agitazione per 3 ore a 200 rpm, fino ad ottenere una concentrazione di  $2 \times 10^7$  cellule/ml. La coltura è stata centrifugata a 3000 rpm x 5 minuti. Il pellet è stato sottoposto a tre lavaggi consecutivi: le prime due volte con acqua distillata sterile tenuta in ghiaccio (volumi impiegati: 50 ml e 25ml) e

successivamente con 2 ml di sorbitolo 1M a 4 °C. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di DTT 25 mM (ditiotreitolo) e tenuto a temperatura ambiente per 10 minuti. Le cellule sono state centrifugate per eliminare il DTT, lavate con 2 ml di sorbitolo 1M e risospese in 250 µl di sorbitolo 1M. Cinquanta µl di sospensione cellulare sono stati mixati con 5 µl di DNA e trasferiti in cuvetta (0,2 cm Biorad, Milano) per l'elettroporazione (parametri: 1,5kV, 200Ω, 25 µFaradays, pulse time 5 millisecc) con il "Gene Pulser II System" (Biorad, Milano). Le cellule sono state diluite con 200 µl di sorbitolo 1M per incrementare il volume e immediatamente seminate per spandimento su terreno selettivo costituito da SC-URA in diverse aliquote per ogni piastra. I trasformanti sono stati strisciati su nuove piastre di terreno SC-URA. Le precolture per l'estrazione di DNA plasmidico, sono state preparate su 10 ml di terreno SC-URA liquido secondo il protocollo già riportato. La presenza del plasmide con l'insero clonato è stata confermata per PCR impiegando i primer GAL1 Forward: 5'-AATATACCTCTATACTTTAACGTC- 3' e V5 C-term Reverse: 5' – ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3' secondo il protocollo descritto nel paragrafo precedente.

### **Test fenotipici sui trasformanti BY**

La presenza del plasmide con il promotore GAL1 all'interno dei ceppi BY<sup>+</sup>, ha reso necessaria l'aggiunta di galattosio nei terreni di test per consentire l'espressione del gene *FLO11*. Vengono di seguito riportate le variazioni apportate ai protocolli per testare i trasformanti.

Per ogni prova le precolture sono state fatte su SC-URA al 2% di galattosio a 30 °C in agitazione.

Idrofobicità con ottano e adesione su superfici di polistirene: Le cellule sono state portate in fase esponenziale su SC allo 0,1% e allo 0,5% di galattosio.

Quantificazione del biofilm: Al terreno di florizzazione SC-URA + etanolo al 4% è stato aggiunto il 2% di galattosio.

Formazione del mat cellulare: Nel terreno soft agar il galattosio ha sostituito il glucosio.

Test di crescita invasiva: Il YPD è stato sostituito da SC-URA + 2% di galattosio.

## Identificazione

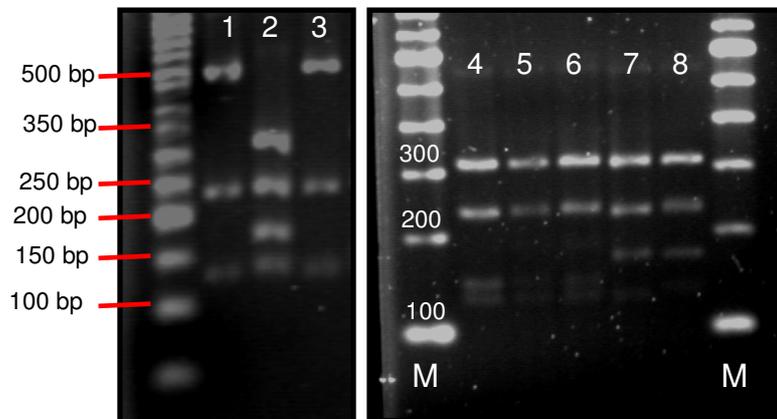
L'identificazione molecolare tramite PCR-RFLP della regione ITS dell'rDNA ha prodotto per la maggior parte dei lieviti flor (95%) un prodotto di PCR di 850 bp (Fernandez-Espinar *et al.*, 2000), e solo per tre ceppi isolati da Vernaccia, la taglia della regione ITS è risultata di 880 bp. Tale esito è in accordo con quanto riportato in letteratura per il genere *Saccharomyces* (Esteve Zarzoso *et al.*, 1999; Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Esteve Zarzoso *et al.*, 2004). Tuttavia, poiché i prodotti di PCR ottenuti da generi e specie diverse possono risultare uguali o simili, per la corretta identificazione della specie è necessario ottenere un profilo di restrizione utilizzando le endonucleasi *HaeIII*, *Hinfl* e *CfoI*. I pattern ottenuti sono riportati in tabella 8. Le taglie degli amplificati e dei prodotti di restrizione ottenuti, sono state determinate rispetto al marcatore di peso molecolare (DNA Ladder 1KB, Sigma 10 - 0,5 kb), con il software di acquisizione di immagini *Chemi Doc XRS Imaging System* (BioRad Laboratories Inc., California).

I frammenti di restrizione ottenuti con l'enzima *HaeIII* hanno permesso di distinguere due diversi profili a quattro bande: il tipico profilo flor è presente nel 95% dei ceppi (Fernandez-Espinar *et al.*, 2000); al contrario i ceppi V72, V80 e V99 esibiscono un pattern identico a quello del ceppo tipo CBS1171 (Esteve Zarzoso *et al.*, 1999).

**Tabella 8** . Dimensione (bp) della regione ITS amplificata per PCR e dei frammenti di restrizione nei ceppi tipo di *S. cerevisiae* CBS1171<sup>T</sup> CBS380<sup>T</sup> e CBS395<sup>T</sup> e nei ceppi flor

Ceppi	Prodotto PCR (bp)	Frammenti di restrizione (bp)		
		<i>HaeIII</i>	<i>Hinfl</i>	<i>CfoI</i>
CBS1171 <sup>T</sup> <i>S. cerevisiae</i>	880	325- 250-175-130	385-375-120	375-355-150
CBS380 <sup>T</sup> <i>S. bayanus</i>	880	500-250-130	385-375-120	375-355-150
CBS395 <sup>T</sup> <i>S. bayanus</i> .	880	500-250-130	385-375-120	375-355-150
Ceppi flor in studio	850	325- 230-170-125	375-365-110	345-345-160
	880	325-250-175-130	385-375-120	375-355-150

Nella figura 17 è riportato il pattern ottenuto dall'analisi di restrizione con *HaeIII* dei ceppi tipo e di alcuni dei ceppi isolati da Vernaccia.

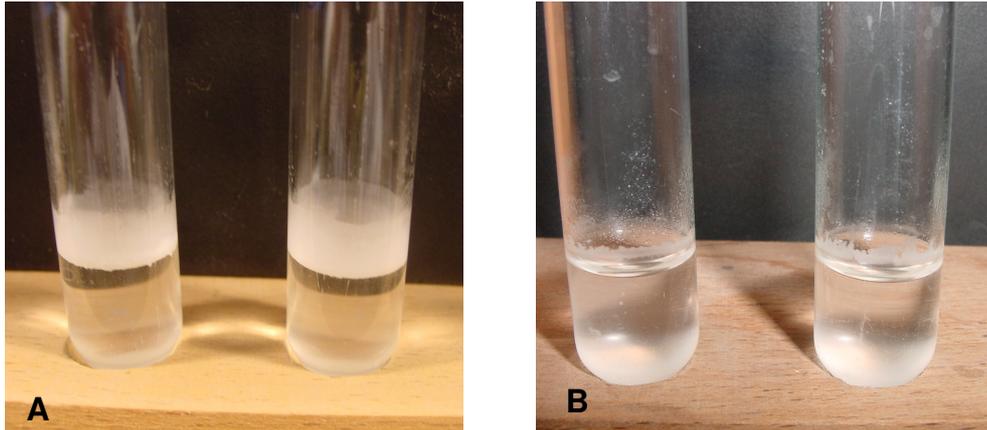


**Figura 17.** Analisi dei profili di restrizione della regione ITS con l'endonucleasi *HaeIII*: (M) Marker 100bp; (1) *CBS380*; (2) *CBS1171*; (3) *CBS395*; nelle corsie 4, 5 e 6, è rappresentato il tipico profilo a quattro bande dei lieviti flor; mentre nelle corsie 7 e 8 è mostrato il profilo riscontrato in alcuni ceppi di Vernaccia identico al ceppo tipo *CBS1171*.

L'endonucleasi *CfoI* ha invece fornito due diversi profili a tre bande: anche in questo caso, il 95% dei ceppi esibisce il profilo flor in accordo con Fernandez-Espinar *et al.*, (2000), mentre per i tre ceppi V72, V80 e V99 isolati da Vernaccia è stato riscontrato un profilo di restrizione a tre bande identico a quello dei ceppi tipo usati in questo lavoro.

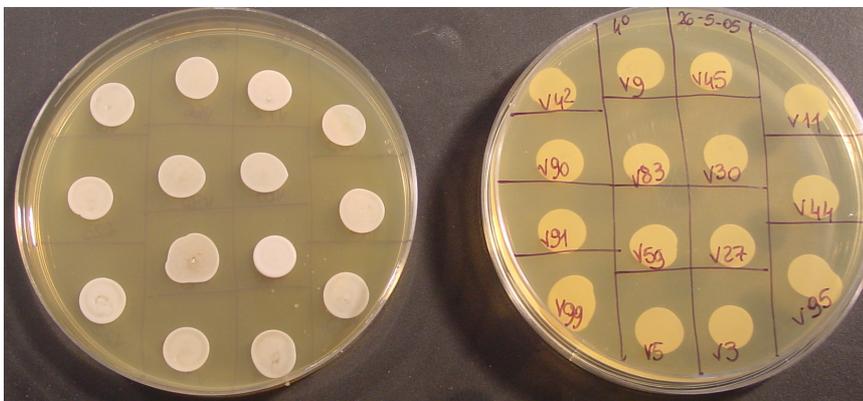
## Caratterizzazione tecnologica

Formazione di biofilm: In accordo con Pinna (2000) tutti i ceppi sono risultati florigeni ed hanno prodotto dei veli con morfologie estremamente variabili (fig.18); in media il tempo necessario per la formazione di un velo completo è stato di 3 giorni.



**Figura 18 . Biofilm formati su superficie liquida.** A) ceppo con elevata attitudine alla produzione di biofilm; B) ceppo con scarsa attitudine alla produzione di biofilm.

Lo sviluppo a temperature controllate: è stata valutata la capacità dei ceppi di crescere a 4°C, 30°C e 35°C, valutando alle 24 e alle 48h lo sviluppo dei ceppi su piastra (fig.19). Dall'analisi dei risultati si osserva che il 100% dei ceppi cresce a 4°C, a 30°C e a 35°C.



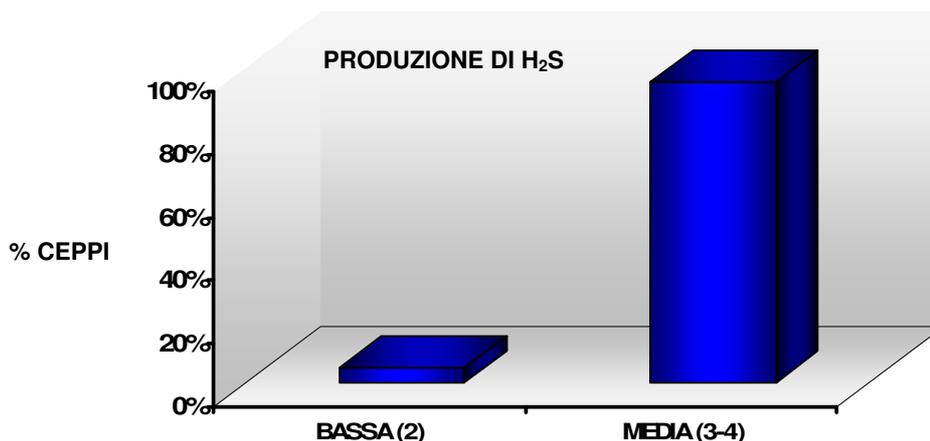
**Figura 19. Sviluppo a temperature controllate.** In figura è rappresentato un esempio di sviluppo di alcuni ceppi flor a 4 °C.

La produzione di Idrogeno solforato: è stata valutata sulla base della colorazione marrone più o meno intensa assunta dai ceppi cresciuti su terreno BiGGY-Agar. La colorazione è stata stimata secondo la seguente scala: 1-bianco, 2- crema, 3- marron leggero, 4- marron, 5- marron scuro, 6- nero (Sipiczki *et al.*, 2001). L'intensità di colore su Biggy-agar è direttamente proporzionale alla quantità di H<sub>2</sub>S prodotta dai ceppi. Il terreno contiene bismuto solfito che viene ridotto a bismuto solfuro per liberazione extracellulare di H<sub>2</sub>S, la colorazione marron, pertanto, è tanto più intensa quanto più H<sub>2</sub>S viene prodotto dai ceppi (fig.20).



**Figura 20.** Diverse tonalità di colorazione marron assunte dallo sviluppo dei ceppi su Biggy-agar.

I dati sono stati espressi secondo la seguente legenda: (1-2) produzione bassa, (3-4) produzione media, (5-6) produzione elevata (Sipiczki *et al.*, 2001). Il 95% dei ceppi è medio produttore, ma il dato deriva dall'aggregazione di due valori della scala di riferimento (ceppi che esprimono il livello 3 e ceppi che esprimono il livello 4). Il 5% dei ceppi ha mostrato una bassa produzione del composto (fig.21).



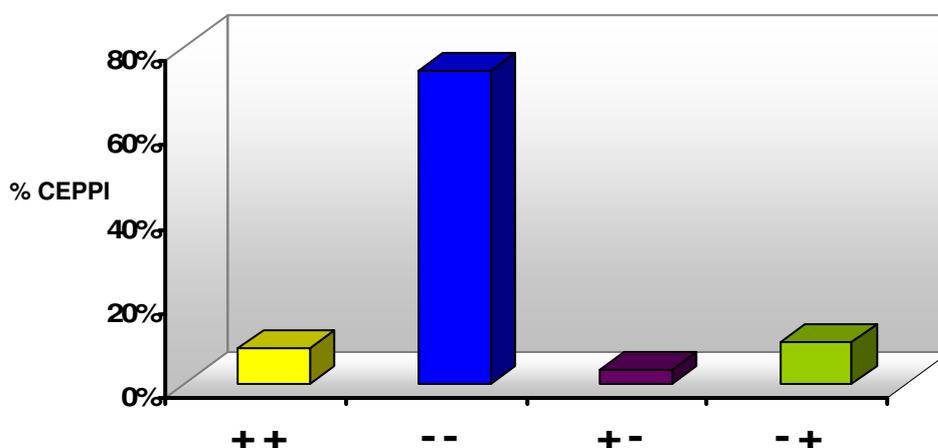
**Figura 21 . Produzione di H<sub>2</sub>S.** Distribuzione dei ceppi flor in base alla produzione di H<sub>2</sub>S, valutata in terreno Biggy-agar e espressa come intensità della colorazione della colonia.

Il test di sporificazione: i ceppi analizzati sporificano in entrambi i terreni colturali Na-acetato e K-acetato. La capacità di sporificare è pari al 100% per i due terreni. I ceppi tipo di riferimento non hanno invece sporificato su nessuno dei due terreni.

#### Fermentazione e assimilazione degli zuccheri galattosio e maltosio

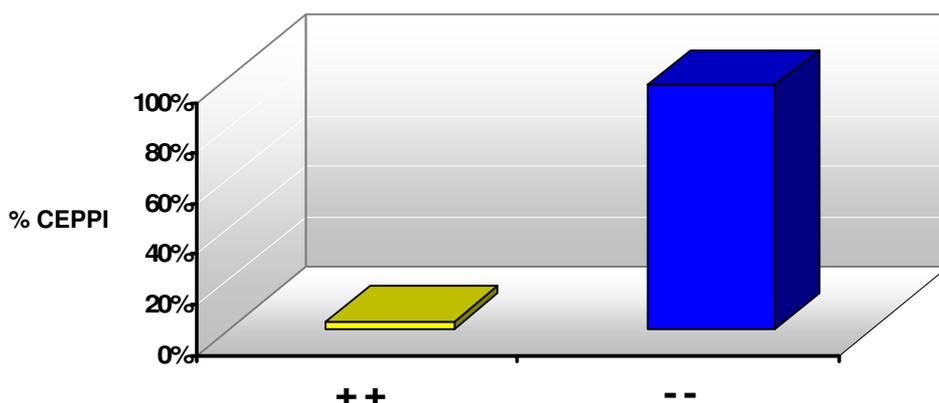
Lo scopo di questo esperimento è stato quello di valutare l'attitudine dei ceppi flor di fermentare e assimilare gli zuccheri galattosio e maltosio. Nelle figure 22 e 23 sono indicati i risultati delle prove.

#### **Fermentazione e assimilazione del maltosio**



**Figura 22 . Fermentazione e assimilazione del maltosio.** Tra i ceppi flor testati, l'8,6% fermenta e assimila il maltosio (++), il 3% lo fermenta (+-), il 10% lo assimila (-+) e il 74% (-) e incapace di fermentare e di assimilare lo zucchero.

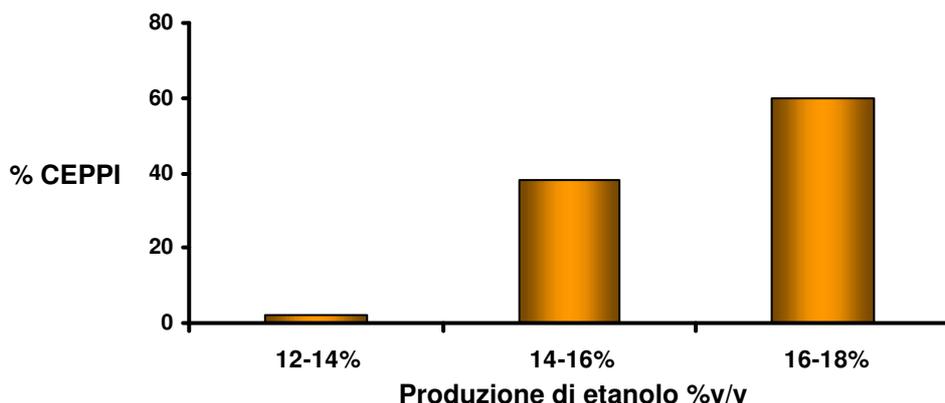
### Fermentazione e assimilazione del galattosio



**Figura 23. Fermentazione e assimilazione del galattosio.** Tra i ceppi testati il 3% fermenta e assimila il galattosio (++) mentre il restante 97% è incapace di utilizzare il galattosio (--).

Dall'analisi dei risultati appare evidente che la maggior parte dei ceppi analizzati è incapace di utilizzare queste due fonti di carbonio. In particolare il 3% dei ceppi assimila e fermenta il galattosio mentre il restante 97% non lo utilizza. Il comportamento dei ceppi nei confronti del maltosio appare leggermente diverso: infatti la percentuale dei ceppi incapace di fermentare e assimilare il maltosio è del 78%; il 3,4% lo fermenta e non lo assimila e il 10% lo assimila soltanto. Nell'8,6% dei ceppi è stata osservata la capacità di fermentare e assimilare il maltosio.

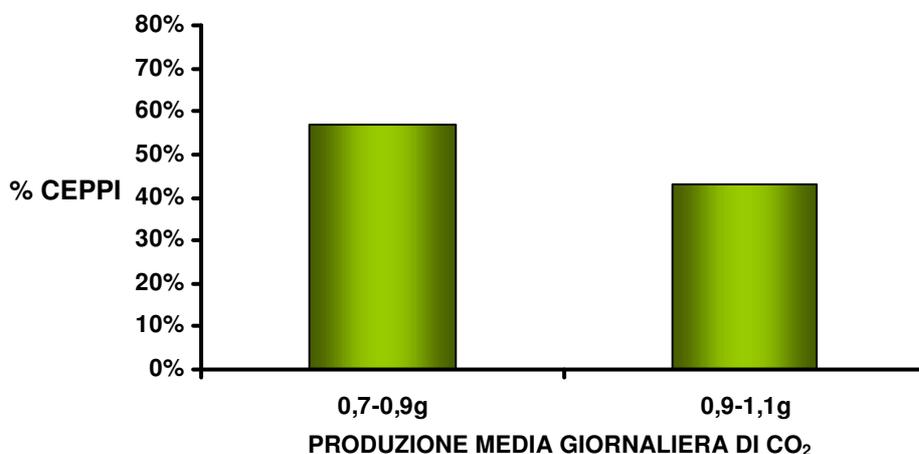
Il potere fermentativo è una misura diretta della capacità del lievito di trasformare in alcool gli zuccheri contenuti nel mosto. Maggiore è tale potere tanto maggiore sarà la capacità del lievito di produrre vini con un elevato grado alcolico. Il potere fermentativo è stato stimato in base al calo di peso registrato: applicando il seguente fattore di conversione dello zucchero in alcool:  $\text{calo di peso finale} \times 2.5 = \% \text{ alcool prodotto}$  (Zambonelli, 2003). La gran parte dei ceppi isolati sono risultati alto produttori di alcol. Infatti il 98% dei ceppi ha la capacità di produrre % v/v di etanolo comprese tra 14 e 18% (fig.24).



**Figura 24. Potere fermentativo medio espresso dai ceppi flor.** Il 2% dei ceppi produce il 12-14% di alcol, il restante 98% produce percentuali di etanolo comprese tra 14 e 18%.

Il dato è importante per i ceppi analizzati, considerando che le uve di Vernaccia hanno tendenzialmente elevate concentrazioni zuccherine e che il quantitativo minimo di alcol richiesto dal disciplinare è di 15° (v/v).

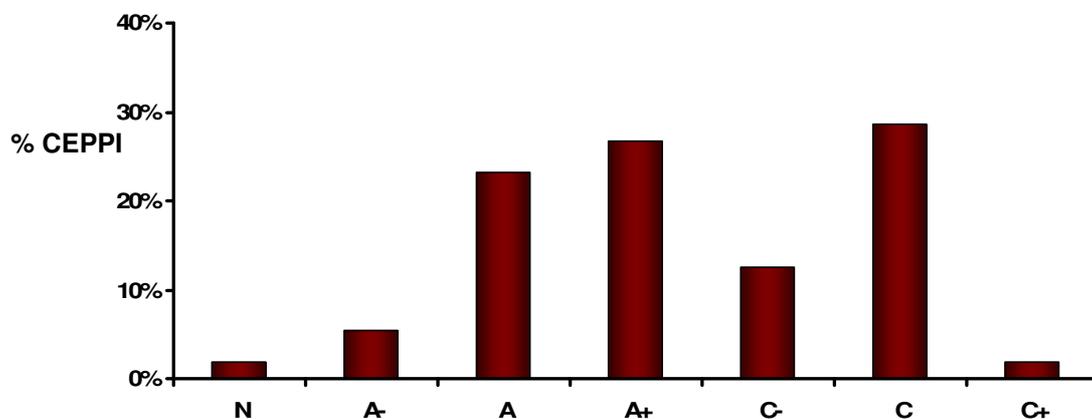
Il vigore fermentativo: esprime la capacità dei ceppi di dare l'avvio a pronte e rapide fermentazioni. Questo carattere è espresso come valore medio dei grammi di CO<sub>2</sub> svolti nei primi cinque giorni di fermentazione applicando i seguenti range: 0,5 - 0,7 g; 0,7 - 0,9 g; 0,9 - 1,1 g; >1,1 g, che raggruppano i ceppi in funzione della produzione media giornaliera di CO<sub>2</sub>. (Zambonelli, 2003). I ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae* sono i più vigorosi ed esiste fra ceppi diversi una notevole variabilità nell'espressione di tale carattere che è legato a molteplici attività biochimiche dei lieviti.



**Figura 25 . Vigore fermentativo dei ceppi flor.** Il 57% dei ceppi analizzati ha un vigore fermentativo compreso tra 0,7 e 0,9 g, mentre per il 43% è stato registrato un calo medio giornaliero di CO<sub>2</sub> compreso tra 0,9 e 1,1 g.

Il 43% dei ceppi analizzati ha mostrato un buon vigore fermentativo, con un calo medio giornaliero di CO<sub>2</sub> compreso tra 0.9 e 1.1 g (fig.25).

Il potere schiumogeno: è stato valutato misurando l'altezza della schiuma nei tubi di saggio formatasi col procedere della fermentazione. È stata utilizzata la seguente scala: N/nessuno; A/anello; A-/anello incompleto; A+/anello evidente; C/anello completo su tutta la superficie tra 0,5-1 cm; C-/anello sotto 0,5 cm; C+/anello superiore 1cm (Zambonelli, 2003). Quasi tutti i ceppi analizzati hanno formato schiuma durante il processo fermentativo, e l'entità della produzione è risultata variabile. Sul totale i ceppi hanno mostrato i seguenti risultati: circa il 2% **C+**, il 28% **C**, il 12,5% **C-**, il 27% **A+**, il 28% circa **A** e **A-**, mentre il 2% **N**. Il comportamento dei ceppi per il potere schiumogeno è rappresentato in figura 26 dove sono riportate le percentuali dei ceppi e i diversi livelli di altezza della schiuma.



**Figura 26. Potere schiumogeno.** Percentuale di ceppi che esprimono i diversi livelli di produzione di schiuma.

### Scelta dei ceppi con le migliori caratteristiche tecnologiche

Al termine delle prove di caratterizzazione tecnologica, sulla base dei risultati ottenuti, sono stati individuati 16 ceppi che hanno mostrato un

elevato potere fermentativo, un elevato vigore fermentativo, bassa produzione di schiuma, e una medio-bassa produzione di idrogeno solforato. Le caratteristiche tecnologiche dei ceppi sono riassunte nella tabella sottostante.

**Tabella 9 .** Ceppi flor selezionati in base ai risultati della caratterizzazione tecnologica

CEP PI	POTERE FERMENTATIVO*	VIGORE FERMENTATIVO*	POTERE SCHIUMOGENO*	PRODUZIONE DI H <sub>2</sub> S*
V3	17,3	0,98	A+	3
V14	16,65	1	A+	3
V23	16,65	1,1	A	3
V45	16,15	1,02	A+	3
V63	16,93	1,09	A	4
V66	15,9	0,98	A	2
V95	16,4	1,09	A	3
M19	16,84	1	A+	3
M46	17,15	0,93	A+	4
M49	17,35	0,96	A	3
M66	17,98	1	A	3
M83	17,03	0,92	A+	3
A43	16,85	0,99	A-	4
A51	16,63	1,08	A	3
A58	17,45	1,1	A	4
A68	17,47	1,09	A	3

\*Potere fermentativo espresso come % v/v di alcol etilico prodotto

\*Vigore fermentativo espresso come produzione media giornaliera di CO<sub>2</sub> (gr)

\*Potere schiumogeno espresso come altezza della schiuma: A anello; A+ anello evidente

\*Produzione di H<sub>2</sub>S valutata sulla base della colorazione assunta dai ceppi cresciuti su terreno BiGGY-Agar. 2- crema, 3- marron leggero, 4- marron.

I 16 ceppi sono stati successivamente sottoposti a caratterizzazione molecolare con i marcatori molecolari minisatelliti.

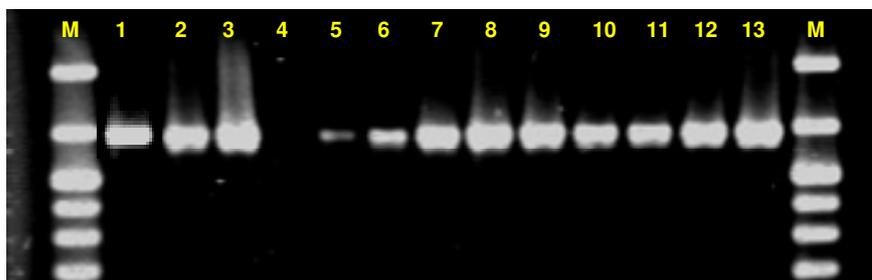
### Caratterizzazione molecolare

Per la caratterizzazione molecolare dei ceppi oggetto di studio sono stati utilizzati i marcatori molecolari minisatelliti in accordo con Marinangeli *et al.* (2004). Sono stati amplificati i quattro geni di parete di *S. cerevisiae* *AGA1*, *DAN4*, *HSP150* e *SED1*. Le ORF dei quattro geni scelti presentano minisatelliti che causano polimorfismo di lunghezza.

Durante l'elaborazione dei risultati si è tenuto conto sia del potere discriminante di ciascun minisatellite, sulla base della frequenza con la quale lo stesso amplificato compare nella popolazione dei ceppi flor (calcolata come percentuale sul totale dei ceppi analizzati); sia del profilo ottenuto, per ogni ceppo, dalla combinazione dei quattro minisatelliti. Le taglie degli amplificati ottenuti sono state determinate rispetto allo standard utilizzato (*DNA Ladder 100bp* Sigma, 100-1517 bp), con il software di acquisizione di immagini *Chemi Doc XRS Imaging System* (BioRad Laboratories Inc., California).

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti con ciascun minisatellite, per i 4 geni analizzati.

AGA1: per il gene *AGA1* è stato ottenuto un unico amplificato di 1180 bp. Per il ceppo V3 (corsia 4) i primer AGA1f e AGA1r non hanno prodotto alcun amplificato (fig.27).

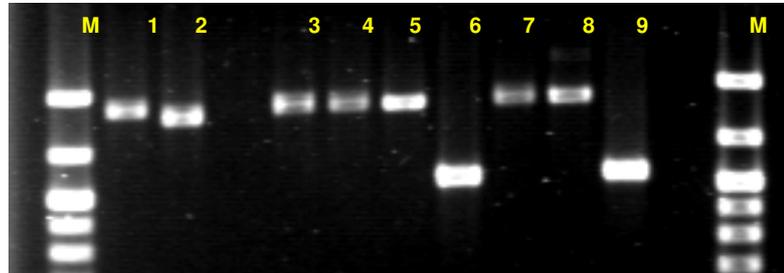


**Figura 27. Gene *AGA1*:** la coppia di primer *Aga1f* e *Aga1r* ha prodotto per tutti i ceppi flor un singolo prodotto di amplificazione di 1180 bp. (M) marcatore di peso molecolare 100 bp (Sigma); nella corsia 1 è presente l'amplificato di 1200 bp del ceppo tipo CBS1171.

DAN4: l'amplificazione di *DAN4* ha generato 6 diversi prodotti, di taglia compresa tra 1050 e 1600 bp (1050; 1200; 1250; 1400; 1450; 1600). L'amplificato più frequente, presente nel 70% dei ceppi, misura 1450 bp; in questo gruppo, nell'83% dei casi, è presente come singolo amplificato; nel 17% dei casi sono presenti due amplificati. Circa il 12% dei ceppi possiede l'amplicone di 1050 bp; le due taglie singole di 1400 e di 1600 bp sono ugualmente presenti nel 6% dei campioni. I due prodotti di 1200 e

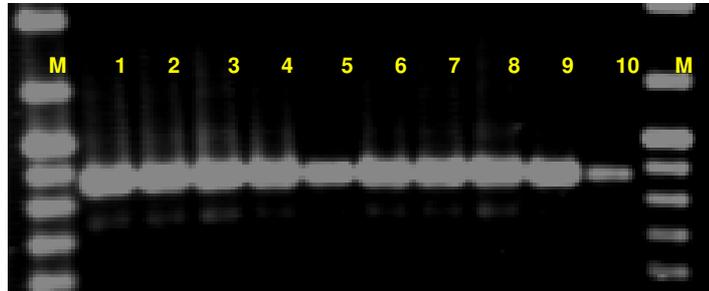
Pinna Claudia 70

1250 bp sono stati ritrovati solo in due dei tre profili a doppia banda. In totale sono stati ottenuti 7 profili: 4 di essi sono costituiti da un'unica banda (82% dei casi) mentre 3 presentano due bande (18%) (fig.28).



**Figura 28. Gene *DAN4*:** la coppia di primer Dan4f e Dan4r ha generato 6 ampliconi e 7 diversi profili; nelle corsie da 1 a 7 sono presenti alcuni amplificati a banda singola. Corsia 8: profilo del ceppo M82 costituito da due amplificati.

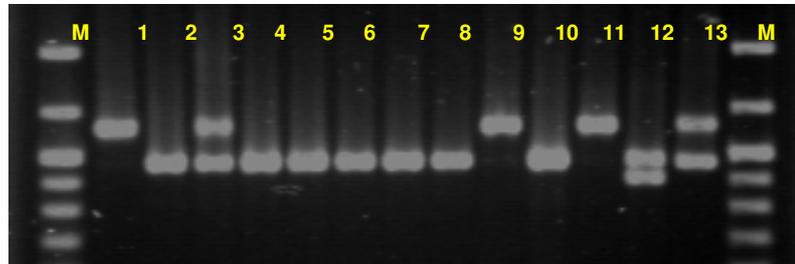
*HSP150*: l'amplificazione del gene *HSP150* ha fornito per tutti i ceppi analizzati un amplificato di 890 bp (fig.29).



**Figura 29 . Gene *HSP150*:** la coppia di primer Hsp150f e Hsp150r ha originato per tutti i ceppi flor un singolo prodotto di amplificazione di 890 bp. (M) marcatore di peso molecolare 100 bp (Sigma).

*SED1*: per il gene *SED1* sono stati ottenuti 3 ampliconi di taglia variabile da 890 a 1150 bp (890; 980; 1150 bp) e 4 profili, dei quali 2 a banda singola e 2 a due bande. Con il 59% di frequenza, la taglia maggiormente rappresentata per questo gene è stata quella di 980 bp (nel 70% dei casi come unica banda) seguita da quella di 1150 bp trovata nel 52% dei ceppi (77% come banda singola); l'amplicone di 890 bp è comparso nel 6% dei

ceppi ed esclusivamente in un profilo a doppia banda. Nella figura 30 sono mostrati alcuni dei profili ottenuti.



**Figura 30 . Gene *SED1*:** la coppia di primer Sed1f e Sed1r permesso di ottenere tre ampliconi di taglia variabile e 4 profili di cui due a banda singola e due a banda doppia. (M) marcatore di peso molecolare 100 bp (Sigma).

Nella tabella è riportato per ciascun ceppo il “profilo” di caratterizzazione molecolare che deriva dalla combinazione dei 4 minisatelliti.

Per i sedici ceppi analizzati sono stati individuati 8 diversi profili. Il livello di discriminazione dell’indagine, ha confermato che i ceppi appartenenti alla stessa area geografica formano un gruppo a se stante: le tre popolazioni di lieviti derivano infatti dall’Oristanese (Vernaccia), dalla Planargia (Malvasia) e dal Goceano (Arvisionadu). Nell’ambito dei primi due gruppi esiste una certa variabilità genetica, maggiore nei lieviti isolati da Malvasia, mentre tra i ceppi Arvisionadu è stato individuato un unico profilo.

**Tabella 10 . Caratterizzazione molecolare con i minisatelliti.** In tabella è indicato il paese di provenienza degli isolati e i profili determinati con i minisatelliti dei geni *AGA1*, *HSP150*, *DAN4* e *SED1*.

PAESE	CEPPO	AGA1	HSP150	DAN4	SED1
Cabras	V3	–	890	1400	1150
Cabras	V14	1180	890	1450	980
Zeddiani	V23	1180	890	1250-1450	980-1150
Narbolia	V45	1180	890	1450	980
Baratili	V63	1180	890	1450	980
Baratili	V66	1180	890	1450	980
S. Vero Milis	V95	1180	890	1450	980
Bosa	M19	1180	890	1050	1150
Basa	M46	1180	890	1600	980
Bosa	M49	1180	890	1050	1150
Magomadas	M66	1180	890	1200-1450	890-980
Tresnuraghes	M83	1180	890	1400-1600	890-110
Benetutti	A43	1180	890	1450	1150
Benetutti	A51	1180	890	1450	1150
Benetutti	A58	1180	890	1450	1150
Benetutti	A68	1180	890	1450	1150

## Amplificazione del gene *FLO11* e delle sue zone intrageniche ripetute

Le prove svolte per accertare la capacità di formare biofilm hanno messo in evidenza che ceppi flor diversi hanno differente attitudine alla florizzazione, sia come velocità di formazione che come quantità in peso del biofilm. Per questo motivo sono stati analizzati 21 ceppi flor di *S. cerevisiae* e sono stati amplificati l'intero gene *FLO11* e la zona intragenica delle sequenze ripetute.

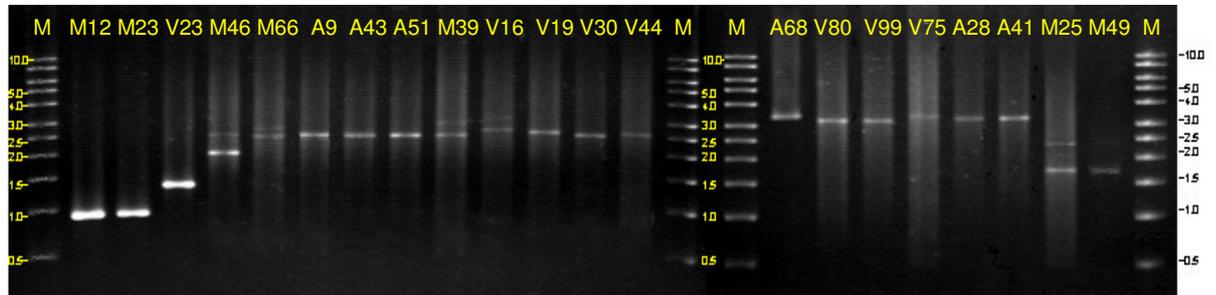
I ceppi utilizzati in questa parte del lavoro (tabella 11), sono stati scelti in base alla loro differente capacità di formare biofilm su superfici liquide. In particolare sono stati scelti 12 ceppi ottimi produttori di biofilm e 9 ceppi cattivi produttori di biofilm (un buon produttore di biofilm è un ceppo in grado di formare un biofilm completo, spesso, rugoso e di completarne la formazione nell'arco di 2-3 giorni, di produrre un biofilm resistente e capace di riformarlo se distrutto).

**Tabella 11.** Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* flor scelti per lo studio del gene *FLO11*.

CEPPI		
	Cattivi produttori di biofilm	Buoni produttori di biofilm
Vernaccia	<b>V16, V23, V80, V99</b>	<b>V19, V30, V44, V75</b>
Malvasia	<b>M12, M23, M39, M66</b>	<b>M25, M46, M49</b>
Arvisionadu	<b>A43</b>	<b>A9, A28, A41, A51, A68</b>

L'amplificazione del gene *FLO11* e delle sequenze ripetute, ha rivelato l'esistenza di un notevole polimorfismo di lunghezza tra i ceppi oggetto di studio. La dimensione dei geni amplificati varia da un minimo di 3,1 kb a massimo di 6,1 kb mentre l'ampiezza delle zone ripetute varia da 0,9 kb sino a 3,3 kb. In totale sono stati individuati dodici differenti profili di amplificazione corrispondenti a 12 differenti dimensioni del gene. Tra i

ceppi analizzati ve ne sono cinque che posseggono due alleli del gene di taglia diversa; questa disparità è maggiormente apprezzabile se si osservano gli ampliconi delle zone interne ripetute (fig.31).

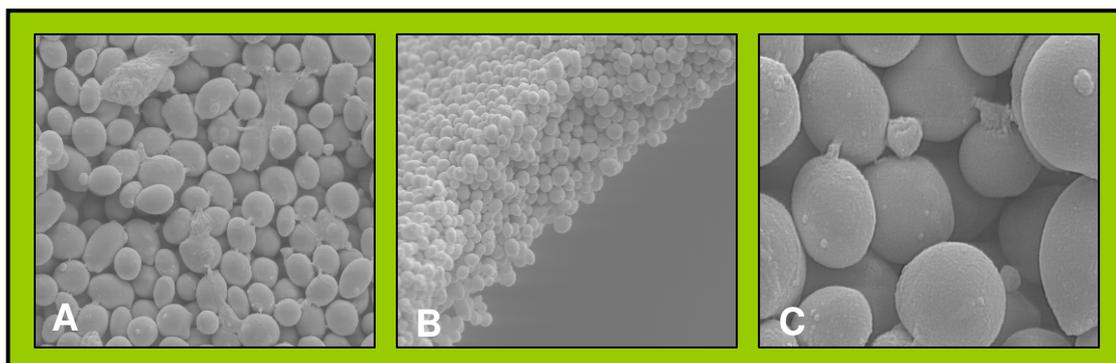


**Figura 31. Amplificazione delle zone ripetute del gene *FLO11*.** In 21 ceppi flor le sequenze ripetute del gene *FLO11*, sono state amplificate per PCR. Le taglie variano da 0,9 Kb a 3,3 Kb.

## Analisi fenotipiche dei ceppi flor

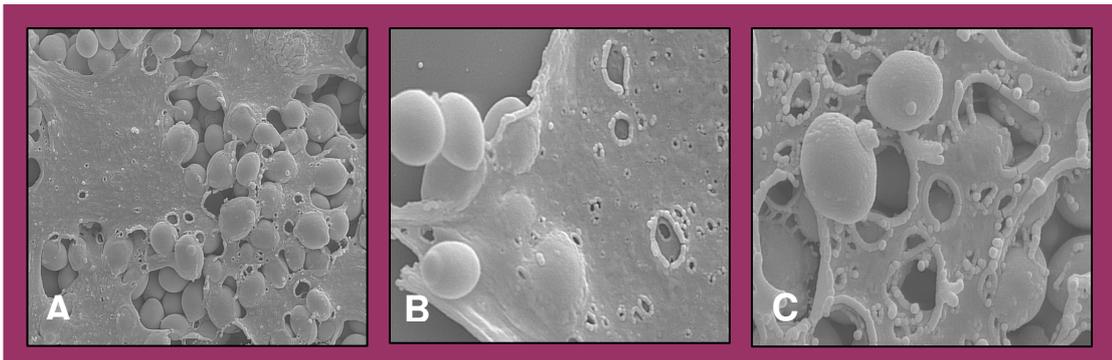
### Analisi del biofilm al SEM

Per ottenere maggiori informazioni sull'ultrastruttura del biofilm formato dai lieviti flor è stato impiegato il microscopio elettronico a scansione (SEM). I campioni di biofilm sono stati prelevati dopo sette giorni di sviluppo su terreno naturale e sottoposti a fissaggio. Le immagini ottenute al SEM hanno confermato che la struttura del biofilm su superficie liquida è costituita esclusivamente da cellule con aspetto lievitifforme e non pseudoifale (fig.32). Le cellule sono distribuite in più strati e impacchettate in maniera ordinata (fig.32B). Lo spessore del biofilm varia da ceppo a ceppo e rappresenta una caratteristica ceppo-specifica.



**Figura 32 . Biofilm dei lieviti flor.** A), B) e C): l'aspetto morfologico delle cellule che costituiscono il biofilm è di tipo lievitifforme. Ingrandimenti A) 2000X; B) 500X; C) 5000X.

Sorprendentemente l'esame microscopico ha rivelato la presenza di una abbondante matrice extracellulare che riveste le cellule esposte al contatto con l'aria (fig. 33).



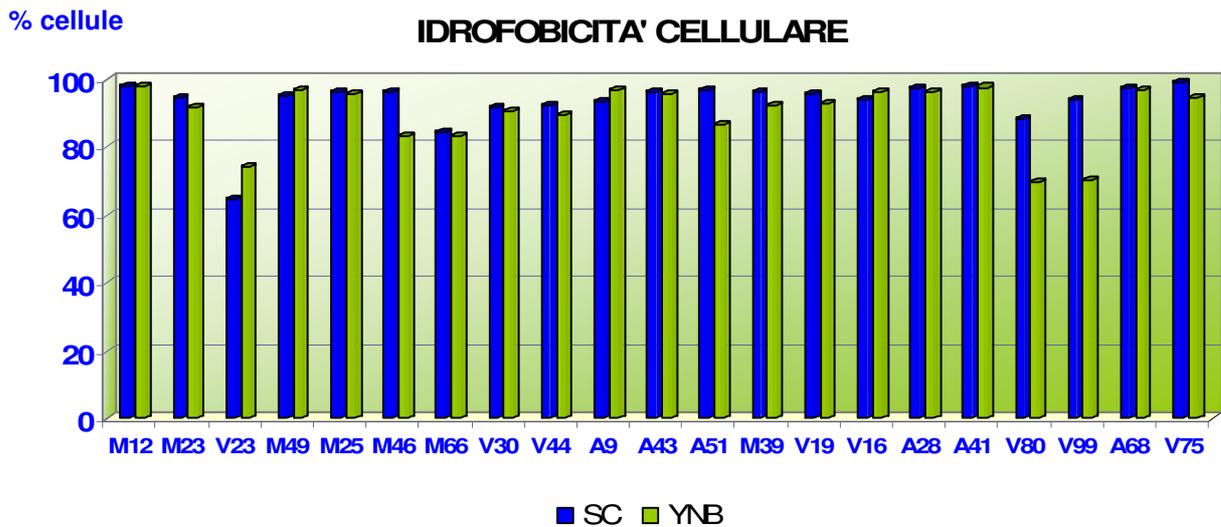
**Figura 33 . Ultrastruttura del biofilm di *S. cerevisiae*.** Nelle tre immagini è distinguibile una matrice extracellulare che ricopre le cellule del biofilm.

Queste sostanze extracellulari non erano mai state osservate in precedenza e alcuni studi sui biofilm di *S. cerevisiae* ne escludevano l'esistenza (Verstrepen *et al.*, 2004). In ogni campione analizzato la matrice è sempre presente sebbene in quantità diverse. Ciò potrebbe essere dovuto sia al fatto che il protocollo utilizzato per la preparazione dei campioni non è adatto a mantenere intatte strutture particolarmente sensibili (Ramage *et al.*, 2005), sia alla diversa attitudine dei ceppi di produrre materiale esopolimerico. Il dubbio potrà essere fugato solo con l'impiego del microscopio elettronico ambientale, strumento che permette di osservare queste comunità microbiche nel loro stato naturale.

### **Idrofobicità cellulare**

Il livello di idrofobicità dei ceppi flor è stato ottenuto come misura della percentuale di cellule che rimangono intrappolate nella fase idrofobica (ottano). I valori riportati nella figura 34 testimoniano che i lieviti flor

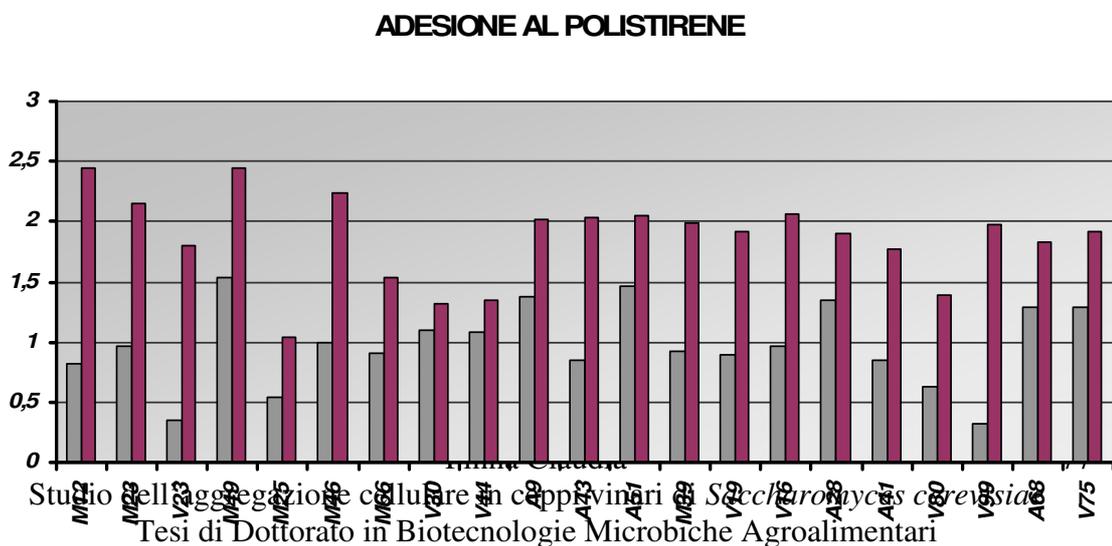
posseggono una superficie cellulare altamente idrofobica. Il comportamento dei ceppi appare sostanzialmente identico nei due terreni di coltura (SC e terreno di florizzazione) con qualche eccezione: l'idrofobicità dei ceppi M46, A51, V80 e V99 su terreno di florizzazione risulta essere notevolmente inferiore rispetto ai valori riscontrati su SC.



**Figura 34** . Idrofobicità su ottano. L'idrofobicità cellulare dei ceppi flor è stata misurata su terreno SC allo 0,1% di glucosio (blu) e su terreno di florizzazione (verde). I valori riportati per entrambe le prove rappresentano il grado di idrofobicità della superficie cellulare espresso come percentuale.

### Adesione a superfici plastiche

I risultati ottenuti (fig.35) dimostrano che i lieviti flor posseggono una elevata affinità nei confronti delle superfici di polistirene.



**Figura 35.** Adesione alle superfici plastiche. Adesione alle superfici di polistirene dei ceppi flor su terreno SC allo 0,1% di glucosio (grigio) e su terreno di florizzazione (blu). I valori riportati rappresentano le medie dei valori di assorbanza del cristal violetto (OD 570)

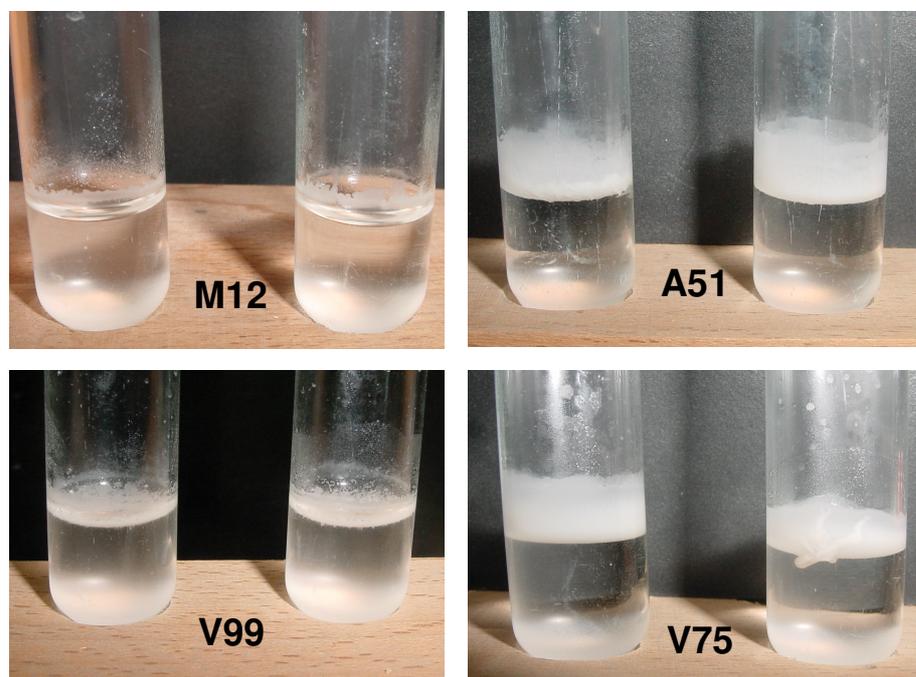
I ceppi in esame hanno raggiunto valori di assorbanza nettamente maggiori rispetto a quelli riportati in bibliografia per i ceppi aploidi e diploidi di laboratorio (Reynolds & Fink, 2001). Nel grafico i ceppi sono riportati secondo l'ordine crescente di dimensione delle zone intrageniche di *FLO11*.

Nella prova condotta su terreno SC, per i ceppi M12 e M23, nei quali si ha una lunghezza del gene di 3,2 Kb e zone interne di 900 bp, i valori di assorbanza riscontrati sono stati tra i più alti; il ceppo V80, nel quale *FLO11* e le sequenze ripetute misurano 6,1 e 3,1 Kb rispettivamente, possiede capacità adesive nettamente inferiori a quelle attese.

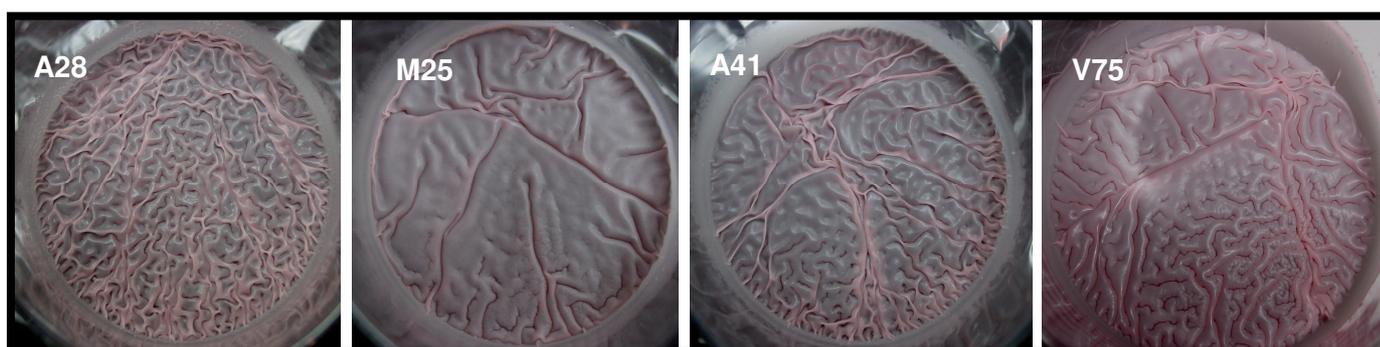
Nel grafico si può notare come le due curve a confronto, abbiano un andamento simile ma non identico. Nella prova su terreno di florizzazione sono stati ottenuti dei valori di assorbanza inferiori rispetto al test condotto su SC. Questo era un risultato atteso considerando che in 48 ore, i ceppi formano un biofilm sulla superficie del liquido e che i lavaggi con acqua rimuovono le cellule che non aderiscono alla plastica. Non tutti i ceppi hanno mostrato però lo stesso comportamento: infatti, M66, V30, V44, A51, V19 e A28, in entrambe le condizioni, mostravano una spiccata affinità nei confronti del polistirene. I valori di assorbanza rilevati su YNB + etanolo per i ceppi M12, A43, V16 e V99, sono stati invece particolarmente bassi. Ciò fa supporre, per questi ceppi, una maggiore attitudine a formare biofilm sulla superficie piuttosto che interagire con il polistirene.

### **Quantificazione del biofilm**

I risultati ottenuti con l'analisi del potere filmogeno su terreno sintetico, hanno evidenziato che ceppi diversi di *S.cerevisiae* possono formare biofilm diversi sia per morfologia (fig.36 B), sia per spessore (fig.36 A).



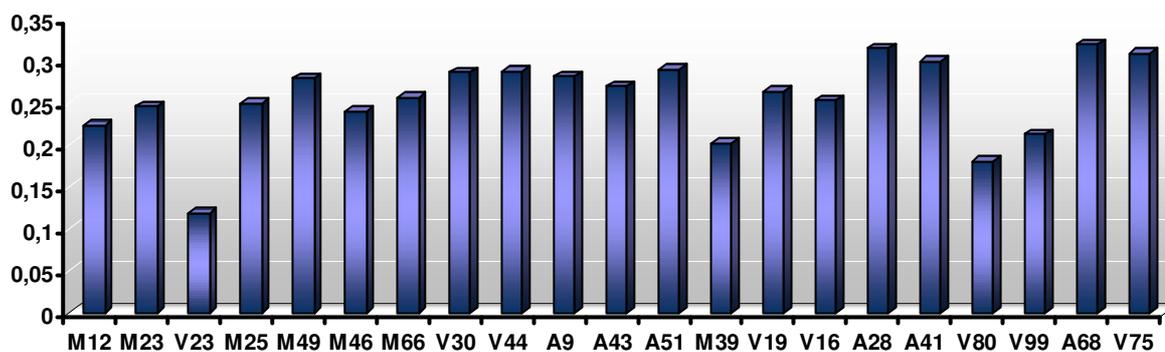
**Figura 36A.** Differenti capacità di formazione del biofilm su superficie liquida. I ceppi flor di *S. cerevisiae* M12 e V99 mostrano scarsa attitudine alla produzione di biofilm su terreno sintetico, mentre i ceppi A51 e V75 sono dei buoni produttori.



**Figura 36B.** Aspetto del biofilm formato su vino di quattro ceppi flor di *S. cerevisiae*.

Con lo scopo di quantificare i biofilm formati su superficie liquida dai ceppi oggetto di studio, le prove sono state ripetute impiegando maggiori volumi di terreno naturale (costituito da vino diluito al 50% con acqua sterile), nel

tentativo di incrementare la massa cellulare del biofilm. I biofilm sono stati raccolti dopo una settimana, filtrati e seccati in stufa. Il peso secco del biofilm è stato determinato per ciascun ceppo e i valori sono riportati nella figura sottostante.

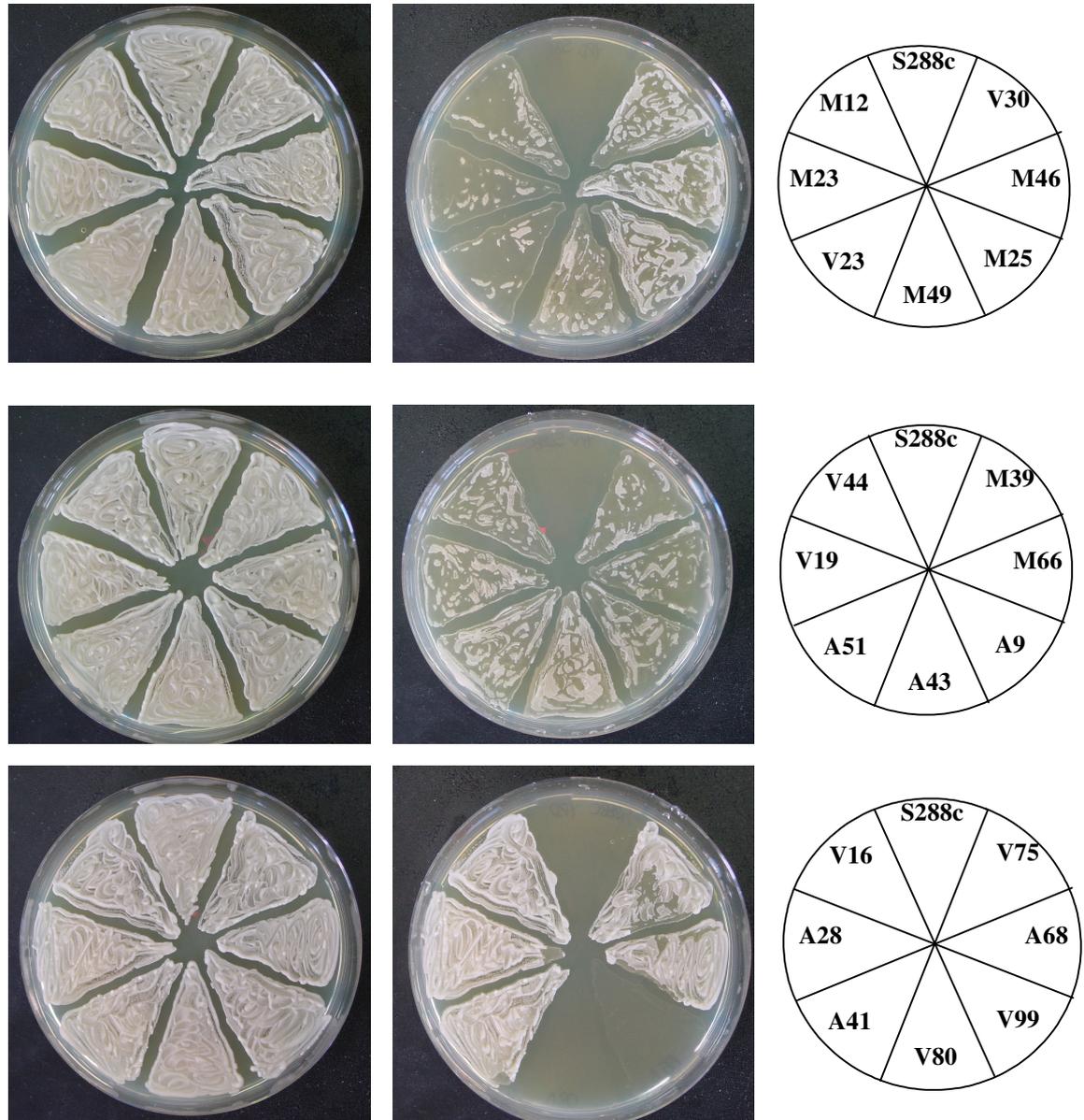


**Figura 37 . Quantificazione del biofilm formato su superficie liquida.** Il grafico mostra i valori, espressi in grammi, del peso secco dei biofilm formati nell'interfaccia aria-liquido dai ceppi flor di *S. cerevisiae*. L'ordine dei ceppi rispetta l'ordine crescente di dimensione delle zone ripetute del gene *FLO11*.

### Crescita invasiva e adesione all'agar

Per valutare le due componenti legate allo sviluppo invasivo, il comportamento dei ceppi flor è stato analizzato sia su terreno ricco agarizzato, sia su substrato costituito solo da acqua e agar al 2%. Tra i ceppi cresciuti per tre giorni su YEPD sono state riscontrate notevoli differenze di capacità di crescita invasiva che prescindono dalla dimensione del gene *FLO11* e dei domini ripetuti: i ceppi V80 e V99 pur possedendo zone ripetute lunghe (3,1 Kb), non sono invasivi al pari del ceppo S288c utilizzato come controllo negativo. Per i ceppi M12, M23 e V23 che posseggono sequenze interne di piccola taglia (0,9 Kb per M12 e M23 e 1,5 Kb per V23), l'intensità del fenomeno è risultata inferiore rispetto a quella determinata per gli altri ceppi con sequenze di lunghezza maggiore (fig.38). Nei ceppi V16, A28, A41, A68 e V75, per i quali sono state trovate le maggiori taglie di *FLO11*, i lavaggi con l'acqua non hanno asportato il materiale cellulare denotando una spiccata invasività delle

cellule. I risultati ottenuti con la prova di adesione all'agar confermano quanto osservato su terreno YEPD.

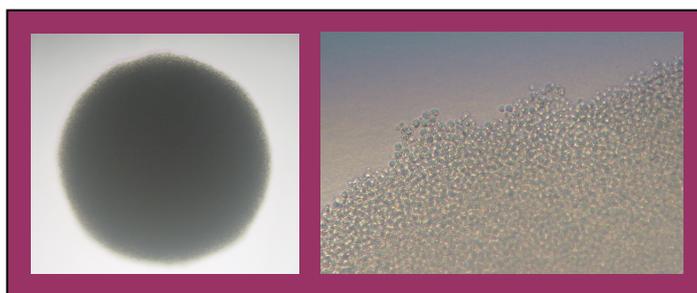


**Figura 38. Crescita invasiva in ceppi flor di *S. cerevisiae*.** I ceppi sono stati fatti coltivati per 3-5 giorni su terreno YEPD solido. Le piastre sono state lavate con acqua sterile e poste nuovamente in incubazione per due giorni. Il ceppo di laboratorio S288C è stato utilizzato come controllo negativo.

### **Sviluppo pseudoifale**

Per i ceppi oggetto di studio è stata valutata la capacità di differenziare pseudoife su terreno SLAD povero di fonti azotate (Gimeno *et al.*, 1992).

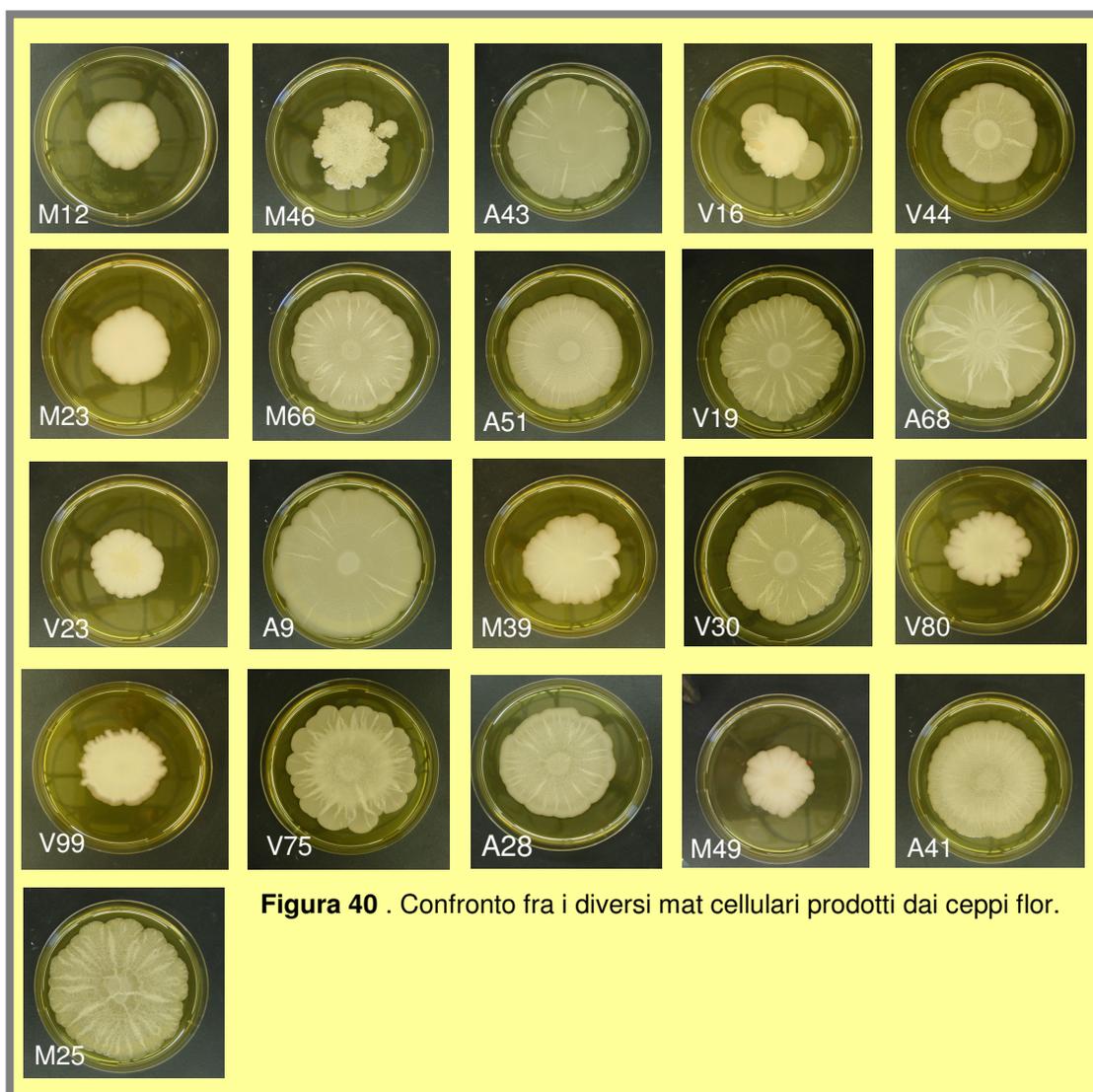
Dall'esame microscopico (fig.39) è emerso che nessuno dei ceppi analizzati è capace di formare pseudoife. Per questo motivo la prova è stata protratta più a lungo rispetto al protocollo riportato in bibliografia: le colonie sono state osservate a partire da una settimana di sviluppo e successivamente, a intervalli regolari di 4 giorni, sino a 30 giorni. Come si può notare in figura, ai margini delle colonie non compare nessun tipo di ramificazione cellulare che segnali la capacità del ceppo di formare pseudoife. Anche la forma delle cellule, nonostante il prolungato periodo di incubazione, non ha subito alcuna modifica e mostra un aspetto tipicamente lievitifforme.



**Figura 39. Aspetto delle colonie di ceppi flor cresciuti su terreno SLAD.** Ceppi flor di *S. cerevisiae* sono stati strisciati su terreno povero di fonti azotate per indurre lo sviluppo pseudoifale e incubati per sette giorni a 25 °C. L'aspetto delle colonie è stato osservato al microscopio.

### **Formazione del mat cellulare**

I ceppi inoculati al centro di piastre di YEPD allo 0,3% di agar, hanno prodotto mat cellulari di dimensioni variabili (fig.40). Variabile è stato anche l'aspetto dei mat su soft agar osservato al termine dei 14 giorni di crescita a 25 °C: le immagini mostrano come ogni ceppo abbia prodotto strutture morfologicamente distinte sia nei margini, più o meno frastagliati, sia nei raggi tubuliformi, più o meno fitti e contorti.



**Figura 40** . Confronto fra i diversi mat cellulari prodotti dai ceppi flor.

Sebbene sia stato dimostrato che la capacità di formare mat è *FLO11*-dipendente e che a una maggiore taglia del gene corrisponde un fenotipo più marcato (Reynolds and Fink, 2001), i risultati ottenuti in questo studio non consentono di rilevare una relazione lineare tra dimensione delle sequenze intrageniche e diametro dei mat. I ceppi M12, M23, V23, M46 e M49 con zone ripetute di dimensione ridotta (0,9; 0,9; 1500; 2000 e 1700 bp rispettivamente), hanno originato mat ridotti. Tuttavia, nei ceppi V16,

V80 e V99 con sequenze ripetute di notevole dimensione (2,7 Kb, 3,1 Kb, 3,1 Kb), sono stati osservati mat cellulari altrettanto piccoli.

### **Analisi di espressione di *FLO11* durante la formazione di biofilm**

Per indagare sull'esistenza di una possibile relazione tra espressione del gene *FLO11* e formazione di biofilm su superfici liquide, è stato analizzato il profilo di espressione di cinque ceppi flor nella fase di formazione del biofilm.

L'analisi è stata condotta confrontando i valori di espressione del gene *FLO11* in due condizioni differenti: su terreno ricco YEPD, nel quale è stato documentato tramite Northern blotting, che in ceppi flor naturali, *FLO11* è comunque espresso (Fidalgo *et al.*, 2006) e su terreno di florizzazione, costituito da YNB al 4% di alcol etilico.

#### **Scelta dei ceppi**

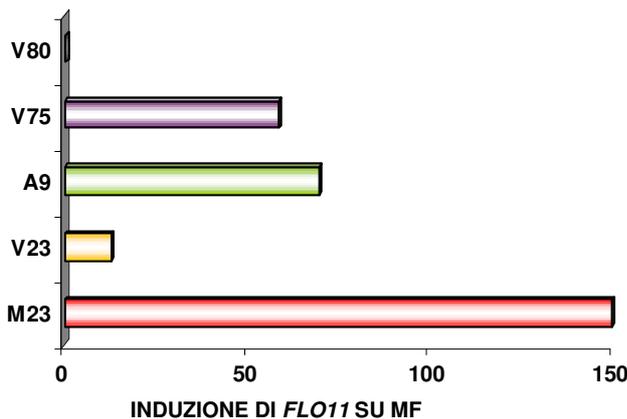
Tra tutti i ceppi analizzati sono stati individuati cinque ceppi flor da sottoporre ad analisi di espressione tramite qRT-PCR, che fossero rappresentativi della popolazione studiata. In particolare i ceppi M23 e V23, i cui geni misurano rispettivamente 3,1 e 3,5 Kb, mostrano dei fenotipi molto differenti: mentre per M23 sono stati registrati dei valori elevati di idrofobicità, di adesione al polistirene e di produzione di biofilm, in V23 tali valori sono nettamente inferiori. I ceppi V75 e V80 hanno invece una ORF di 5,6 e 6,1 Kb: tuttavia, se per V75 i fenotipi sono molto marcati, V80 presenta bassi valori di idrofobicità, una scarsa affinità per il polistirene, un mat poco esteso e una scarsa attitudine alla formazione di biofilm. La selezione dei ceppi M23, V23, A9, V75 e V80, è stata perciò determinata combinando i dati genetici e fenotipici relativi al gene *FLO11* fin'ora ottenuti (tabella 12).

CEPPI	FLO11 (kb)	ZONE RIP (kb)	IDROFOB. (%)	CV	MAT (cm)	PESO BIOF. (gr)
M23	3,1	0,9	91,77	0,965	4,9	0,2462
V23	3,5	1,5	74,35	0,346	4,7	0,119
A9	4,6	2,6	96,83	1,38	8	0,2822
V75	5,6	3,4	94,65	1,29	7	0,3088

V80	6,1	3,1	69,66	0,63	5	0,1812
-----	-----	-----	-------	------	---	--------

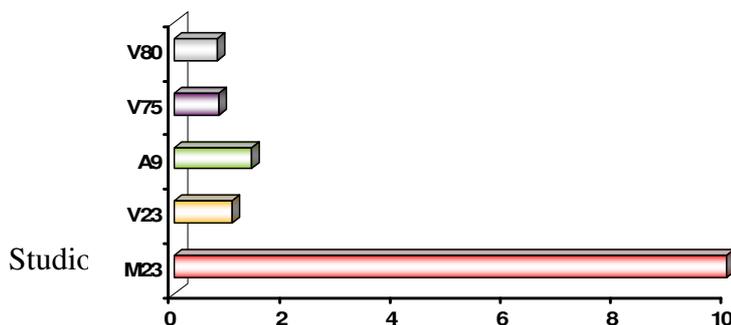
**Tabella 12.** Dimensione di *FLO11* e delle zone interne ripetute e risultati dei test fenotipici.

Come si può notare in figura 41, tra i ceppi testati esistono notevoli differenze dei valori nei livelli di espressione relativa di *FLO11*. Il valore più alto è stato rilevato per il ceppo in M23. I ceppi A9 e V75 hanno valori abbastanza simili tra loro (69,8 e 59 rispettivamente) mentre l'espressione relativa di V23 è decisamente inferiore (12,84). I risultati ottenuti con il ceppo V80, che mostra un valore livello di espressione estremamente basso (0,2), suggeriscono che il gene *FLO11* ha dei livelli di induzione simili su YEPD e su terreno di fiorizzazione.



**Figura 41 .** Induzione di *FLO11* su terreno di fiorizzazione (MF). I risultati sono stati normalizzati rispetto al gene housekeeping *ACT1*.

L'analisi trascrizionale di *FLO11* su YNB mostra che M23 presenta un livello di espressione che, normalizzato rispetto al valore di espressione del gene housekeeping *ACT1*, è pari a 10. A9, V23, V75 e V80 presentano livelli di espressione inferiori pari a 1,41, 1,05, 0,8 e 0,77 rispettivamente (fig.42).



**Figura 42.** Quantificazione dell'espressione assoluta del gene *FLO11* su terreno di fiorizzazione di *Saccharomyces cerevisiae* (M23, V23, A9, V75 e V80).

#### ESPRESSIONE ASSOLUTA SU MF

I risultati ottenuti indicano quindi differenze di espressione del gene *FLO11* tra i cinque ceppi studiati durante la fase di formazione del biofilm.

#### **Analisi del promotore del gene *FLO11***

L'analisi di espressione del gene *FLO11*, realizzata su cinque ceppi flor, ha fornito una chiave di lettura capace di spiegare la loro differente attitudine a formare biofilm.

Rispetto a quanto riportato in bibliografia per il gene *FLO1* (Verstrepen *et al.*, 2005), il polimorfismo di lunghezza di *FLO11* e delle zone intrageniche non giustificano le diversità fenotipiche rilevate tra i ceppi flor selvatici utilizzati in questo studio.

In un recente lavoro, Fidalgo *et al.* (2006) hanno osservato che il promotore di *FLO11* del ceppo flor 133d presenta una delezione di una regione precedentemente caratterizzata come URS (Rupp *et al.*, 1999).

Per questi motivi si è quindi provveduto a sequenziare i promotori dei ceppi M23, V23, A9 e V80 e a confrontare la loro sequenza con quella corrispondente del ceppo di laboratorio S288c e del ceppo flor 133d. Le regioni del promotore dei quattro ceppi flor e di S288c sono state amplificate per PCR e gli ampliconi sono stati visualizzati su gel di agarosio per individuare eventuali differenze di dimensione; i risultati ottenuti non hanno però consentito di osservare differenze di lunghezza tra gli ampliconi. I ceppi M23, V23, A9 e V80 sono quindi stati sottoposti ad analisi delle sequenze del promotore. Si è così osservato che i primi tre ceppi presentano nel promotore una delezione di circa 120 bp, oltre a una serie di mutazioni puntiformi. Nella sequenza del promotore del ceppo V80 invece, non è presente alcuna delezione ma solo mutazioni puntiformi. Inoltre, l'appaiamento delle sequenze dei promotori dei ceppi M23, V23 e A9 contro quella del promotore del ceppo flor 133d (Fidalgo

*et al.*, 2006), dimostra che la delezione riguarda la stessa regione del promotore.

## **Studio dei fenotipi adesivi *FLO11*-dipendenti in un ceppo genetico**

### **Scelta del ceppo genetico BY4742**

L'obiettivo di questa parte della ricerca era acquisire nuove conoscenze sull'impatto del polimorfismo di lunghezza di *FLO11* nella produzione di differenti tipologie di biofilm in *Saccharomyces cerevisiae*. Per la realizzazione di questo lavoro si è deciso di utilizzare il ceppo BY4742 come ospite per l'espressione dei tre differenti alleli di *FLO11*. BY4742 oltre a derivare dal ceppo S288c il cui genoma è stato interamente sequenziato ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)), presenta livelli endogeni dei trascritti di *FLO11* irrilevanti e non presenta alcuno dei fenotipi legati all'adesione cellulare (Liu *et al.*, 1996; Verstrepen *et al.*, 2004; Purevdorj-Gage *et al.*, 2007). La ragione di questo deficit funzionale è da imputare a una mutazione puntiforme a carico del gene *FLO8* in posizione 608 (laddove una adenina è sostituita da una guanina). *FLO8* codifica il fattore di trascrizione Flo8p, che agisce a valle della PKA promuovendo l'espressione di *FLO11*. Perciò una sovraespressione di *FLO11*, realizzata con il vettore di espressione pYES 2.1, dovrebbe conferire al ceppo proprietà adesive e la capacità di formare biofilm su superfici liquide.

### **Scelta degli alleli di *FLO11* da clonare in BY4742**

Verstrepen *et al.* (2005) hanno dimostrato che variazioni nel numero delle sequenze ripetute intrageniche di *FLO1* generano variabilità funzionale a carico della parete cellulare. Per comprendere se tale meccanismo potesse riguardare anche il gene *FLO11* sono stati scelti tre ceppi flor di *S. cerevisiae* (M23, V23 e A9) testati nella prima parte del lavoro per i caratteri tecnologici. Questi tre ceppi presentano differenti capacità adesive e si distinguono per la dimensione del gene *FLO11*. Le tre ORF di

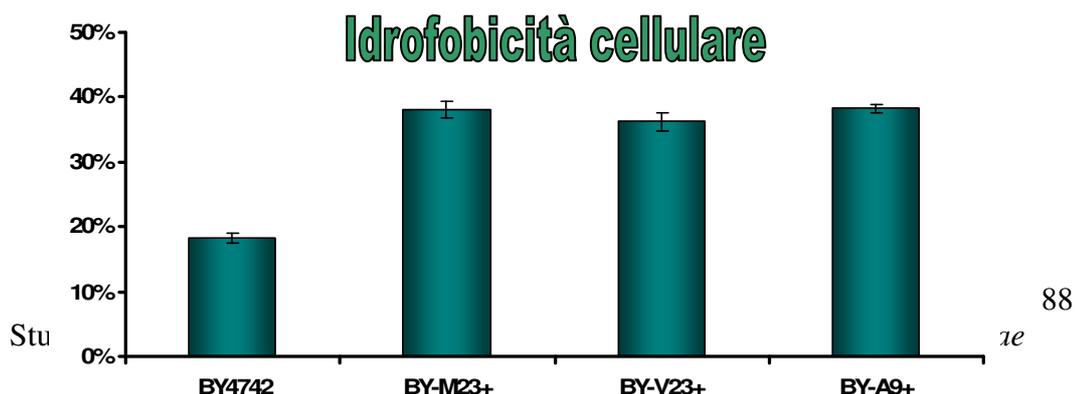
3,1 (M23), 3,5 (V23) e 4,6 (A9) kb, sono state clonate nel vettore di espressione pYES 2.1 sotto il controllo del promotore inducibile *GAL1*. I plasmidi ottenuti sono stati utilizzati per trasformare il ceppo BY4742. Sono stati così ottenuti i trasformanti BY-M23+, BY-V23+, BY-A9+. Questi trasformanti sono in grado di esprimere i differenti alleli di *FLO11* in terreni contenenti galattosio come unica fonte di carbonio e di silenziarli in terreni contenenti glucosio.

I trasformanti sono stati sottoposti all'analisi dei fenotipi correlanti con l'espressione di *FLO11*. Per tutti gli esperimenti si è deciso di utilizzare come controllo negativo di espressione i ceppi in crescita su glucosio. Tutti i test sono stati effettuati in triplo.

## Analisi fenotipiche dei trasformanti

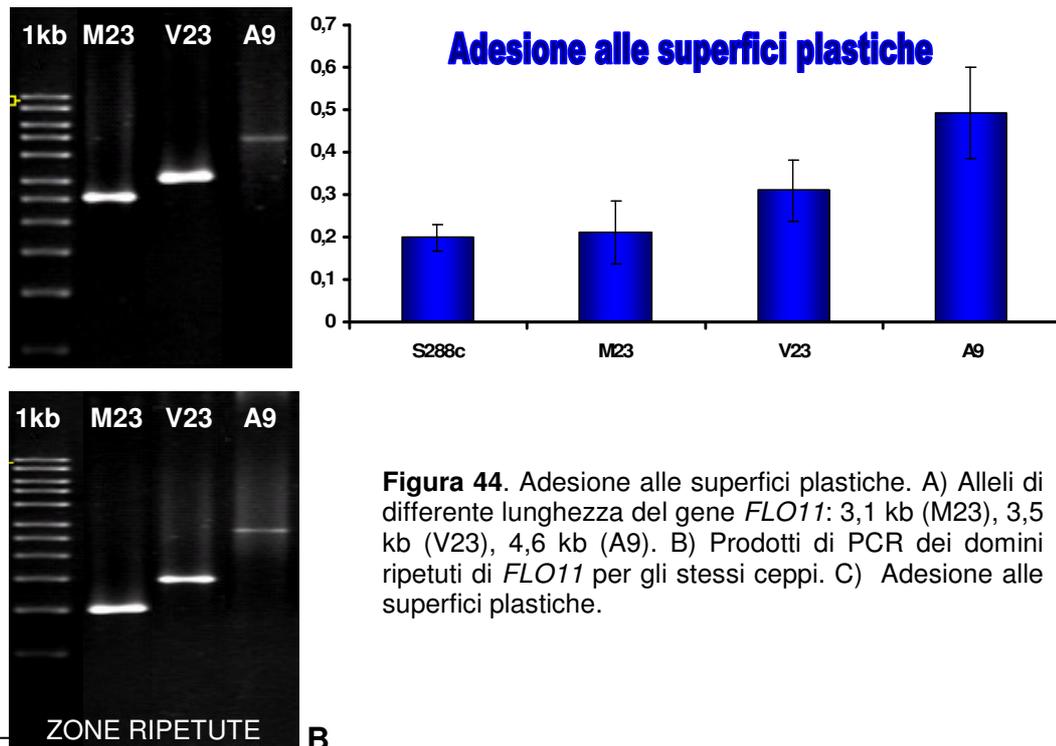
### Idrofobicità

La misura dell'idrofobicità dei trasformanti e del ceppo parentale BY4742 è stata ottenuta determinando per via spettrofotometrica la percentuale di cellule che si legano all'ottano come indicato da Reynolds and Fink (2001). Nel terreno impiegato per la prova (SC-URA), il galattosio ha sostituito il glucosio per consentire l'induzione di *FLO11*. Nei ceppi BY-M23+, BY-V23+ e BY-A9+ si è assistito a un raddoppio dei valori di idrofobicità (39%) rispetto ai risultati ottenuti per il ceppo parentale (18,5%) (fig.43). Tuttavia, non sono state rilevate differenze significative tra i trasformanti che esprimono alleli di differente lunghezza. Quando coltivati su glucosio (controllo negativo) gli stessi ceppi non hanno mostrato alcuna variazione di idrofobicità della superficie cellulare rispetto al ceppo parentale BY4742.



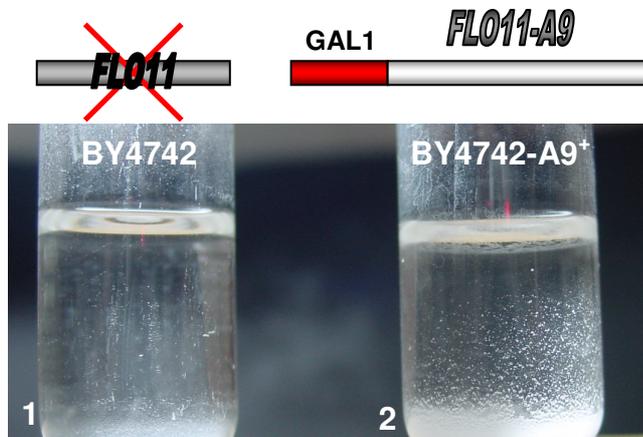
**Figura 43.** Analisi di idrofobicità cellulare del ceppo di laboratorio BY4742 e dei tre trasformanti

trasformanti BY-M23+, BY-V23+ e BY-A9+ sono stati testati, in parallelo al ceppo parentale BY4742, su piastre microtiter di polistirene come indicato da (referenza). Per i ceppi cresciuti su terreno contenente galattosio è stata rilevata una correlazione lineare tra dimensione del gene e intensità del fenomeno (fig.44). In particolare si osservato che ad un incremento di dimensioni del gene (che contiene più sequenze ripetute) è corrisposto un aumento di adesione alla plastica.



## Formazione di biofilm in liquido

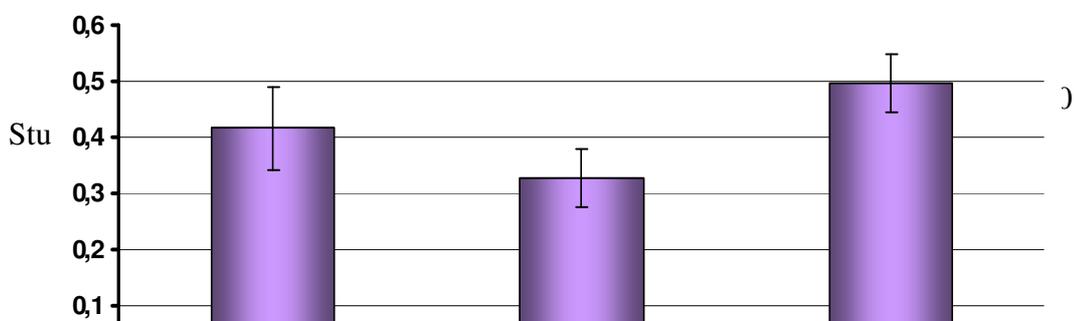
La formazione di biofilm è stata valutata per i trasformanti BY-M23+, BY-V23+, BY-A9+ e per il parentale BY4742, su terreno minimo YNB al 4% di etanolo, con aggiunta degli aminoacidi necessari e del 2% di galattosio per consentire l'induzione dell'espressione di *FLO11*. Per tutti i ceppi è stato previsto un controllo negativo: nel terreno utilizzato per la precoltura è stato impiegato il glucosio mentre nel terreno di florizzazione era assente qualsiasi zucchero. Dopo circa 48 ore dall'inizio della prova, sul terreno di florizzazione i ceppi BY-M23+, BY-V23+ e BY-A9+ hanno formato un sottile velo. Nel ceppo BY4742 non è stata osservata né la comparsa di biofilm né un principio di risalita delle cellule del fondo verso la superficie (anche dopo sette giorni), mentre nei tre trasformanti oltre alla formazione di un debole velo, è stata notata la presenza di cellule in sospensione (fig.45).



**Figura 45.** Formazione di biofilm in liquido. Formazione del biofilm nel trasformatore BY-A9+ (2) in seguito all'overespressione del gene *FLO11* derivato dal ceppo flor naturale A9 rispetto al BY4742 parentale (1).

Successivamente è stata quantificata la produzione del biofilm da parte dei trasformanti (fig. 46).

### PRODUZIONE DI BIOFILM



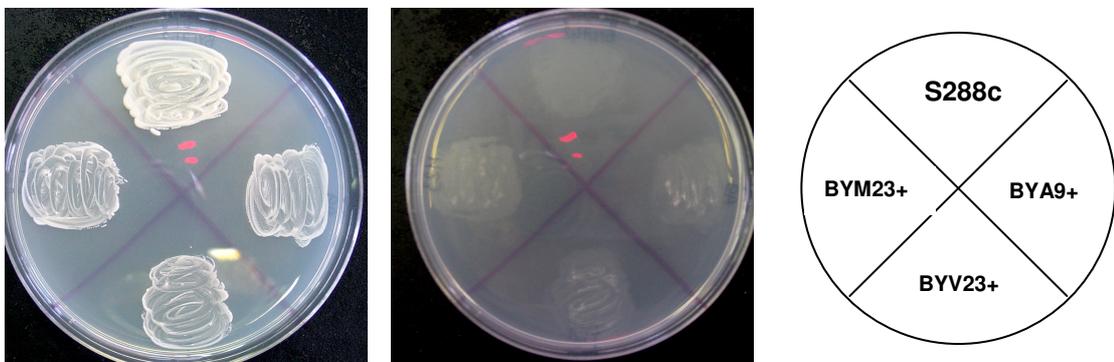
peso  
biofilm  
(mg)

**Figura 46.** Produzione di biofilm dei tre trasformanti

Come si può notare in figura 46, mentre in BY-M23+ e BY-A9+ la produzione di biofilm aumenta con l'aumentare della dimensione di *FLO11*, in BY-V23+ la quantità di biofilm rilevata è risultata inferiore rispetto alle attese.

### Crescita invasiva

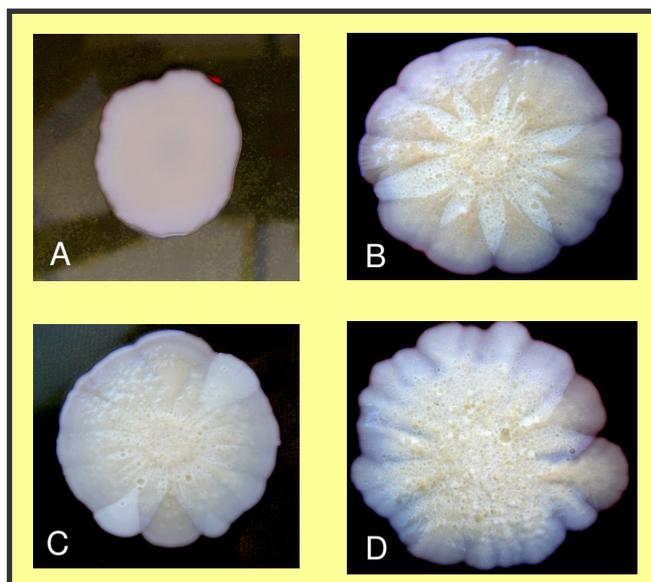
I trasformanti BY-M23+, BY-V23+ e BY-A9+ e il ceppo S288c usato come controllo negativo, sono stati inoculati su terreno SC-URA contenente il 2% di galattosio (il ceppo parentale BY4742 è stato testato su piastre di SC+Ura, a causa dell'auxotrofia per l'aminoacido uracile). Dopo cinque giorni i ceppi sono stati sottoposti a lavaggio con acqua sterile. Come si può osservare in figura 47, la rimozione dei trasformanti e di S288c dalla superficie agarizzata è stata totale. Nessun ceppo trasformante ha aderito al terreno e non sono state rilevate differenze associabili alla dimensione di *FLO11*.



**Figura 47. Crescita invasiva.** I ceppi trasformanti e il ceppo di laboratorio S288c impiegato come controllo negativo, sono stati strisciati su terreno SC – uracile + galattosio e incubati a 30 °C per cinque giorni. La piastra è stata fotografata prima (crescita totale) e dopo il lavaggio con acqua (crescita adesiva). Le cellule incapaci di aderire sono state asportate dalla superficie dell'agar.

### Formazione del mat cellulare

La formazione del mat del ceppo parentale BY4742 e dei trasformanti BY-M23+, BY-V23+ e BY-A9+ è stata testata su YEPG allo 0,3% di agar, per consentire l'induzione di *FLO11* sotto il controllo del promotore *GAL1*. In BY4742 l'incapacità di esprimere il gene *FLO11* si traduceva in nella produzione di un mat privo di struttura e con margini lisci. I trasformanti, invece oltre formare mat di maggiori dimensioni rispetto al parentale, differenziavano una struttura complessa nella quale era possibile distinguere una parte centrale e dei raggi dal centro alla periferia del complesso multicellulare; inoltre i margini del mat apparivano frastagliati e privi di struttura (lisci) (fig.48).



**Figura 48 . Struttura del mat.** BY4742 (A) BY-M23+ (B), BY-V23+ (C) e BY-A9+ (D).

## Identificazione

La selezione di ceppi, i controlli di produzione, di commercializzazione e di utilizzo degli starter, così come la realizzazione ed il mantenimento di collezioni di ceppi autoctoni, implicano la necessità di poter differenziare tra loro i ceppi di *S. cerevisiae*. La differenziazione inizia proprio con la corretta identificazione della specie, che l'avvento degli strumenti molecolari ha reso più rapida e meno soggetta a controversie rispetto ai metodi tradizionali.

Lo sviluppo dei metodi molecolari ha modificato in modo radicale le metodiche di identificazione, che sono attualmente basate sul confronto del DNA (nucleare o mitocondriale) di organismi da identificare con quello di microrganismi identificati, e permettono di raggiungere in tempi brevi risultati più affidabili.

Infatti, i metodi di tassonomia classica, basati sull'analisi delle caratteristiche morfologiche, fisiologiche, biochimiche, modalità di riproduzione vegetativa e nella valutazione della presenza e persistenza degli aschi, numero e forma delle spore, che vengono comparate con quelle di organismi già identificati, risultano dispendiosi in termini di tempo e non sempre consentono di raggiungere l'obiettivo della corretta attribuzione della specie. I caratteri analizzati sono fortemente influenzati dallo stato fisiologico degli isolati, dalle condizioni colturali o da eventi mutazionali; in particolare questi ultimi possono avere un ruolo determinante nel caso in cui i caratteri considerati siano sotto controllo unigenico per cui è sufficiente una singola mutazione per modificare la

risposta del microrganismo per il carattere considerato (Deak, 1993; Fernandez *et al.*, 1999; Hierro *et al.*, 2004).

L'utilizzo di metodi molecolari è ormai inevitabile per l'identificazione dei lieviti vinari, poiché l'amplificazione per PCR di frammenti del genoma, seguita in alcuni casi dall'analisi di restrizione, costituisce un eccellente strumento per la discriminazione delle specie di lievito più frequentemente isolate in condizioni enologiche. Diversi studi hanno dimostrato la validità dell'utilizzo dei pattern di restrizione dei geni che codificano per l'RNA ribosomiale per la discriminazione a livello di specie dei microrganismi (White *et al.*, 1990; Guillaumon *et al.*, 1998; Granchi *et al.*, 1999; Esteve Zarzoso *et al.*, 1999; Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Esteve Zarzoso *et al.*, 2004; Hierro *et al.*, 2006).

La tecnica PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) applicata in questo studio ha permesso di attribuire senza difficoltà l'insieme dei ceppi oggetto di analisi alla specie *Saccharomyces cerevisiae*. Infatti, nella prima fase di analisi l'amplificazione della regione ITS1, compresa tra i geni che codificano per il DNA ribosomiale, ha prodotto l'amplicone di 850 bp per il 95% dei ceppi mentre per il restante 5% è stato ottenuto un amplicone di 880 bp, entrambi ascrivibili al genere *Saccharomyces* (Guillaumon *et al.*, 1998; Esteve Zarzoso *et al.*, 1999; Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Esteve Zarzoso *et al.*, 2004). L'analisi di restrizione ha invece permesso l'attribuzione dei ceppi alla specie. In particolare, come noto dalla letteratura (Withe *et al.*, 1990; Guillaumon *et al.*, 1998; Granchi *et al.*, 1999; Esteve Zarzoso *et al.*, 1999; Esteve Zarzoso *et al.*, 2004), le endonucleasi di restrizione che hanno permesso la discriminazione sono state *HaeIII* e *CfoI*. Il primo enzima, che taglia tre volte i prodotti di PCR, origina 2 profili di 4 bande ciascuno, mentre con *CfoI* è stato possibile individuare 2 diversi profili di tre bande: un pattern è risultato identico al ceppo CBS1171, mentre il secondo profilo è in accordo con quanto riportato in bibliografia per i ceppi flor (Fernandez-Espinar *et al.*, 2000). Al contrario l'enzima *HinfI* non ha discriminato all'interno del genere; sono infatti stati ottenuti profili uguali in tutti ceppi

oggetto di indagine e nei tre ceppi tipo di riferimento (Guillamòn *et al.*, 1998; Esteve Zarzoso *et al.*, 1999). Tra i ceppi provenienti da biofilm di vini Sherry, vari autori riportano l'esistenza di una delezione di 24 bp sulla regione ITS1 comune a tutti i ceppi flor depositati nella Spanish Type Culture Collection (CETC) (Esteve Zarzoso *et al.*, 1999; Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Naumova *et al.*, 2004). Secondo Fernandez-Espinar *et al.*, (2000) le condizioni stressanti subite dai ceppi flor, hanno favorito la comparsa di questa mutazione la quale conferisce al lievito una elevata fitness in presenza di alte concentrazioni di etanolo. Considerando che i pattern di restrizione ottenuti in questo studio per i ceppi flor sardi coincidono con i profili osservati da Esteve Zarzoso *et al.*, (1999), Fernandez-Espinar *et al.*, (2000), Naumova *et al.*, (2004), è ipotizzabile che la delezione di 24 bp, sia presente anche nei ceppi oggetto di questo lavoro. È tuttavia necessario supportare tale ipotesi con un'analisi delle sequenze della regione ITS.

## **Caratterizzazione tecnologica**

### **Potere filmogeno**

Al termine della fermentazione alcolica i lieviti flor della specie *S. cerevisiae* sono capaci di formare sulla superficie del vino un biofilm più o meno esteso. La formazione di questo "velo" determina l'invecchiamento biologico di alcuni vini tipo-Sherry e comporta importanti cambiamenti delle caratteristiche del vino (Martinez *et al.*, 1987 a; 1987 b).

Più autori hanno suggerito che la formazione del biofilm rappresenta una risposta di adattamento a un ambiente ostile (Budroni, 1995; Martinez *et al.*, 1995; Querol *et al.*, 2003; Infante *et al.*, 2003; Fidalgo *et al.*, 2006). L'assenza di fonti carboniose fermentescibili, di sostanze azotate e l'elevato grado alcolico, rappresentano condizioni stressanti alle quali il lievito flor risponde adottando un metabolismo ossidativo, principalmente a spese dell'etanolo.

L'abilità di risalire sulla superficie del liquido e di formare il "flor" è associata a una serie di cambiamenti a livello cellulare (Martinez et al., 1997). È stato dimostrato che le cellule del biofilm aumentano le loro dimensioni e assumono una forma allungata rispetto alle stesse cellule durante la fase di fermentazione e che l'incremento di idrofobicità della parete cellulare, dovuto alla sintesi di proteine idrofobiche, è in relazione con il fenotipo biofilm (Fidalgo et al., 2006). Tra i ceppi analizzati è stato possibile osservare differenti comportamenti nella produzione di biofilm. In particolare sono stati individuati dei buoni produttori di biofilm e dei cattivi produttori di biofilm. Tuttavia occorre sottolineare che le prove di florizzazione sono state svolte su terreno sintetico e in tubi di saggio con volumi ridotti. Per tale ragione, una valutazione più accurata dovrà valutare il comportamento filmogeno dei ceppi su terreno naturale.

### **Sviluppo a temperature controllate**

I risultati ottenuti dalle prove di sviluppo a temperature controllate mostrano che la totalità dei ceppi analizzati si comporta per questo carattere in maniera differente rispetto a quanto riportato per i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*. Infatti, l'attuale tassonomia suddivide i lieviti appartenenti al raggruppamento dei *Saccharomyces sensu stricto* anche sulla base del comportamento rispetto alla temperatura: *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* sono in grado di sviluppare oltre i 37 °C e hanno temperature ottimali intorno ai 30 °C, mentre *S. bayanus* e *S. pastorianus* non danno sviluppo a temperature maggiori di 37 °C e le temperature ottimali sono inferiori a 30 °C (Bardi, 2005). La popolazione dei ceppi flor studiata in questo lavoro si distingue per l'abilità di sviluppare alle tre temperature testate.

Lo sviluppo a temperature controllate, in particolare la capacità di sviluppare ad alte temperature e quella di sviluppo a basse temperature, è uno dei parametri che rientra nei protocolli di pre-selezione di ceppi starter (Regodon et al., 1997; Caridi et al., 2002). Questo parametro è importante in fermentazione: in particolare la capacità di resistere ad alte temperature

è direttamente correlata con la capacità di adattamento alle alte temperature (Bardi, 2005; Nikolaou *et al.*, 2006). Infatti, in condizioni tecnologiche che non prevedono il controllo della temperatura, l'utilizzazione di ceppi non resistenti alle alte temperature può portare ad arresti di fermentazione. Il fatto che il 100% dei ceppi testati in questo lavoro cresce bene a 37 °C, è sicuramente un dato importante nel nostro programma di selezione di starter per la produzione di vini florizzati DOC. Invece, la possibilità di avere un gruppo di lieviti in grado di sviluppare bene a basse temperature è importante qualora si volessero selezionare starter da impiegare in fermentazioni a basse temperature al fine di indagare l'eventuale capacità dei ceppi di portare a termine processi fermentativi a 18-20°C, temperature di vinificazione che danno maggiori garanzie per la produzione di profumi e aromi preesistenti nel mosto. Tuttavia sarà necessario valutare il comportamento dei ceppi in fase di fermentazione per confermare la loro capacità di portare a termine il processo fermentativo in diverse condizioni di temperatura.

### **Produzione di idrogeno solforato**

La produzione di H<sub>2</sub>S è legata alla formazione di odori sgradevoli, che permangono nel vino nel quale è percepito come odore di "ridotto" o di "uova marce". È pertanto indispensabile evitare i ceppi che col loro metabolismo ne producono grandi quantità (Romano, 2005).

Il meccanismo di produzione dei composti solforati non è ancora ben noto (Spiropoulos e Bisson, 2000; Vasserot *et al.*, 1997), comunque si tratta del prodotto di reazioni metaboliche, enzimatiche e non, che determinano trasformazioni chimiche, spesso influenzate dalla temperatura di fermentazione. I principali composti dello zolfo presenti nei vini sono solfiti e idrogeno solforato, che derivano dalla riduzione dei solfati presenti nel mosto per azione dei lieviti, che sintetizzano gli aminoacidi solforati a partire dai solfati (Rauhut, 1993). I solfati vengono prima assorbiti dalle cellule di lievito per mezzo di una permeasi specifica, e poi vengono ridotti prima a solfiti e poi per mezzo della solfito riduttasi ad H<sub>2</sub>S, che costituisce

il prodotto iniziale della seconda fase di biosintesi degli aminoacidi solforati, metionina e cisteina. I lieviti ne utilizzano solo una parte, mentre l'altra viene rilasciata nel mezzo (Jiraneck *et al.*, 1994). L'entità di H<sub>2</sub>S è fortemente legata alle caratteristiche metaboliche dei ceppi e dei mosti (Henschke *et al.*, 1991; Jiraneck *et al.*, 1994 Mendes-Ferreira *et al.*, 2001). Per tale ragione è fondamentale affiancare, alla determinazione della quantità prodotta su Biggy-agar, l'entità della produzione in mosto per selezionare i ceppi da utilizzare come starter in fermentazione.

I risultati ottenuti indicano che i ceppi analizzati non sono particolarmente attivi nella liberazione extracellulare di H<sub>2</sub>S, che influisce negativamente sulle caratteristiche organolettiche dei vini; il valore soglia di accettabilità varia da 50 a 80 µg/l e si tratta una soglia di percezione molto bassa. Sono infatti sufficienti tracce del composto per compromettere la qualità finale del vino. La crescita su Biggy-agar ha evidenziato che nessun ceppo tra quelli testati ha una forte produzione in piastra di H<sub>2</sub>S, non essendo state osservate colonie di colore marrone scuro. La maggior parte dei ceppi (95%) ha invece mostrato una produzione media del composto, mentre il restante 5% è caratterizzato da una bassa produzione di idrogeno solforato.

### **Fermentazione e assimilazione degli zuccheri galattosio e maltosio**

L'utilizzazione differenziale dei carboidrati come fonti di carbonio ed energia rappresenta uno dei caratteri più importanti nell'identificazione dei lieviti a livello di specie. Sebbene i saggi per la fermentazione e l'assimilazione dei carboidrati siano di tipo qualitativo, essi forniscono una indicazione puntuale sulla capacità di una coltura pura di lievito di impiegare lo zucchero in esame come unica fonte di carbonio (Martini, 2005).

I lieviti flor sono stati ormai da tempo inseriti all'interno della specie *Saccharomyces cerevisiae* (Kurtzman and Fell, 1998). In precedenza, alcuni autori avevano differenziato i ceppi flor in quattro razze fisiologiche, in base alle loro capacità di fermentare vari zuccheri (galattosio, destrosio,

lattosio, maltosio, melibiosio, raffinoso e saccarosio) (Martinez *et al.*, 1995; Ibeas *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 1997 a,b). Successivi studi di caratterizzazione molecolare (condotte con l'analisi dei profili di restrizione del DNA mitocondriale), hanno permesso di escludere una relazione tra profilo di restrizione e proprietà fisiologiche (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2003).

In un recente studio condotto da Budroni *et al.* (2005), il confronto tra due popolazioni di lieviti flor e lieviti vinari non-flor, ha rivelato che una significativa differenza tra questi due gruppi è relativa alla capacità di fermentare e assimilare gli zuccheri galattosio e maltosio. Le analisi effettuate sui ceppi oggetto di studio, in accordo con i risultati di Budroni e collaboratori, hanno confermato che la maggior parte dei lieviti flor è incapace di utilizzare il galattosio e il maltosio (fenotipi *GAL<sub>0</sub>* e *MAL<sub>0</sub>*).

L'incapacità di fermentare e/o assimilare il galattosio potrebbe essere causata da mutazioni a carico dei geni *GAL7* e *GAL10*, localizzati sul cromosoma II (Johnston *et al.*, 2000).

Nei ceppi vinari è stata dimostrata l'esistenza di due loci *MAL* (*MAL1* e *MAL3*), localizzati sui cromosomi VII e II (Naumov *et al.*, 1994). La perdita della capacità di utilizzare il maltosio è stata osservata nel 74% dei ceppi flor. Considerando che i lieviti flor producono elevate concentrazioni di acetaldeide durante l'invecchiamento biologico, e che tale fenomeno provoca sia DSBs, sia riarrangiamenti cromosomali, si può ipotizzare che i fenotipi *GAL<sub>0</sub>* e *MAL<sub>0</sub>* siano una conseguenza dei danneggiamenti del DNA causati da eccessive quantità di acetaldeide.

### **Potere fermentativo**

Il 98% dei ceppi analizzati ha la capacità di produrre % di etanolo (v/v) comprese tra 14 e 18%: particolarmente importante il risultato ottenuto per lo scopo del nostro lavoro, considerato il fatto che le uve di Vernaccia hanno tendenzialmente elevate concentrazioni zuccherine e che il quantitativo minimo di alcol richiesto dal disciplinare di produzione della DOC è di 15° (v/v). La produzione di alcol è un carattere variabile dipendente dal ceppo, è legato in modo particolare alla tolleranza dei

lieviti nei confronti dello stesso etanolo che insieme ad altri fattori, come la presenza di zuccheri e microelementi, ne influenzano il livello di produzione (Romano, 2005).

I ceppi vinari della specie *Saccharomyces cerevisiae* mostrano quasi sempre un elevato potere fermentativo. All'interno della specie i livelli di etanolo prodotti variano tra 8 e 23° e tale variabilità è funzione anche della zona di origine, infatti i ceppi provenienti da mosti di regioni più calde, quindi con alto tenore zuccherino, risultano più alcoligeni rispetto a quelli provenienti da mosti di regioni più fredde (Romano, 2005).

### **Vigore fermentativo**

Questo carattere è una misura della capacità di un ceppo di adattarsi rapidamente al mezzo e di prendere il sopravvento sugli altri microrganismi presenti. Il vigore fermentativo dipende dal metabolismo generale delle cellule e si è dimostrato stabile nel tempo; tuttavia, non essendo legato a un biochimismo preciso, è difficile da controllare geneticamente (Zambonelli, 2003). Anche questo carattere è incluso tra i caratteri fondamentali nei protocolli di selezione degli starter (Gardner *et al.*, 1993; Giudici e Zambonelli, 1992; Romano e Suzzi, 1993; Regodon *et al.*, 1997; Zambonelli, 2003; Caridi *et al.*, 2002; Romano, 2005).

Una buona percentuale dei ceppi analizzati (43%) ha mostrato un ottimo vigore fermentativo con un calo medio di CO<sub>2</sub> nettamente al di sopra del limite inferiore di 0,2 g/l riportato in letteratura (Pérez-Coello *et al.*, 1999) per la selezione di ceppi con una buona energia di fermentazione.

### **Potere schiumogeno**

La maggior parte dei ceppi analizzati produce schiuma durante il processo fermentativo; l'entità della produzione è risultata variabile e mediamente alta nel 30% dei ceppi analizzati che raggiungono i livelli più alti (**C** e **C+**) all'interno della scala utilizzata per stimarne la produzione. È interessante notare come circa il 60% dei ceppi testati produca bassissime quantità di schiuma. Infatti, la selezione di candidati starter all'interno del gruppo di

ceppi analizzati va rivolta verso quelli che per il carattere hanno mostrato i valori più bassi a parità di altri caratteri. Il carattere rientra da sempre fra quelli ritenuti convenzionali negativi, nei protocolli di selezione di starter (Delfini e Ciolfi, 1979; Gardner *et al.*, 1993; Giudici e Zambonelli, 1992; Romano e Suzzi, 1993; Regodon *et al.*, 1997; Zambonelli, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000; Caridi *et al.*, 2002). La produzione di schiuma ha, infatti, ripercussioni negative nella gestione delle fermentazioni, causa perdite di prodotto e difficoltà nel mantenimento delle idonee condizioni di pulizia e igiene in cantina. La composizione del mezzo di fermentazione è in grado di influire sull'entità della schiuma che si forma in fermentazione, in particolare i composti proteici e peptidici, le sostanze gommose e i composti tensioattivi presenti nel mosto.

### **Scelta dei ceppi con le migliori caratteristiche tecnologiche**

In base ai risultati ottenuti in laboratorio sono stati scelti 16 ceppi in funzione delle loro caratteristiche tecnologiche. In particolare, il primo criterio di selezione ha tenuto conto del potere fermentativo e del vigore fermentativo: infatti, considerando che le uve di Vernaccia producono elevate concentrazioni zuccherine, e che il quantitativo minimo di alcol richiesto dal disciplinare è di 15° (v/v), i ceppi scelti sono tutti alto-produttori di etanolo. Inoltre, considerando che l'importanza della capacità dei lieviti di conquistare rapidamente il mezzo influisce sui tempi di fermentazione, i ceppi selezionati mostrano un ottimo vigore fermentativo con valori compresi tra 0,9 e 1,1 grammi di produzione media giornaliera di CO<sub>2</sub>.

Nel secondo criterio di selezione sono state considerate la produzione di schiuma e di idrogeno solforato. I ceppi individuati producono scarse quantità di schiuma (la maggior parte forma un anello nel tubo di saggio) e sono medio-bassi produttori di H<sub>2</sub>S.

## **Caratterizzazione molecolare**

La caratterizzazione molecolare del presente lavoro è volta alla biotipizzazione dei ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae* isolati dai vini florizzati (Vernaccia, Malvasia e Arvisionadu), ovvero alla differenziazione dei ceppi all'interno della specie di appartenenza (Mannazzu e Budroni, 2005).

L'importanza della biotipizzazione all'interno della specie è fondamentale in enologia per gli studi della biodiversità dei *S. cerevisiae* associati all'ambiente cantina e per valutare l'esistenza di ceppi specifici di determinate aree.

In questo lavoro la caratterizzazione molecolare è stata fatta con i marcatori molecolari minisatelliti. I minisatelliti appartengono al gruppo degli SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*), insiemi di sequenze ripetute che mostrano variazioni di lunghezza e i cui differenti alleli contengono quantità diverse di unità ripetitive, nei minisatelliti o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) l'unità ripetitiva è lunga fino a 25 bp e forma raggruppamenti fino a 25 kb (Brown, 1999).

Recentemente è stata scoperta la presenza di minisatelliti in alcuni geni di parete di *S. cerevisiae* che si comportano come siti di ricombinazione genica e causano polimorfismo di lunghezza dei geni stessi (Bishop *et al.*, 2000; Mannazzu *et al.*, 2002; Marinangeli *et al.*, 2004), pertanto possono essere utilizzati come bersagli molecolari per la caratterizzazione mediante PCR-*fingerprinting* dei lieviti vinari.

I quattro geni di parete di *S. cerevisiae* amplificati, *AGA1*, *DAN4*, *HSP150* e *SED1* si sono rivelati un ottimo strumento di caratterizzazione. In accordo con Marinangeli *et al.* (2004) è stata confermata la presenza, all'interno delle ORFs dei geni amplificati, di minisatelliti che creano variazioni di lunghezza negli amplificati ottenuti da ceppi diversi. L'unica eccezione è rappresentata dal ceppo V3 isolato da Vernaccia per il quale non è stato individuato alcun amplicone per il gene *AGA1*.

*AGA1* è un gene localizzato sul cromosoma XIV e codifica per una delle due subunità che compongono la **a**-agglutinina. Le **a**- e  $\alpha$ -agglutinine sono glicoproteine di parete prodotte dalle cellule **a** ed  $\alpha$  di *Saccharomyces*

*cerevisiae*, le quali interagiscono l'una con l'altra durante la coniugazione per favorire l'adesione delle cellule di "mat" opposto, le interazioni tra le due agglutinine sono altamente specie-specifiche (Burke *et al.*, 1981; Boeke *et al.*, 1984; Roy *et al.*, 1991). L' *a*-agglutinina è composta da una proteina di parete di 73 kDa (il prodotto genico di *AGA1*) (Roy *et al.*, 1991) e da un piccolo peptide di 69 aminoacidi che contiene un ponte di-zolfo (prodotto genico di *AGA2*) (Watzel *et al.*, 1988; Cappellaro *et al.*, 1991; Cappellaro *et al.*, 1994), la sua sintesi è indotta da un feromone prodotto dal partner di mating opposto (Betz *et al.*, 1978; Fehrenbacher *et al.*, 1978; Doi *et al.*, 1979; Yanagishima, 1984). *AGA1* è il gene che non ha mostrato variabilità, infatti il 100% dei ceppi analizzati ha presentato un amplicone di 1180 bp. Questo target molecolare rivela l'esistenza di una assoluta stabilità di sequenza all'interno del gruppo di ceppi autoctoni isolati da vini florizzati sardi.

*DAN4* è localizzato sul cromosoma X e appartiene al gruppo di geni *DAN/TIR*, che codificano per mannoproteine di parete, e vengono espressi in condizioni di anaerobiosi (Sertil *et al.*, 1997; Abramova *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2001). L'amplificazione di *DAN4* ha generato 6 diversi prodotti, di taglia compresa tra 1050 e 1600 bp (1050; 1200; 1250; 1400; 1450; 1600). La capacità di questo gene di caratterizzare i ceppi vinari all'interno della popolazione analizzata è da considerare alta: infatti sono stati ottenuti 6 diversi profili, tre dei quali a due bande. Per tale motivo, l'attività di espansione e contrazione dei minisatelliti all'interno del gene *DAN4*, consente di utilizzare il gene come marcatore molecolare per la biotipizzazione all'interno della specie considerata (Marinangeli *et al.*, 2004).

*HSP150* è localizzato, come *DAN4*, sul cromosoma X. *HSP150* appartiene al gruppo di geni che codificano per le "heat shock protein", in particolare codifica per una glicoproteina regolata da "heat stress", O-glicosilata e secreta nel mezzo di sviluppo del microrganismo (Russo *et al.*, 1991). L'amplificazione del gene ha fornito 1 solo prodotto di 890 bp. Perciò,

questo marcatore, insieme al gene *AGA1*, non consente di discriminare all'interno della popolazione di ceppi flor analizzata.

*SED1* è localizzato sul cromosoma IV, e codifica per una glicoproteina di parete Sed1p prevalentemente sintetizzata durante la fase stazionaria dalle cellule di *Saccharomyces cerevisiae* (Shimoi *et al.*, 1998), e coinvolta nei meccanismi di resistenza allo stress attivati dalle cellule in fase stazionaria (Caro, *et al.*, 1998, Spellman *et al.*, 1998). Per il gene *SED1* sono stati ottenuti 3 ampliconi di taglia variabile da 890 a 1150 bp (890; 980; 1150 bp) e 4 profili, dei quali 2 a banda singola e 2 a due bande. L'indagine condotta con i marcatori molecolari su una popolazione di 16 ceppi flor di *S. cerevisiae* isolati da tre aree geografiche diverse, ha consentito di rilevare delle differenze intraspecifiche tra i lieviti, difficilmente riscontrabili con i metodi microbiologici classici. È stato inoltre possibile mettere in evidenza che non esiste un ceppo flor standard ma che ad ogni area geografica corrispondono dei profili tipo. Il 70% circa dei ceppi provenienti dall'Oristanese, possiede un identico profilo: tale risultato è una probabile conseguenza della pressione di selezione antropica esercitata nel corso del tempo. Infatti, l'affinamento della Vernaccia sotto flor è una pratica consolidata che fa parte della tecnica di produzione di questo vino. Sembrerebbe quindi che la diffusione di un ceppo in particolare sia legata fondamentalmente scambi di materiale (vino, botti) che avvengono normalmente tra i produttori (Budroni *et al.*, 2000).

Nella zona della Malvasia, dove la pratica della florizzazione è meno diffusa, non esiste un profilo dominante. Per tali ragioni questa zona potrebbe rappresentare una fonte interessante di biodiversità microbica, utilizzabile per la selezione di starter autoctoni.

Nel Goceano è stato possibile individuare un unico profilo e ciò è probabile conseguenza delle dimensioni ridotte dell'areale esaminato. Infatti, i ceppi di Arvisionadu provenienti da un unico paese, sono stati isolati da due cantine. È interessante notare che i dati ottenuti tramite caratterizzazione molecolare con i minisatelliti, sono in accordo con i profili

cariotipici determinati in un precedente lavoro (Pinna, 2000), per un'ampia popolazione di ceppi flor isolati dalle stesse zone vitivinicole. Tramite elettroforesi in campo pulsato (PFGE), nell'ambito di tale studio, è stato possibile caratterizzare cariotipicamente i ceppi, suddividerli in gruppi ed evidenziare che in ogni zona sono presenti dei ceppi con cariotipo specifico (Pinna, 2000). Partendo da questi dati, il confronto dei pattern molecolari ottenuti con le due analisi (PFGE e minisatelliti), permette di giungere a un comune risultato: ogni tipologia di profilo identificata con la tecnica dei minisatelliti, corrisponde a un diverso cariotipo individuato con la PFGE

La caratterizzazione della popolazione di ceppi flor con la tecnica dei minisatelliti, ha rivelato l'esistenza di un buon polimorfismo dei geni considerati anche se tale fenomeno è risultato inferiore rispetto a quanto riportato da Marinangeli *et al.* (2004).

Con i profili ottenuti per i geni *AGA1* e *HSP150*, tra la popolazione degli isolati sardi non è stato possibile individuare alcun tipo di variabilità. Il dato più interessante è stato invece ottenuto dall'analisi molecolare con i minisatelliti di *DAN4* e *SED1*: con un totale di otto profili individuati, il loro potere discriminante è da considerare molto elevato.

Questi risultati evidenziano che la biotipizzazione, fatta specificamente costruendo il profilo combinato dei 4 minisatelliti per ogni ceppo analizzato, può essere utilizzato come valido strumento di monitoraggio e tracciabilità dei ceppi.

### **Amplificazione di *FLO11* e delle zone intrageniche ripetute**

Flo11p è una glicoproteina presente sulla superficie cellulare di *S. cerevisiae*, coinvolta in una serie di fenotipi adesivi quali flocculazione (Guo *et al.*, 2000; Lo and Dranginis, 1998), adesione alle superfici inerti tipo agar e plastica (Gaur and Klotz, 1997; Lo and Dranginis, 1998; Reynolds and Fink, 2001), crescita invasiva e sviluppo pseudoifale (Guo *et al.*, 2000; Lambrechts *et al.*, 1996; Lo and Dranginis, 1996, 1998) e

formazione di biofilm su superfici liquide (Hishigami *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005; Fidalgo *et al.*, 2006). Flo11p appartiene alla superfamiglia delle adesine in cui i membri sono accomunati dalla stessa struttura proteica costituita da tre domini (Verstrepen *et al.*, 2004). Vari studi hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo del dominio centrale delle adesine: Verstrepen *et al.*, (2005) hanno dimostrato che in *S. cerevisiae*, il polimorfismo di lunghezza del gene *FLO1* è dovuto alla variabilità del numero di sequenze ripetute e che un aumento del numero di sequenze migliora le capacità di adesione (Verstrepen and Klis, 2006).

I risultati ottenuti dall'amplificazione del gene *FLO11* e delle zone interne ripetute mostrano come, in ceppi naturali isolati da vini florizzati, il gene che codifica per la proteina di parete Flo11 sia altamente polimorfo; la stessa variabilità è stata riscontrata per le sequenze interne. In particolare, sono state individuate 14 diverse taglie di *FLO11* su 21 ceppi flor analizzati; tra questi, 5 possiedono due alleli di taglia differente. Come suggerito da Verstrepen *et al.*, (2004) è ipotizzabile che in ceppi con alleli diversi si siano verificati eventi di ricombinazione sulle zone ripetute del gene: è noto infatti che un crossing-over ineguale tra due geni *FLO* identici siti su cromosomi omologhi non perfettamente allineati, può generare forme del gene di dimensione variabile.

Rispetto alle informazioni riportate in letteratura, la variabilità di *FLO11* osservata nei ceppi flor era in parte attesa. La selezione dei ceppi impiegati in questo studio, è stata determinata dalle differenze riscontrate nella produzione di biofilm formato su superficie liquida. In particolare sono stati individuati due gruppi principali di ceppi: buoni produttori e cattivi produttori di biofilm. Considerando lo stretto rapporto tra *FLO11* e fenotipo biofilm (Hishigami *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005; Fidalgo *et al.*, 2006) e lo studio svolto sulla proteina Flo1 (Verstrepen *et al.*, 2005), l'ipotesi di partenza, era che la differente attitudine dei ceppi alla formazione di biofilm, fosse legata all'esistenza di taglie diverse dell'adesina Flo11. Le prove sperimentali hanno successivamente

confermato questa ipotesi mostrando che la dimensione della adesina Flo11 si accompagna a variazioni nell'attitudine alla florizzazione.

## **ANALISI FENOTIPICHE DEI CEPPI FLOR**

### **Analisi del biofilm al SEM**

Il microscopio a scansione elettronica ha rivelato i dettagli dell'ultrastruttura del biofilm formato dai lieviti *S. cerevisiae* flor su superficie liquida: le cellule del biofilm secernono una abbondante matrice extracellulare che riveste lo strato a contatto con l'aria.

La scelta del protocollo di fissazione da impiegare per l'analisi dei campioni rappresenta un passaggio fondamentale per garantire la conservazione di materiali biologici (Kuthan *et al.*, 2003). In questo studio il metodo di preparazione utilizzato per l'osservazione delle cellule del biofilm è stato mutuato da altri tipi di analisi e, con tutta probabilità, ha alterato le strutture biologiche trattate. Ciò non ha tuttavia impedito di rilevare la presenza di materiale extracellulare: questa sostanza, la cui natura è sconosciuta, sembra essere distribuita in prevalenza sullo strato superficiale del biofilm. Tale osservazione fa supporre che uno dei ruoli principali svolti dalla matrice sia quello di proteggere le cellule esposte al contatto con l'aria, dai fenomeni di ossidazione e dalla disidratazione (Davey and O'Toole, 2000; Chandra *et al.*, 2001). Un altro aspetto importante che riguarda le cellule del biofilm formato dai lieviti flor è dato dalla loro forma: non esiste differenziazione tra le cellule. Mentre il biofilm di *C. albicans* è costituito da tre tipologie di cellule (planctoniche, ifali e

pseudoifali), le cellule di *S. cerevisiae* che formano il biofilm su superficie liquida sono esclusivamente di tipo lievitifforme (Baillie and Douglas, 1998; Ramage *et al.*, 2005).

L'unico lavoro in cui si parla di sostanze esopolimeriche prodotte da *S. cerevisiae* è stato svolto nel 2003 da Kuthan *et al.*, i quali hanno scoperto l'esistenza di materiale extracellulare in colonie "fluffy" formate da ceppi selvatici di *S. cerevisiae*. Le colonie formate da ceppi di laboratorio hanno un aspetto liscio, compatto. Nelle colonie "fluffy", cioè vaporose, le cellule si dispongono a formare particolari strutture che rendono rugosa la superficie della colonia. L'impiego del microscopio ambientale a scansione ha permesso a questi autori di preservare le strutture cellulari ed extracellulari e ha rivelato l'organizzazione interna della colonia. Per gli stessi autori, la presenza di filamenti intercellulari in colonie giovani indica che la produzione di ECM (extracellular matrix) che ricopre e connette le cellule non è conseguente all'invecchiamento della colonia, come invece è stato osservato da Varon e Choder (2000). Kuthan *et al.* (2003) attribuiscono alla matrice sia un ruolo di protezione da condizioni ambientali avverse, sia il compito di distanziare le cellule all'interno della colonia rendendola più "vaporosa" e conferendo così maggiori capacità di invadere l'ambiente circostante. Inoltre, gli stessi autori propongono l'esistenza di una vera e propria organizzazione interna della colonia: le cellule sono separate da canali che consentono gli scambi di sostanze nutritive e l'allontanamento dei materiali di scarto, come una sorta di sistema circolatorio primitivo. Una simile organizzazione è stata descritta anche per i biofilm di *C. albicans* e di vari microrganismi procarioti (Davey and O'Toole, 2000; Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2005).

In questo studio non è stato possibile ottenere maggiori dettagli circa l'esistenza di una vera e propria struttura cellulare interna del biofilm formato dai lieviti flor. Tuttavia, se si considera il biofilm come una comunità microbica, non si può escludere l'esistenza di una specializzazione cellulare e la presenza di un sistema di comunicazione.

## **Idrofobicità**

Le adesine rappresentano un gruppo di proteine ampiamente diffuse in varie specie di funghi (Verstrepen and Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007; Linder and Gustafsson, 2007). In *Candida albicans* e *C. glabrata* le adesine costituiscono un'ampia famiglia di proteine della parete cellulare coinvolte in vari fenotipi adesivi (Ramage *et al.*, 2005). Per questi funghi le interazioni idrofobiche tra cellula e substrato rappresentano un fondamentale fattore nella formazione del biofilm (Li *et al.*, 2003; Butler, 2004). Quando *C. albicans* si sviluppa su un terreno minimo liquido o agarizzato non si osserva alcuna differenziazione cellulare; sullo stesso terreno di crescita ma in presenza di una superficie idrofobica, il biofilm che si forma è costituito da cellule lieviformi e ife. Questa osservazione supporta l'idea che dal contatto con superfici idrofobiche scaturiscano una serie di cambiamenti fisiologici che portano alla formazione di biofilm (Butler, 2004).

Flo11p è una proteina molto idrofobica perciò la sua presenza nella parete cellulare di *S. cerevisiae* favorirebbe l'esclusione dell'acqua dallo spazio tra la cellula e la superficie alla quale si lega (Verstrepen *et al.*, 2004). Recentemente è stato dimostrato che l'espressione di *FLO11* incrementa l'idrofobicità della superficie cellulare nei lieviti flor (Fidalgo *et al.*, 2006). Anche nel ceppo di laboratorio  $\Sigma 1278b$  è noto che questo carattere è ampiamente dipendente dal gene *FLO11* (Reynolds and Fink, 2001). Secondo Dranginis *et al.* (2007), gli eventi morfogenetici legati all'espressione di *FLO11*, come ad esempio l'idrofobicità della parete cellulare, potrebbero dipendere non solo dalla struttura lineare della proteina ma anche dal suo livello di glicosilazione. Infatti, la presenza di abbondanti residui di serina e treonina nel dominio centrale dell'adesina, causa una importante O-glicosilazione che rende la struttura proteica più rigida; questo "riarrangiamento" permette alla proteina di "affacciarsi" all'esterno della parete cellulare e di interagire con vari substrati grazie al dominio N-terminale (Frieman *et al.*, 2002). Tuttavia, i risultati ottenuti, pur mostrando l'elevata idrofobicità dei ceppi flor, non sono sufficienti per

stabilire una relazione univoca tra le dimensioni della proteina e i valori di idrofobicità riscontrati. Condizioni nutrizionali come quelle impiegate per la determinazione dell'idrofobicità delle cellule, e cioè carenza di glucosio e di fonti aminoacidiche, inducono l'espressione di geni legati alla sintesi dei costituenti della parete (Kleinschmidt *et al.*, 2005). È quindi probabile che insieme a *FLO11* siano determinanti gli apporti di altri geni per stabilire le proprietà superficiali della cellula.

### **Adesione a superfici plastiche**

In *S. cerevisiae* l'adesione alla superficie rappresenta il primo step dell'invasione del substrato (Guo *et al.*, 2000). Nel ceppo di laboratorio  $\Sigma 1278b$ , una delle cause che provoca il fenomeno, è rappresentata dai bassi livelli di glucosio presenti nel terreno di crescita. Elevate concentrazioni di glucosio o la sua totale assenza riducono sensibilmente le capacità adesive del lievito (Reynolds and Fink, 2001). Braus *et al.* (2003), hanno dimostrato che l'adesione cellula-substrato può essere indotta anche dalla carenza aminoacidica sia in cellule aploidi che in individui diploidi. La mancanza di aminoacidi, anche con disponibilità e/o in mancanza sia di fonti azotate sia di fonti carboniose, rappresenta un segnale nutrizionale capace di attivare *FLO11* e di indurre l'adesione in ceppi selvatici di *S. cerevisiae*.

I risultati ottenuti per i ceppi flor permettono di ipotizzare l'esistenza di meccanismi differenti di regolazione dell'adesione al polistirene mediata da Flo11p. Probabilmente il gene *FLO11* non è l'unico responsabile delle capacità adesive della cellula. In due differenti studi che analizzano i profili di espressione globali dei ceppi  $\Sigma 1278b$  e S288c, si dimostra infatti che l'assenza di glucosio e di aminoacidi induce l'espressione di un elevato numero di geni che codificano componenti della parete cellulare

(Natarajan *et al.*, 2001; Kleinschmidt *et al.*, 2005). Inoltre, una maggiore adesività, potrebbe essere dovuta ad un elevato livello di trascrizione dell'adesina per cui dimensioni più piccole della proteina possono essere compensate dalla produzione di quantità elevate della stessa. Sebbene non si conosca il meccanismo preciso che regola l'adesione alle superfici di polistirene mediata da Flo11p, è probabile che differenze nella composizione aminaoacidica del dominio N-terminale possano determinare differenti proprietà adesive. Mortensen *et al.* (2007), ipotizzano che i residui di triptofano e di prolina presenti nella porzione N-terminale della proteina, possano essere coinvolti nelle interazioni cellula-substrato.

### **Quantità di biofilm prodotto**

Il biofilm microbico viene comunemente descritto come una comunità strutturata di microrganismi, adesa a una superficie e avvolta da una matrice di materiale esopolimerico (Ramage *et al.*, 2005). Nei ceppi flor di *S. cerevisiae* l'abilità a formare biofilm sulla superficie del vino è una caratteristica inusuale ma essenziale e poco investigata. Il meccanismo di formazione del biofilm dei flor è evidentemente diverso rispetto a quanto osservato nei biofilm batterici e di *C. albicans*. *C. albicans* per poter colonizzare una qualsiasi superficie deve prima aderire al materiale: il primo stadio della formazione del biofilm è mediato sia da un insieme di fattori non specifici (idrofobicità della superficie cellulare e forze elettrostatiche tra cellula e substrato), sia dalle adesine situate sulla parete della cellula (Nobile and Mitchell, 2006).

Sebbene non siano state ancora chiarite le cause che determinano la risalita dei lieviti flor in superficie, alcune ipotesi sono state avanzate: aumento dei lipidi totali (Cantarelli and Martini, 1969), incremento dell'idrofobicità superficiale dovuta all'aumento degli acidi grassi insaturi (Himura *et al.*, 1980), aumento del livello di saturazione degli acidi grassi (Farris *et al.*, 1993), diminuzione di densità cellulare dovuta alla CO<sub>2</sub> (Martinez *et al.*, 1997), sono tutti fattori che possono influenzare la risalita delle cellule.

Un precedente lavoro che proponeva un modello per la formazione del biofilm basato sull'abilità delle cellule, altamente idrofobiche, di intrappolare l'anidride carbonica prodotta durante la fermentazione consentendone il galleggiamento, ha dimostrato come *FLO11* rivesta un ruolo fondamentale per la formazione di biofilm su superfici liquide (Zara *et al.*, 2005).

In questo studio è stata analizzata la variazione quantitativa della formazione del biofilm su superficie liquida in 21 ceppi flor di *S. cerevisiae*. I risultati ottenuti con questo tipo di analisi confermano che ceppi diversi hanno differente attitudine alla formazione di biofilm nell'interfaccia liquido-aria.

Sebbene non vi siano dati certi per spiegare tali differenze, si possono avanzare alcune ipotesi: la prima coinvolge il gene *FLO11* mentre la seconda riguarda la scoperta dell'esistenza di materiale extracellulare del biofilm. Appare chiaro che il polimorfismo di lunghezza di *FLO11* osservato tra i ceppi flor non può da solo fornire un'interpretazione univoca dei dati: è invece presumibile che tra le proteine esistano differenze nel livello di glicosilazione e differenze del livello di espressione genica. Pertanto, indipendentemente dalla dimensione della proteina, una diversificazione della struttura proteica e una variazione della quantità della proteina nella parete cellulare rappresentano fenomeni altrettanto importanti per il fenotipo biofilm.

La scoperta dell'esistenza di una matrice extracellulare nel biofilm di *S. cerevisiae* potrebbe offrire una ulteriore chiave di lettura per la comprensione delle differenze tra i ceppi. È possibile supporre che i componenti della matrice extracellulare contribuiscano all'aggregazione cellulare e al mantenimento della struttura in maniera ceppo-dipendente.

### **Crescita invasiva e adesione all'agar**

È stato documentato che *FLO11* è necessario per la crescita invasiva aploide e per lo sviluppo filamentoso diploide (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo and Dranginis, 1998; Guo *et al.*, 2000). In ceppi di laboratorio aploidi

cresciuti su terreno ricco (tipo YEPD) Flo11p è espressa ad alti livelli ed è uniformemente distribuita sulla superficie cellulare. In cellule diploidi i livelli della proteina Flo11p rilevati sulla superficie cellulare sono molto bassi; come conseguenza si assiste a una notevole riduzione delle capacità adesive all'agar rispetto agli individui aploidi (Guo *et al.*, 2000). In uno studio di espressione genica condotto su ceppi flor, Fidalgo *et al.* (2006) provano che i livelli di trascrizione del gene *FLO11* sono elevati anche in condizioni ottimali di crescita (su terreno YEPD).

I ceppi flor sardi, pur non essendo aploidi, posseggono spiccate capacità adesive e di crescita invasiva. Se in alcuni dei ceppi analizzati è stato possibile trovare una relazione tra dimensione del gene e intensità del fenotipo, tale risultato non è estensibile all'intero gruppo dei lieviti flor studiati. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nell'ipotesi che tra i ceppi esistano differenze nel grado di espressione del gene *FLO11*. A supporto di questa ipotesi Lo and Dranginis (1998) hanno visto che una sovraespressione di *FLO11* è in grado di indurre la crescita invasiva in ceppi diploidi. Inoltre, come dimostrato da Guo *et al.*, (2000), altri geni della famiglia delle flocculine (*FLO10*), se overespressi, possono bypassare l'effetto di *FLO11* sia nell'invasione aploide sia nella crescita filamentosa.

### **Sviluppo pseudoifale**

L'attivazione di *FLO11* rappresenta un prerequisito per lo sviluppo pseudoifale in cellule diploidi. Negli individui diploidi con aspetto lievitifforme, l'espressione di *FLO11* è fortemente repressa e il suo mRNA difficilmente rilevabile; in assenza di limitazioni nutrizionali le cellule non mostrano carattere adesivo (Braus *et al.*, 2003; Gimeno *et al.*, 1992; Lambrechts *et al.*, 1996; Lo and Dranginis, 1998). La mancanza di azoto induce l'espressione di *FLO11* e di conseguenza lo sviluppo pseudoifale. Questo evento comporta un'importante riprogrammazione per le cellule che si allungano, crescono in maniera unipolare e rimangono unite grazie alla presenza delle adesine (Gancedo, 2001; Pan *et al.*, 2000). Non tutte

le cellule poste nelle stesse condizioni di stress nutrizionale reagiscono però alla stessa maniera: alcune infatti esprimono il gene e altre no. Questo *switch* di *FLO11* tra lo stato “on” e “off” è dovuto a una repressione epigenetica reversibile ad opera di proteine che si legano alla cromatina. Come conseguenza si assiste a un fatto sorprendente: gli individui della stessa colonia che esprimono *FLO11* formano filamenti, mentre quelli che non lo esprimono rimangono di tipo lievitifforme (Halme *et al.*, 2004). In questo lavoro i ceppi flor sono stati testati per la crescita pseudoifale, ma nessuno di essi è stato capace di differenziare tale fenotipo. Lo stesso comportamento è stato notato in cellule diploidi di *S. cerevisiae* var. *diastaticus* che sono incapaci di formare pseudoife anche quando la proteina Flo11 viene espressa (Douglas *et al.*, 2007). La distribuzione della proteina sulla parete della cellula rappresenta un importante fattore che può essere determinante nello sviluppo pseudoifale (Guo *et al.*, 2000): è ipotizzabile che nei ceppi studiati l’adesina sia uniformemente ripartita sulla superficie cellulare; ciò impedirebbe la polarizzazione dell’accrescimento che rappresenta il primo passo dello sviluppo pseudoifale (Guo *et al.*, 2000).

### **Formazione del mat cellulare**

*S. cerevisiae* può formare strutture morfologicamente complesse chiamate mat e ciò richiede l’espressione della proteina Flo11p e la crescita su una superficie semisolida (Reynolds and Fink, 2001; Reynolds *et al.*, 2007). Flo11p conferisce alle cellule un comportamento noto con il termine inglese di “*sliding motility*” (Martinez *et al.*, 1999; Recht *et al.*, 2000). *Sliding motility* è definito come una forma di mobilità cellulare prodotta grazie alla forza generata dall’accrescimento della colonia in combinazione con le proprietà superficiali della cellula che riducono l’attrito cellula-substrato (Recht *et al.*, 2000). In accordo con Reynolds *et al.*, (2007) e Reynolds and Fink, (2001), i mat formati dai ceppi flor, hanno differenziato due popolazioni cellulari. La simmetria radiale e la riproducibilità del numero di raggi, sembra essere una caratteristica

dipendente da una precisa programmazione dello sviluppo cellulare ed è fortemente influenzata dall'ambiente (Reynolds and Fink, 2001). Reynolds e collaboratori (2007) hanno dimostrato che il diverso aspetto cellulare che caratterizza le due popolazioni è una conseguenza delle loro differenti proprietà di adesione a loro volta condizionate dalla presenza di un gradiente di pH che si stabilisce nel terreno in seguito all'accrescimento del mat: i bassi valori di pH della porzione centrale del mat, provocando una modifica della struttura di Flo11p, aumentano le forze di adesione e contribuiscono alla creazione di "hub"; viceversa pH elevati condizionano la morfologia della proteina riducendo le sue proprietà adesive nelle cellule del "rim".

Altri autori hanno riportato che la formazione di mat riflette la ploidia (Galitski *et al.*, 1999). Individui apolidi derivati dal ceppo  $\Sigma$ 1278b, formano mat di dimensioni maggiori e con un aspetto differente rispetto a ceppi diploidi e in generale poliploidi. Ciò è dovuto al diverso livello di espressione di *FLO11* che aumenta con il diminuire della ploidia (Galitski *et al.*, 1999; Reynolds and Fink, 2001). In un lavoro svolto su alcuni ceppi flor è stato dimostrato che non sono presenti differenze significative nella formazione di mat tra lieviti aploidi e poliploidi e che i mat cellulari dei ceppi diploidi flor sono molto più grandi rispetto a quelli dei ceppi  $\Sigma$  (Pirino, 2004). È quindi ipotizzabile che nei ceppi flor esistano sistemi di diversa natura che regolano la formazione del mat rispetto a quanto già proposto per il ceppo  $\Sigma$ 1278b. Tale meccanismo potrebbe trovare spiegazione nel coinvolgimento degli altri geni *FLO* (non espressi nel ceppo  $\Sigma$ 1278b); un'analisi di espressione potrebbe confermare un loro ruolo attivo nel fenomeno e spiegare le differenze riscontrate.

### **Analisi di espressione di *FLO11* durante la formazione di biofilm**

Per verificare l'ipotesi di partenza secondo la quale ceppi con diversa attitudine nella formazione di biofilm su superfici liquide potrebbero avere diversi livelli di induzione di *FLO11*, è stata studiata l'espressione di questo gene in alcuni ceppi flor di *S. cerevisiae*. Più autori hanno

dimostrato il ruolo di *FLO11* nei fenotipi adesivi (Lo and Dranginis, 1998; Guo *et al.*, 2000; Pan and Heitman, 2000; Reynolds and Fink, 2001; Gagiano *et al.*, 2002; Verstrepen and Klis, 2006). Tuttavia solo recentemente si è parlato di un suo coinvolgimento nella formazione di biofilm nell'interfaccia liquido-aria (Hishigami *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005; Fidalgo *et al.*, 2006). Rispetto alla possibile correlazione taglia del gene e intensità del fenotipo biofilm, i risultati di questo studio sono in disaccordo con quanto osservato da Verstrepen *et al.* (2005) per il gene *FLO1*. Infatti, nel ceppo M23 la dimensione di *FLO11* (3,1 kb) e delle zone ripetute (0,9 Kb), avrebbe suggerito l'esistenza di una scarsa attitudine alla formazione di biofilm oltre che scarse proprietà adesive. Contrariamente a quanto atteso, invece è stato possibile osservare sia una marcata adesività sia un'abbondante produzione di biofilm. Ciò è almeno in parte spiegabile considerando i livelli di espressione di *FLO11*. Al contrario, nel ceppo V80, la cui ORF misura 6,1 Kb e le zone interne ripetute 3,1 Kb, la produzione di biofilm è inferiore alle aspettative. Questo risultato può essere giustificato, almeno in parte, con i bassi livelli di espressione del gene *FLO11*. In V23, la scarsa attitudine a formare biofilm è probabilmente una conseguenza sia della dimensione del gene e delle zone ripetute (3,5 e 1,5 Kb rispettivamente), sia dei bassi livelli di espressione di *FLO11*. I ceppi A9 e V75, buoni produttori di biofilm, pur con livelli di espressione di *FLO11* non particolarmente elevati, possiedono delle ORF e delle zone ripetute di 4,6 e 2,6 Kb e 5,6 e 3,4 Kb rispettivamente.

I risultati ottenuti sembrano confermare l'ipotesi che le differenze nel fenotipo biofilm tra ceppi che hanno alleli di dimensioni simili possano essere attribuite a una diversa espressione di *FLO11*.

### **Analisi del promotore del gene *FLO11***

Il genoma dei ceppi di laboratorio presenta delle differenze sostanziali rispetto al genoma dei ceppi selvatici e di quelli vinari flor in particolare, in quanto questi ultimi hanno subito un processo evolutivo condizionato da un ambiente altamente stressante (Infante *et al.*, 2003). In particolare,

fattori quali l'elevata concentrazione di zuccheri, di etanolo, di acetaldeide e lo stress ossidativo dovuto al metabolismo respiratorio durante l'invecchiamento biologico, hanno influito sulla differenziazione genetica tra i ceppi vinari (Infante *et al.*, 2003; Querol *et al.*, 2003).

Nel ceppo  $\Sigma 1278b$ , l'espressione di *FLO11* è guidata da un promotore di circa 3 kb (Rupp *et al.*, 1999; van Dik *et al.*, 2005), la cui regolazione è piuttosto complessa (Galitski *et al.*, 1999; Rupp *et al.*, 1999; van Dik *et al.*, 2005; Braus *et al.*, 2003). Nel promotore sono presenti quattro siti di attivazione UAS (Upstream Activation Site) e nove siti di repressione URS (Upstream Repression Site) (Rupp *et al.*, 1999). L'analisi delle sequenze del promotore in alcuni ceppi flor sardi (M23, V23 e A9) e nel ceppo flor 133d (Fidalgo *et al.*, 2006), ha permesso di individuare una serie di mutazioni puntiformi e la presenza di una delezione di circa 120 bp che riguarda un ampio dominio di una ben caratterizzata sequenza di repressione (Rupp *et al.*, 1999). Gli effetti di tale delezione sono stati ulteriormente indagati da Fidalgo *et al.*, (2006) che hanno osservato che la stessa delezione nel promotore di un ceppo di laboratorio determina la formazione di un biofilm sottile. La delezione di circa 120 bp fiancheggia la sequenza nucleotidica CAAATTAA di due zone ripetute sul promotore dei ceppi flor. Queste brevi sequenze rappresentano il target di eventi di ricombinazione molecolare del DNA (Welker *et al.*, 2000). Ciò suggerisce che le differenze funzionali riscontrate tra i ceppi flor potrebbero essere provocate dall'esistenza di riarrangiamenti della regione del promotore.

Dalle analisi svolte per valutare i comportamenti adesivi dei ceppi, è emerso che V80 ha dei fenotipi adesivi poco marcati e una scarsa propensione alla formazione del biofilm. La mancanza della delezione nella regione del promotore di questo ceppo flor, potrebbe essere in parte responsabile del minor livello di induzione di *FLO11*.

## **Studio dei fenotipi adesivi *FLO11*-dipendenti in un ceppo genetico**

In questo lavoro, per determinare le conseguenze funzionali dovute alla variazione di dimensione di *FLO11*, sono stati confrontati gli effetti di tre alleli di diversa dimensione derivati da ceppi flor naturali. Nel ceppo di laboratorio BY4742 derivato da S288c, tutti i geni *FLO* sono trascrizionalmente silenti (Liu *et al.*, 1996; Verstrepen *et al.*, 2004; Purevdorj-Gage *et al.*, 2007). Il gene *FLO11* è inattivo a causa di una mutazione a carico del suo principale attivatore trascrizionale Flo8p (Gancedo, 2001) e ciò lo rende incapace di formare aggregati cellulari, di aderire alle superfici solide (Reynolds and Fink, 2001), e di formare pseudoife (Gimeno *et al.*, 1992). Perciò si è proceduto con l'espressione ectopica delle tre varianti del gene *FLO11* (derivate dai ceppi flor naturali M23, V23 e A9) sotto il controllo del promotore *GAL1*, per valutare il contributo di ogni allele a ciascuno dei fenotipi analizzati. Nel trasformatante BY-M23+ le zone ripetute misurano 900 bp mentre nei ceppi BY-V23+ e BY-A9+ sono lunghe rispettivamente 1500 e 2600 bp. Le tre ORF sono controllate dallo stesso promotore inducibile: si può perciò supporre che i livelli di espressione siano uguali nei tre trasformanti.

### Idrofobicità

Recentemente alcuni autori hanno dimostrato che l'espressione di *FLO11* incrementa l'idrofobicità della superficie cellulare nei lieviti flor (Fidalgo *et al.* 2006). Anche nel ceppo di laboratorio  $\Sigma 1278b$  è noto che questo carattere è ampiamente dipendente dal gene *FLO11* (Reynolds and Fink, 2001). L'assenza della proteina Flo11p comporta nei lieviti, una drastica riduzione dell'affinità nei confronti dei solventi idrofobici, mentre una sua overespressione ne causa un aumento (Ishigami *et al.*, 2004). In questo studio è stato dimostrato che un'espressione ectopica di *FLO11* in un ceppo di laboratorio che normalmente mostra un carattere idrofilico (Purevdorj-Gage *et al.*, 2007), è responsabile dell'incremento di idrofobicità della superficie cellulare. Tuttavia, sebbene l'esperimento sia

stato condotto allo scopo di determinare se differenze nella dimensione di *FLO11* determinano gradi differenti di idrofobicità i risultati ottenuti indicano l'assenza di una correlazione tra i due caratteri nei tre ceppi. Tuttavia è ipotizzabile che il test impiegato per la determinazione dell'idrofobicità non sia in grado di rilevare le differenze tra i ceppi trasformanti.

### Formazione di biofilm su superfici plastiche

Nei ceppi di laboratorio, a parità di background genetico, l'adesione alle superfici è indotta da differenti condizioni nutrizionali e ambientali come ad esempio bassi livelli di glucosio (Reynolds and Fink, 2001), carenza di aminoacidi (Braus *et al.*, 2003) e natura della superficie con la quale il ceppo interagisce (Henrik *et al.*, 2007).

I trasformanti ottenuti in questo lavoro differiscono tra loro unicamente per la dimensione del gene *FLO11*. Inoltre, considerando che i diversi alleli sono controllati dallo stesso promotore inducibile (GAL1), si possono escludere le influenze legate a diversi livelli di espressione. Per tale ragione, a parità di condizioni nutrizionali e ambientali, la variazione delle capacità adesive riscontrata tra i ceppi trasformanti è dovuta unicamente alla taglia del gene e all'estensione delle zone ripetute.

I risultati ottenuti nella prova di adesione alle superfici plastiche, sono in accordo quanto riportato da Verstrepen *et al.* (2005) per l'adesina Flo1. Gli autori hanno comparato gli effetti di otto alleli del gene *FLO1* creati artificialmente (taglie da 2,9 a 5,4 kb), sui vari fenotipi associati alla proteina Flo1, dove la variabile tra gli alleli era rappresentata dal numero delle zone ripetute. I risultati del loro studio hanno evidenziato una correlazione tra taglia del dominio centrale di *FLO1* e intensità dei fenotipi adesione a superfici plastiche e flocculazione.

Per spiegare le conseguenze dell'espansione dei domini centrali della proteina Flo11 sulle capacità adesive, si può ipotizzare che la presenza di residui di serina e treonina, favorisca le O-glicosilazioni e le N-glicosilazioni con conseguente irrigidimento della struttura proteica; il

dominio N-terminale, che contiene i siti di legame, viene così proiettato verso l'esterno della parete cellulare e può interagire con l'ambiente (Frieman *et al.*, 2002; Verstrepen *et al.*, 2005). Questo meccanismo potrebbe essere alla base delle differenze tra le proprietà adesive dei trasformanti BY+ ottenuti in questo studio. Inoltre, si può ipotizzare che una maggiore estensione della proteina, oltre a favorire l'esposizione del dominio N-terminale, possa proiettare all'esterno della parete cellulare anche una porzione dei domini ripetuti in misura tanto maggiore quanto maggiore è l'estensione di tali zone. Pertanto, l'aumento delle capacità adesive può essere determinato dalle interazioni tra i residui idrofobici del dominio centrale e quelli del substrato.

### Formazione di biofilm su superfici liquide

Studi precedenti hanno dimostrato che il gene *FLO11* è necessario per la formazione di biofilm in liquido (Ishigami *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005; Fidalgo *et al.*, 2006).

Quando i trasformanti sono stati trasferiti su terreno di florizzazione contenente galattosio, i ceppi BY-M23+, BY-V23+ e BY-A9+ hanno formato un sottile ma distinguibile biofilm superficiale che è stato successivamente quantificato con il metodo descritto in materiali e metodi. Dalle prove sperimentali è emerso come, per i ceppi BY-M23+ e BY-A9+, analogamente a quanto osservato da Verstrepen *et al.* (2005) per la proteina Flo1, una maggiore estensione del gene *FLO11* e delle zone interne ripetute comporti la comparsa di un fenotipo più marcato. Per spiegare tali risultati bisogna considerare la struttura della proteina Flo11p. In un recente studio condotto da Fidalgo *et al.* (2006), è stato determinato il contributo di ogni dominio della proteina Flo11p (N-terminale, dominio centrale e C-terminale) con la costruzione di una serie di proteine chimeriche ottenute combinando i domini di *FLO11*, derivati da un ceppo di laboratorio e da un ceppo flor. È stato così dimostrato che il dominio centrale contenente le sequenze ripetute in tandem è il maggior

responsabile della formazione di biofilm, ma anche che i due domini N-terminale e C-terminale sono coinvolti nel fenomeno.

Nel trasformante BY-M23+ le zone ripetute misurano 900 bp mentre nei ceppi BY-V23+ e BY-A9+ sono lunghe rispettivamente 1500 e 2600 bp. Le tre ORF sono controllate dallo stesso promotore inducibile: si può perciò supporre che i livelli di espressione siano uguali nei tre trasformanti. Per tale ragione, differenze nella capacità di formare biofilm su superfici liquide, potrebbero dipendere esclusivamente dalle dimensioni della proteina di ciascun ceppo. Tuttavia nel il ceppo BY-V23+ la quantità di biofilm rilevata è stata inferiore alle attese: questo risultato potrebbe in parte dipendere dalla difficoltà incontrata nel recuperare biofilm sottili e poco compatti.

Sebbene siano state postulate varie teorie sulle cause della risalita in superficie dei lieviti flor (Cantarelli and Martini, 1969; Imura *et al.*, 1980; Farris *et al.*, 1993; Zara *et al.*, 2005), il fenomeno resta ancora da chiarire. In questo lavoro si dimostra che la proteina Flo11 derivata da un ceppo naturale, quando espressa in un ceppo di laboratorio, consente la formazione del biofilm superficiale. Questo risultato è stato raggiunto con tre varianti alleliche di *FLO11* derivate da ceppi vinari.

### Crescita invasiva

Quando si verificano limitazioni nutrizionali le cellule aploidi di *S.cerevisiae* subiscono una transizione dimorfica e passano da un aspetto lieviforme il cui sviluppo avviene sulla superficie dell'agar, a uno sviluppo invasivo, nel quale le catene cellulari penetrano nel terreno agarizzato. La crescita invasiva è indicata come un importante meccanismo di sopravvivenza che consente ai lieviti di permanere in ambienti poveri di nutrienti (Gancedo, 2001). In precedenti lavori è stato dimostrato come un incremento di espressione di *FLO11* sia sufficiente a indurre lo sviluppo invasivo in cellule aploidi del ceppo  $\Sigma$ 1278b (Lo and Dranginis, 1998; Li and Palecek, 2003). I trasformanti ottenuti in questo studio e il ceppo genetico BY4742, testati in parallelo per la crescita invasiva, hanno mostrato l'incapacità di

penetrare la superficie dell'agar. Più cause possono concorrere a creare una tale deficienza: oltre alla già nota mutazione del gene *FLO8* che impedisce la crescita invasiva nel ceppo S288c (e quindi in BY4742) (Liu *et al.*, 1996), probabilmente esistono ulteriori difetti funzionali nei fattori che regolano la morfogenesi (Gancedo, 2001). Tuttavia, considerando che la sovraespressione del gene *FLO11* dovrebbe bypassare la mutazione di *FLO8*, si può presumere che un ulteriore ostacolo che blocca la crescita invasiva nei trasformanti testati sia rappresentato dall'incapacità di aderire al substrato. È stato infatti dimostrato che l'adesione cellulare rappresenta un fattore critico nella crescita invasiva; in mancanza di una sufficiente interazione cellula-substrato, le cellule non possiedono l'integrità meccanica per penetrare la superficie del terreno agarizzato (Palecek *et al.*, 2002).

### Formazione del mat cellulare

In *S. cerevisiae* la formazione del mat cellulare possiede molte caratteristiche tipiche dei comportamenti microbici multicellulari. La formazione dei mat dipende dalla natura della superficie, dalla concentrazione di glucosio, e naturalmente dal background genetico del ceppo (Reynolds and Fink, 2001). In più lavori, è stato dimostrato che la presenza della glicoproteina Flo11 sulla superficie della cellula è necessaria per la differenziazione di due tipologie di popolazioni cellulari chiamate "rim" (cellule del margine, bordo) e "hub" (cellule del centro) (Reynolds and Fink, 2001; Reynolds *et al.*, 2007).

Come è stato osservato in BY4742, i ceppi che non esprimono il gene *FLO11* sono incapaci di originare complessi multicellulari con strutture differenziate (Reynolds and Fink, 2001). L'assenza della glicoproteina sulla superficie della cellula comporta la formazione di un mat cellulare liscio, di dimensioni ridotte e incapace di aderire alla superficie della piastra (Reynolds *et al.*, 2007). In questo studio la presenza di Flo11p nella parete dei trasformanti ha avuto come conseguenza un aumento delle dimensioni dei mat e la formazione di strutture maggiormente

complesse. Infatti, come osservato per i mat cellulari formati dai ceppi flor naturali, anche nei mat dei trasformanti si possono distinguere due diverse popolazioni cellulari costituite dalle cellule della porzione centrale e dalle cellule situate nella periferia della colonia. Una spiegazione di tale fenomeno è stata fornita da Reynolds *et al.*, (2007): il gradiente di pH che si forma durante l'accrescimento della colonia comporterebbe una modifica della struttura della proteina Flo11 che si traduce in una variazione delle proprietà di adesione ad essa collegate. In particolare, i pH bassi riscontrati nella porzione centrale del mat, aumentano le capacità adesive di Flo11; viceversa, i maggiori valori di pH della periferia del mat provocano una riduzione dell'adesione Flo11-dipendente.

Tra i trasformanti testati, non è stato possibile individuare una correlazione tra dimensione del gene *FLO11* e del mat cellulare: ciò può essere dovuto al fatto che anche se è stato dimostrato il coinvolgimento di *FLO11* nella formazione del mat, è improbabile che esso sia l'unico responsabile di tale evento.

La caratterizzazione tecnologica realizzata in questo lavoro di tesi, ha permesso di individuare un gruppo di ceppi flor da poter impiegare come starter per la produzione dei vini florizzati. Il risultato ottenuto soddisfa l'esigenza di salvaguardia dei prodotti di nicchia per i quali non esistono in commercio ceppi starter. Inoltre, la possibilità di disporre di alcuni ceppi selezionati, permette di condurre la vinificazione con risultati certi sulla qualità finale del prodotto e, in particolare, di gestire al meglio la delicata fase di florizzazione. Inoltre, la caratterizzazione molecolare realizzata con i marcatori molecolari minisatelliti, impiegata per la prima volta in ceppi flor, si è dimostrata un valido strumento per descrivere la biodiversità dei ceppi studiati.

I risultati ottenuti nei test di florizzazione realizzati in questo lavoro hanno evidenziato differenze tra i ceppi flor nell'attitudine alla formazione di biofilm. Tenuto conto del legame tra formazione del biofilm e espressione del gene *FLO11* dimostrato da vari autori, si è scelto di verificare se ad una diversa capacità di formazione del biofilm, poteva corrispondere una differente taglia di *FLO11* e delle zone interne ripetute. I risultati ottenuti hanno consentito di individuare un elevato polimorfismo del gene e delle zone ripetute. Inoltre, considerato che l'adesina Flo11 è coinvolta in numerosi fenomeni di adesione cellulare e che Verstrepen e collaboratori (2005) hanno suggerito che a una maggiore taglia del gene e delle zone

interne di Flo1 corrispondono delle capacità adesive più marcate, sono stati studiati i fenotipi legati all'espressione del gene *FLO11*. Le prove svolte in questo lavoro dimostrano che i ceppi flor, con background genetici diversi, si comportano diversamente rispetto a quanto riportato per i ceppi isogenici di laboratorio. In particolare si è visto che ceppi con gene e zone interne di piccola dimensione sono buoni produttori di biofilm e posseggono spiccate proprietà adesive, mentre ceppi la cui ORF è molto estesa sono cattivi produttori di biofilm e hanno scarse capacità adesive. Pertanto sono state svolte ulteriori indagini molecolari per meglio comprendere la natura di queste differenze. Si è quindi scelto di analizzare l'espressione del gene *FLO11* in fase di formazione del biofilm, in cinque ceppi che fossero rappresentativi della popolazione studiata. Tuttavia i risultati dello studio di espressione hanno spiegato solo parzialmente i diversi comportamenti adesivi mostrati dai ceppi: si è visto che il ceppo M23 con *FLO11* e zone ripetute di 3,1 e 0,9 Kb ha un elevato livello di induzione, e che in V80, con gene e zone ripetute di 6,1 e 3,2 Kb, questi valori sono decisamente inferiori. Considerato che l'espressione del gene *FLO11* è guidata da un promotore estremamente complesso la cui regolazione è influenzata da un elevato numero di fattori, sono state analizzate le sequenze del promotore di quattro ceppi, e si è osservato che in tre di questi è presente una delezione che riguarda una ben nota sequenza di repressione. Ciò potrebbe spiegare gli elevati valori di induzione osservati nel ceppo M23 ma non per il ceppo V23. Nel ceppo V80 la mancanza di tale delezione potrebbe essere in parte responsabile del minor livello di induzione di *FLO11*.

Per meglio valutare il legame esistente tra estensione del gene e delle zone interne e intensità dei fenotipi adesivi, e per escludere l'influenza dei diversi background genetici, si è scelto di clonare tre taglie del gene, derivate da tre ceppi flor, in un ceppo genetico. I risultati ottenuti dimostrano in maniera univoca il coinvolgimento di *FLO11* nei fenomeni dell'adesione cellulare e il suo ruolo determinante nella formazione di biofilm su superficie liquida.

- Abramova, N., Sertil, O., Metha, S., Lowry, C.V. (2001). Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 183(9):2881-2887.
- Adams J., Puskas-Rozca S., J. Simlar and C. M. Weilke, 1992 Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 22: 13–19.
- Adams, A., Gottschiling, D.E., Kaiser, C.A., Stearns T. (1997). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Aguilera A., Chavez S. and F. Malagon, (2000). Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast* 16: 731– 754.
- Amberg, D.C., Burke, D.J. and Strathern, J.N. (2005) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual* Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- B. Guo, C. A. Styles, Q. Feng, and G. R. Fink (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating PNAS. 97(22): 12158 - 12163.
- Baillie, G. S. & Douglas, L. J. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol.* 310, 644–656 (1999).

- Baillie, G. S. & Douglas, L. J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 48, 671–679 (1999).
- Bardi L. (2005). In “Microbiologia del vino”. A cura di Vincenzini, M., Romano, P., Farris, G.A. Casa Editrice Ambrosiana: 132-157.
- Bardwell L, Cook JG, Voora D, Baggot DM, Martinez AR, Thorner J (1998). Repression of yeast Ste12 transcription factor by binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* 12, 2887-2898
- Barrales R. R., Jimenez J. and Ibeas J. I. (2008) Identification of Novel Activation Mechanisms for *FLO11* Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 178: 145–156
- Bell P.B., Lindroth M., Fredriksson B-A. (1988). Preparations of cytoskeletons of cells in culture for high resolution scanning and scanning transmission electron microscopy. *Scanning Microscopy*, 2: 1647-1661.
- Berlanga TM., Atanasio C., Mauricio JC., Ortega JM. (2001) Influence of aeration on the physiological activity of flor yeasts. *J Agric Food Chem* 49:3378–3384.
- Betz, R., W. Duntze, and T. R. Manney. (1978). Mating factormediated sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Lett.* 4:107-110.
- Bidenne C., Blondin B., Dequin S., Vezinhet F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Gen.* 22, 1-7.
- Bishop, A. J. R., E. J. Louis, and R. H. Borts. (2000). Minisatellite variants generated in yeast meiosis involve DNA removal during gene conversion. *Genetics*, 156:7–20.
- Bishop, A. J. R., Louis, E. J. & Borts, R. H. Minisatellite variants generated in yeast meiosis involve DNA removal during gene conversion. *Genetics* 156, 7–20 (2000).
- Boeke, J. D., F. LaCroute, and G. R. Fink. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197:345-346.

Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P. & Blondin, B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J. Bacteriol.* 179, 4929–4936 (1997).

Boone, C., Sommer, S.S., Hansel, A., and Bussey, H. (1990). Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall b-glucan assembly. *J. Cell Biol.*, 110, 1833-1843.

Branda SS, Vik S, Friedman L & Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13: 20–26.

Braus, G. H., Grundmann, O., Brückner, S., Mosch, H.-U. (2003). Amino Acid Starvation and Gcn4p Regulate Adhesive Growth and FLO11 Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14: 4272-4284

Braus, G.H., Grundmann, O., Brückner, S., and Mösch, H.U. (2003) Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14: 4272-4284.

Brown T.A. (1999). *Genomes*. Ed. Bios Scientific Publishers Ltd.

Budroni M., Giordano G., Pinna G., Farris G.A. (2000). A genetic study of natural flor strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated during biological ageing from Sardinian wines. *J Appl Microbiol.* Oct;89(4):657-62.

Budroni M., Pinna G., Giordano G., Delogu G., Farris, G. A. (2001). Cariotipi di popolazioni di *Saccharomyces* flor isolate da vini sardi. *Rivista di Viticoltura ed Enologia* 4, 15-24.

Budroni, M., Nobile, C., Roggio, T., Pinna G., Bardi, L., Farris G.A. (1996). PFGE Study of some *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *J. Wine Res.* 7: 201-205.

Butler C, Kenny C, Fagan A, Kurischko C, Gaillardin C, Wolfe KH (2004). Evolution of the *MAT* locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(6), 1632-1637.

Camera di Commercio di Oristano (2002) “Ufficio Agricoltura”. Vini e vigneti DOC della Provincia di Oristano. Oristano, novembre 2002.

Cantarelli C., and Martini A. (1969). On the pellicle formation by “flor” yeasts. *Antonie van Leeuw. Suppl. Yeast Sympos.* 35: F35-F36.

Cappellaro, C., Hauser, K., Mrsa, V., Watzele, M., Watzele, G., Gruber, C. and Tanner, W. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* a- and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction EMBO J., 10, 4081-4088.

Cappellaro, C., Baldermann, C., Reinhard R., and Tanner, W. (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and  $\alpha$ -agglutinin1. The EMBO Journal. 13(20):4737-4744.

Caro, L. H., G. J. Smith, P. van Egmond, J. W. Chapman, and M. Klis. (1998). Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. FEMS Microbiol. Lett. 161:345–349.

Chandra, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J. Bacteriol. 183, 5385–5394 (2001).

Cobb MH and Goldsmith EJ (1995). How MAP kinases are regulated. J Biol Chem 270(25), 14843-14846.

Codon A. C., Benitez T., Korhola M. (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 154-163.

Colombo, S., Ma, P.S., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., et al. (1998) Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 17: 3326–3341.

Colombo, S., Ma, P.S., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., et al. (1998) Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 17: 3326–3341.

Cook JG, Bardwell L, Thorner J (1997). Inhibitory and activating functions for MAP Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signaling pathway. Nature 390, 85-88.

Cooper JA (1994). MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? Curr Biol 4, 1118-1121.

Cormack, B.P., Ghori, N., and Falkow, S. (1999) An adhesion of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578–582.

Cullen, P.J., and Sprague, G.F., Jr. (2000) Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13619-13624.

Cullen, P.J., Sabbagh, W., Jr, Graham, E., Irick, M.M., van Olden, E.K., Neal, C., et al. (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* 18: 1695–1708.

Cutler JE (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45, 187-218.

Cutler, N.S., Pan, X., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2001) The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol Biol Cell* 12: 4103–4113.

D. van Dyk, I. S. Pretorius, and F. F. Bauer (2005) Mss11p Is a Central Element of the Regulatory Network That Controls FLO11 Expression and Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae* Genetics. 169(1): 91 - 106.

Darby, C., Hsu, J. W., Ghori, N. S. & Falkow, S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* 417, 243–244 (2002).

Davey, M. E. & O’Toole, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867 (2000).

Davey, M. E. & O’Toole, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867 (2000).

De Groot, P.W.J., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20: 781–796.

Delfini, C. and Ciolfi, G. (1979). Messa a punto di metodiche standardizzate per la determinazione dei caratteri enologici dei lieviti selezionati. Criteri generali metodologici. *Rivista de Viticoltura ed Enologia*. 5:3-9.

- Delneri D., Colson I., Grammenoudi S., Roberts I.N., Louis E.J., Oliver S.G. (2003). Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature*. Mar 6;422(6927):68-72.
- DeRisi J, Iyer V, Brown P (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- Dolan JW, Kirkman C, Fields S (1989). The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc Natl acad Sci USA* 86, 5703-5707.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33, 1387–1392.
- Dranginis A. M., Rauceo J. M., Coronado J. E. and Lipke P. N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71: 282–294
- E. S. Naumova, Yu. V. Ivannikova, and G. I. Naumov, (2004) Genetic Differentiation of the Sherry Yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 41, No. 6, 2005, pp. 578–582.
- Eggimann, P. & Pittet, D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 295–309 (2002).
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. System. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. (2004). Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenhoek.* 85: 151–158.
- Esteve-Zarzoso, B., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. (2004). Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenhoek.* 85: 151–158.

Esteve-Zarzoso, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A. (2000). Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from "El Penedès" area (Spain). *Food Microbiol.*, 17: 553-562.

Farris G. A., Budroni M., Roggio T., Antonelli A., Carnacini A. (1994). Influenza dei lieviti flor sui componenti volatili della Vernaccia di Oristano. *Workshop "Lieviti Saccharomyces e non Saccharomyces nella Biotecnologia della fermentazione alcolica", Potenza 14-15 settembre; 31-39*

Farris G.A., Deiana P., Budroni M., Cabras P., Spanedda L., Tuberose C. (1991). The transformation of organic acids in Vernaccia wine during flor formation. *J. Ferment. Bioeng.*, 72 (2), 138-140.

Farris G.A., Fatichenti F., Deiana P. (1974). I lieviti del flor del Malvasia di Bosa vino DOC. *Vini d'Italia*, 16 (90), 197-199.

Farris G.A., Fatichenti F., Deiana P. (1976). Sull'impiego del lievito *Saccharomyces bailii* Lindner var. *bailii* (*Zigosaccharomyces acidifaciens* Nickerson) in fase flor. *Ann. Micr.*, 26, 55-61.

Farris G.A., Fatichenti, F., Deiana, P. Ceccarelli S. (1978). L'influenza della temperatura sull'accumulo di acetaldeide da parte di *Sacch. prostoserdovii* in fase flor. *Riv. Di Vitic. Enol.* 31(3), 129-142.

Farris GA, Sinigaglia M, Budroni M, Guerzoni ME (1993). Cellular fatty acid composition in film-forming strains of two physiological races of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett Appl Microbiol* 17, 215-219.

Fatichenti F and Farris GA (1983). I lieviti flor. Estratto dall'Acc. Vite e Vino 35, 253-260.

Fatichenti F., Deiana P., Farris G.A. (1976). Su alcuni fattori di sviluppo del flor di *Saccharomyces bailii* Lindner. *Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari*, 24, 198-207.

Fatichenti F., Farris G.A. (1973). Indagini microbiologiche sulla Vernaccia Sarda. Nota 3<sup>a</sup>. I lieviti flor nelle zone di Baratili, Cabras, Oristano, Riola, SanVeroMilis e Zeddiani. *Vini d'Italia*, anno XV, 83: 136-138.

Fatichenti F., Farris G.A., Madau G. (1975). Selezione di alcuni stipiti di *Sacch. bayanus* e *Sacch. prostoserdovii* per la fermentazione e

l'invecchiamento controllati della Vernaccia Sarda. *Vini d'Italia*, anno XVII, 97: 267-277.

Faticenti F., Melis P., Capriotti A. (1972a). Indagini microbiologiche sulla Vernaccia Sarda. Nota 1<sup>a</sup>. I lieviti dei mosti nella zona di Oristano. *Vini d'Italia*, anno XIV, 79: 321-326.

Faticenti F., Melis P., Capriotti A. (1972b). Indagini microbiologiche sulla Vernaccia Sarda. Nota 2<sup>a</sup>. I lieviti flor nella cantina sociale delle Vernaccia di Oristano. *Vini d'Italia*, anno XIV, 80: 391-393.

Fehrenbacher, G., Perry, K., and Thorner, J. (1978). Cell-Cell Recognition in *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of Mating-Specific Adhesion. *Journal of bacteriology*. 134(3):893-901.

Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000) RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5,8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97.

Frieman, M.B. et al., (2002). Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol. Microbiol.* 46, 479–492.

Frieman, M.B., and Cormack, B.P. (2003) The omega-site sequence of glycosylphosphatidy-inositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol* 50: 883–896.

Frieman, M.B., and Cormack, B.P. (2004) Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cellwall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150:3105–3114.

G. H. Braus, O. Grundmann, S. Bruckner, and H.-U. Mosch (2003) Amino Acid Starvation and Gcn4p Regulate Adhesive Growth and FLO11 Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Biol. Cell.* 14(10): 4272 - 4284.

- Gagiano, M., Bauer, F.F., and Pretorius, I.S. (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2: 433-470.
- Gancedo, J.M. (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25: 107-123.
- Gardner, N., Rodrigue, N., and Champagne, C.P. (1993). Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7): 2022-2028.
- Gaur, N. K., and S. A. Klotz. (1997). Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.* 65:5289–5294.
- Gimeno, C.J., and Fink, G.R. (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* 14: 2100-2112.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090.
- Granchi, L., Bosco, M., Vicentini, M., (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* 87, 949–956.
- Groes, M., Teilmann, K., Olesen, K., Poulsen, F.M., and Henriksen, A. (2002) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 2135–2137.
- Guidici, P. and Zambonelli, C. (1992). Criteri di selezione dei lieviti per enologia. *Vignevini.* 9:29-34.

Guillamon, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A., (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region. Arch. Microbio. 169:387-392.

Guillamon, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A., (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region. Arch. Microbio. 169:387-392.

Gum JR, Hicks JW, Toribara NW, Rothe EM, Lagace RE, Kim YS (1992). The human *MUC2* intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both downstream of its central repetitive region. J Biol Chem 267, 21375-21383.

Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., and Fink, G.R. (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 12158-12163.

Hagen DC, McCaffrey G, Sprague GF (1991). Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the *FUS1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 11, 2952-2961.

Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., and Fink, G.R. (2004) Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. Cell 116: 405-415.

Hawser, S. P. & Douglas, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect. Immun. 62, 915–921 (1994).

Henschke, P.A., Jiranek, V. (1991). Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, Seattle, USA, 18 e 19 de junho de, 172-184.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Gonzalez, A., Mas, A., and Guillamon J.M. (2006). Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-

QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11): 7148–7155.

Hierro, N., Gonzalez, A., Mas A. and Guillamon, J.M. (2004). New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology.* 97: 792–801

Hoyer, L. L., Payne, T. L. & Hecht, J. E. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J. Bacteriol.* 180, 5334–5343 (1998).

Idda L. (1995). Agroalimentare in Sardegna strutture, competitività e decisioni imprenditoriali. *Progetto RAISA, pubblicazione n°2421.*

Imura Y, Hara S, Otsuka K (1980). Cell surface hydrophobicity as a pellicle formation factor in film strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* 44, 1215-1229.

Jentoft, N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15: 291–294.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A. (1995). Regulation of hydrogen sulphide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 61 N.2: 461-467.

Johnston J.R., Baccari C., Mortimer R.K. (2000). Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res. Microbiol. Sep*;151(7):583-90.

Kang, S., and Choi, H. (2005) Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly (styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 46: 70–77.

Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* 1426: 373–383.

Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L., and Cormack, B.P. (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8: 378–384.

- Kim, T.S., Kim, H.Y., Yoon, J.H., and Kang, H.S. (2004) Recruitment of the Swi/Snf complex by Ste12-Tec1 promotes Flo8-Mss11-mediated activation of STA1 expression. *Mol Cell Biol* 24: 9542–9556.
- Kleinschmidt M. (2005) Regulation of gene expression and adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. PhD Thesis
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 239–256 (2002).
- Klotz, S.A., Gaur, N.K., Lake, D.F., Chan, V., Rauceo, J., and Lipke, P.N. (2004) Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun* 72:2029–2034.
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone, H. (1998) Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* 180: 6503–6510.
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone, H. (1998) Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* 180: 6503–6510.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P.S., Teunissen, A., Donaton, M.C.V., Van Dijck, P., et al. (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* 32: 1002–1012.
- Kron, S.J. (1997) Filamentous growth in budding yeast. *Trends Microbiol* 5: 450–454.
- Kronstad JW, Holly JA, MacKay VL (1987). A yeast operator overlaps an upstream activation site. *Cell* 50, 369-377.
- Kumamoto, C.A. (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5576–5581.
- Kumamoto, C.A., and Vines, M.D. (2005) Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* 59: 113–133.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., (1998). *The Yeasts, a Taxonomic Study* 4th edn. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Scienze B. V.

Kussell, E., and Leibler, S. (2005) Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309: 2075–2078.

Kuthan M, Devaux F, Janderova B, Slaninova I, Jacq C & Palkova Z (2003) Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol* 47: 745–754.

Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J., and Pretorius, I.S. (1996) Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8419-8424.

Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P., and Thevelein J.M. (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 16: 293–299.

Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., et al. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 746–785.

Li F & Palecek SP (2003) EAP1 a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* 2: 1266–1273.

Li, F. & Palecek, S. P. EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot. Cell* 2, 1266–1273 (2003).

Li, F., and Palecek, S.P. (2003) EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* 2: 1266–1273.

Liu, H.P. (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 4: 728–735.

Lo WS, Raites EI, Dranginis AM (1997). Development of pseudohyphae by embedded haploid and diploid yeasts. *Curr Genet* 32, 197-202

Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1996) *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* 178: 7144-7151.

Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9: 161-171.

Lois M. Douglas, Li Li, Yang Yang and A. M. Dranginis (2007) Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a yeast mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryotic Cell*

Lorenz, M.C., Cutler, N.S., and Heitman, J. (2000) Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 183–199.

Lu, C. F. et al. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross linking of  $\alpha$ -agglutinin and  $\beta$ -1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell. Biol.* 128, 333–340 (1995).

M. Sipiczki, P. Romano, G. Lipani, I. Miklos & Z. Antunovics (2001). Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 97–105

Madhani, H., and Fink, G. (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* 275: 1314–1317.

Maidan, M.M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., et al. (2005) The G protein-coupled receptor Gpr1 and the G $\alpha$  protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 16: 1971–1986.

Mannazzu I., Budroni, M. (2005). In "Microbiologia del vino". A cura di Vincenzini, M., Romano, P., Farris G.A., Casa Editrice Ambrosiana: 393-412.

Mannazzu, I., Simonetti, E., Marinangeli, P., Guerra, E., Budroni, M., Thangavelu, M., and Clementi F. (2002). *SED1* Gene Length and Sequence Polymorphisms in Feral Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 68(11): 5437–5444.

Marinangeli, P., Angelozzi, D., Ciani, M., Clementi F., Mannazzu, I. (2004). Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterisation. *FEMS Yeast Research.* 4:427-435,.

Marshall CJ (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 4, 82-89.

Martínez de la Ossa E., Pérez L., Caro I. (1987b). Variations of the major volatiles through aging of sherry. *Am J Enol Vitic* 38: 293–297

Martinez P., Codòn A.C., Perez L., Benitez T. (1995). Physiological and molecular characterization of flor yeast: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast*,11, 1399-1411

Martinez P., Pérez Rodríguez L., and Benítez T.(1997). Velum formation by flor yeasts isolated from sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48: 55-62.

Martinez, A., Torello, S. & Kolter, R. Sliding motility in mycobacterium. *J. Bacteriol.* 181, 7331–7338 (1999).

Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, C., (2002). Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *J. Food Prot.*64(6):1033-1037

*Microbiol* 38: 348–358.

Mortensen H D., Dupont K., Jespersen L., Arneborg N., (2007) The Flo11p-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain background S288c can adhere to plastic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60 131–134

Mortimer R.K. (2000). Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* 2000 Apr;10(4):403-9. Erratum in: *Genome Res* Jun;10(6):891

Mosch HU and Fink GR (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145, 671-674.

Mosch HU, Kubler E, Krappman S, Fink GR, Braus GH (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 1325-1335.

Mösch, H.U. (2000) Pseudohyphal development of *Saccharomyces cerevisiae*. *Contrib Microbiol* 5: 185-200.

Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., and Marton, M.J. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21: 4347-4368.

Nett J. and Andes D. (2006) *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology* 2006, 9:340–345

Nguyen, M. H. et al. Therapeutic approaches in patients with candidemia. *Arch. Intern. Med.* 155, 2429–2435 (1995).

Nikolaou, E., Soufleros. E., Bouloumpasi, E., Tzanetakis, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*. 23: 205-211

Nobile C J. and Mitchell A. P. (2006) Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation *Cellular Microbiology*. 8 (9), 1382–1391

Noderstgaard B.G., Rostgaard J. (1985). Critical-point drying versus freeze drying for scanning electron microscopy: a quantitative and qualitative study on isolated hepatocytes. *Journal of Microscopy*, 137: 319-332.

Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A., and Riezman, H. (1991). Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 27-37.

O'Neill G.T, and Kaufman M.H. (1987). Cytogenetic analysis of first cleavage fertilized mouse eggs following in vivo exposure to ethanol shortly before and at the time of conception. *Development* 100: 441-448.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79 (2000).

Odds FC (1994). *Candida* species and virulence. *ASM News* 60, 313-318.

Oehlen L and Cross FR (1998). The mating factor response pathway regulates transcription of *TEC1*, a gene involved in pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 429, 83-88.

- Palecek, S.P., Parikh, A.S., and Kron, S.J. (2002) Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* 148: 893-907.
- Pan, X., Harashima, T., and Heitman, J. (2000) Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 3: 567-572.
- Pan, X.W., and Heitman, J. (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* 22: 3981–3993.
- Pâques, F., Richard, G.-F. & Haber, J. E. (2001) Expansions and contractions in 36-bp minisatellites by gene conversion in yeast. *Genetics* 158, 155–166.
- Pâques, F., Richard, G.-F. & Haber, J. E. Expansions and contractions in 36-bp minisatellites by gene conversion in yeast. *Genetics* 158, 155–166 (2001).
- Perez-Coello, M.S., Briones Perez, A.I., Ubeda Iranzo, J.F., Martin Alvarez, P.J. (1999). Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiol.* 16: 563-573
- Pinna G., Budroni M., Giordano, Usai S. G., Farris G.A. (2001). Intraspecific characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* flor strains by mtDNA RFLP analysis. *Annals of Microbiology*, 50, 177-182
- Pirino (2004) Analisi molecolare della formazione di biofilm e del ciclo vitale in ceppi filmogeni di *Saccharomyces cerevisiae*. Tesi di Dottorato
- Pirino (2004) Analisi molecolare della formazione di biofilm e del ciclo vitale in ceppi filmogeni di *Saccharomyces cerevisiae*. Tesi di Dottorato
- Pretorius I. S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675–729.
- Prusty, R., Grisafi, P., and Fink, G.R. (2004) The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4153–4157.

Puig S., Perez-Ortin J.E. (2000). Expression levels and patterns of glycolytic yeast genes during wine fermentation. *Syst Appl Microbiol.* Jun;23(2):300-3.

Purevdorj-Gage B., Orr M. E., Stoodley P., Sheehan K. B. & Hyman L. E. (2007) The role of *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae* biofilm development in a laboratory based flow-cell system. *FEMS Yeast Res.*

Querol A., Barrio E., Huerta T., Ramon D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (9): 2948-2953.

Rachidi N., Barre P., Blondin B. (1999). Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* Jun;261(4-5):841-50.

Recht, J., A. Martinez, S. Torello, and R. Kolter. (2000). Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 182:4348–4351.

Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878-881.

Rigden, D.J., Mello, L.V., and Galperin, M.Y. (2004) The PA14 domain, a conserved all-beta domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends Biochem Sci* 29: 335–339.

Roberts RL and Fink GR (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* 8, 2974-2985.

Robertson LS and Fink GR (1998). The three yeast kinases have specific functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(23), 13783-13787.

Rolland, F., De Winde, J.H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J.M., and Winderickx, J. (2000) Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol*

- Romano P., Suzzi G., Turbanti L., Polsinelli M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 118:213–218
- Romano, P. (2005). In “Microbiologia del vino”. A cura di Vincenzini, M., Romano, P., Farris, G.A. Casa Editrice Ambrosiana: 101-131.
- Romano, P., Suzzi, G. (1993). Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* 108(1):23-26.
- Roy, A., Cha Fen Lu, Marykwas, D.L., Lipke, P.N., AND Kurjan, J. (1991). The AGA1 Product Is Involved in Cell Surface Attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Adhesion Glycoprotein a-Agglutinin. *Molec. Cell. Biol.* 11(8): 4196-4206
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.J., Madhani, H., and Fink, G. (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J* 18: 1257-1269.
- Ryley JF and Ryley NG (1990). *Candida albicans*- do mycelia matter? *J Med Vet Mycol* 28, 225-239.
- S. Zara, A. T. Bakalinsky, G. Zara, G. Pirino, M. A. Demontis, and M. Budroni (2005) FLO11-Based Model for Air-Liquid Interfacial Biofilm Formation by *Saccharomyces cerevisiae* *Appl. Envir. Microbiol.* 71(6): 2934 - 2939.
- Sampermans, S., Mortier, J., and Soares, E.V. (2005) Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J Appl Microbiol* 98: 525–531.
- Sato, M., Maeba, H., Watari, J., and Takashio, M. (2002). Analysis of an inactivated Lg-FLO1 gene present in bottom-fermenting yeast. *J Biosci Bioeng* 93: 395–398.
- Scala C., Pasquinelli G. (1987). *Microscopia elettronica a scansione in biologia*. Editrice QUEB, Bologna, Italia
- Schwartz, M.A., and Madhani, H.D. (2004) Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 38: 725–748.

Sean P. Palecek, Archita S. Parikh and Stephen J. Kron (2000) Genetic Analysis Reveals That FLO11 Upregulation and Cell Polarization Independently Regulate Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae* Genetics 156: 1005–1023

Shimoi, H., H. Kitagaki, H. Ohmori, Y. Imura, and K. Ito. (1998). Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. J. Bacteriol. 180:3381–3387.

Song W and Carlson M (1998). Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. EMBO J 17(19), 5757-5765.

Spellman, P. T., G. Sherlock, M. Q. Zhang, V. R. Iyer, M. B. Eisen, P. O. Brown, D. Botstein, and B. Futcher. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. Mol. Biol. Cell. 12:3273–3297.

Spiropoulos, A., and Bisson, L. (2000). *MET17* and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. and Environ. Microbiol. 66(10):4421–4426

Stratford, M. (1992) Yeast flocculation – a new perspective. Adv Microb Physiol 33: 1–71.

Suarez Lepe J. A., and Inigo Leal B., (1990). La crianza biologica del vino. Microbiologia enologica, Fundamentos en Vinificacion 503-539

Suarez Lepe JA and Inigo Leal B (1990). La crianza biologica del vino. Microbiologia enologica, Fundamentos en vinification 503-539.

T. Galitski, A. J. Saldanha, C. A. Styles, E. S. Lander, and G. R. Fink (1999) Ploidy Regulation of Gene Expression Science. 285(5425): 251 - 254.

Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P., and Schmidt, R.E. (1999) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. Biol Chem 380:503–523.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987b) 3 Different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50: 277–287.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., et al. (1987a) Cloning and characterization of Bcy1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein-kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 1371–1377

Todd B. Reynolds, An Jansen, Xin Peng, Gerald R. Fink (2007) Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryotic Cell*

Tomas Linder, Claes M. Gustafsson (2007). Molecular phylogenetics of ascomycotal adhesions. A novel family of putative cell-surface adhesive proteins in fission yeasts. *Fungal Genet. Biol.*, doi:10.1016/j.fgb.2007.08.002

Udenfriend, S. & Kodukula, K. How glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 563–591 (1995).

Vai, M., Gatti, E., Lacanas, E., Popolo, L., and Alberghino, L. (1991). Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycopospholipid-anchored protein containing a serine rich region. *J. Biol. Chem.*, 266, 12242-12248.

Varon M & Choder M (2000) Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Bacteriol* 182: 3877–3880.

Vaughan-Martini, A. and Martini, A., *Saccharomyces Meyen ex Reess*, in *The Yeast, a Taxonomic Study*, Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds., Amsterdam: Elsevier, 1998, pp. 358–371.

Versele, M., Lemaire, K., and Thevelein, J.M. (2001) Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Report* 2: 574–579.

Verstrepen K. J., and Klis F. M., (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology* (2006) 60 (1), 5–15

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Delvaux, F.R., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Bauer, F.F., and Pretorius, I.S. (2001) Late fermentation

expression of FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Soc Brew Chem* 59: 69–76.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., and Delvaux, F.R. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 197–205.

Verstrepen, K.J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., et al. (2004b) Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends Biotechnol* 22: 531–537.

Verstrepen, K.J., Jansen, A., Lewitter, F., and Fink, G.R. (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet* 37: 986–990.

Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2004a) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nature Rev Microbiol* 2: 533–540.

Veziñhet F., Blondin B., Hallet J. N. (1990). Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 568-571

Veziñhet F., Hallet J. N., Valade M., Poulard A. (1992). Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 83-86.

Vyas, V.K., Kuchin, S., Berkey, C.D., and Carlson, M. (2003) Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Mol Cell Biol* 23: 1341–1348.

Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R., and Garrett, S. (1995) SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* 15: 6854–6863.

Watzel, M., F. Klis, and W. Tanner. (1988). Purification and characterization of the inducible agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 7:1483-1488.

Welcker, A. J., deMontigny, J., Potier, S. & Souciet, J. L. (2000) *Genetics* 156, 549–557

- Wenzel RP and Pfaller MA (1991). *Candida* species: emerging hospital bloodstream pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 12, 523-524.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* ed. Innis, M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.. London Academic Press: 315-322.
- Wilson, W.A., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP: ATP ratio. *Curr Biol* 6: 1426–1434.
- Winderickx, J., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Giots, F., et al. (2003) From feast to famine: adaptation to nutrient availability in yeast. In *Topics in Current Genetics, vol. 1: Yeast Stress Responses*. Hohmann, S., and Mager, P.W.H. (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 305–386.
- Wingender, J., Strathmans, M., Rode, A., Leis, A. & Flemming, H. C. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol.* 336, 302–314 (2001).
- Yanagishima, N. (1984) In Linskens, H.F. and Heslop-Harrison (eds), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*. Springer, Berlin, Germany, Vol. 17, pp. 402-432.
- Zambonelli, C. (1998). *Microbiologia e Biotecnologie dei vini*. Ed. Ed agricole, Bologna.
- Zara G., Angelozzi D., Belviso S., Bardi L., Goffrini P., Lodi T. Budroni M., Mannazzu I., (2008) Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions Submitted to: *FEMS Yeast Research*
- Zara S, Bakalinsky AT, Zara G, Pirino G, Demontis MA & Budroni M (2005) FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 71: 2934–2939.

Zara S, Farris GA, Budroni M, Bakalinsky AT (2002). *HSP12* is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19, 269-276.

Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C.T., Hannett, N.M., Volkert, T.L., Fink, G.R., and Young, R.A. (2003) Program specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* 113:395–404.

Zhou L. M., Timmis K. N., Ramos J. L., (1990) Mutation leading to constitutive expression from the TOL plasmid meta-cleavage pathway operon are located at the C-terminal end of the positive regulator protein XylS. *J. Bacteriol.* 172 (7): 3707-3710