



FEASR

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



REGIONE del VENETO



# PROGETTO BIODILIEVITI

RIPRISTINO DELLA BIODIVERSITÀ DELLE POPOLAZIONI DI LIEVITI AUTOCTONI IN VIGNETO  
NEL CONEGLIANO VALDOBBIADENE PER UNA ECOLOGIA ECOSOSTENIBILE CHE RIDUCA  
L'USO DI SOLFITI E DI LIEVITI SELEZIONATI NON AUTOCTONI



PROSECCO SUPERIORE  
DAL 1876

CONEGLIANO VALDOBBIADENE  
PROSECCO SUPERIORE



# PROGETTO BIODILIEVITI

RIPRISTINO DELLA BIODIVERSITÀ DELLE POPOLAZIONI DI LIEVITI AUTOCTONI IN VIGNETO NEL CONEGLIANO VALDOBBIADENE PER UNA ECOLOGIA ECOSOSTENIBILE CHE RIDUCA L'USO DI SOLFITI E DI LIEVITI SELEZIONATI NON AUTOCTONI

## INDICE

<b>Introduzione</b>	<b>pag. 5</b>
<b>Un po' di storia... caratteristiche del territorio e del vino</b>	<b>pag. 6</b>
<b>I lieviti enologici: importanza, caratteristiche e metodi per il riconoscimento</b>	<b>pag. 13</b>
<b>Attività sperimentale e risultati</b>	<b>pag. 17</b>
<b>Considerazioni conclusive</b>	<b>pag. 25</b>



## **Introduzione**

Il progetto BIODILEVITI è stato uno studio con l'obiettivo di ripopolare i vigneti della DOCG Prosecco Conegliano-Valdobbiadene con ceppi di lievito tipici della zona. A questo scopo si è utilizzata una ampia collezione di lieviti isolati nel corso degli ultimi anni da numerosi vigneti della DOCG. Cinque di questi lieviti sono stati introdotti in due vigneti, uno biologico ed uno convenzionale, verificandone la capacità di colonizzazione. Il successo di questo approccio potrebbe consentire una gestione delle vinificazioni più "naturale" che preveda un minor ricorso all'anidride solforosa e che riduca o eviti del tutto l'impiego di lieviti commerciali, che normalmente provengono da tutt'altre regioni geografiche.

## **Gruppo di ricerca**

*Università degli Studi di Padova:*

Alessio Giacomini  
Viviana Corich  
Vasco Boatto  
Samuele Trestini  
Chiara Vendramini  
Alessia Viel  
Chiara Nadai  
Milena Carlot  
Christian Lazzari  
Luigino Barisan  
Federica Bianchin  
Ilaria Giraldin

*Veneto Agricoltura:*

Angiolella Lombardi  
Christian Andrighetto  
Giorgio Marcazzan

*Consorzio di Tutela Prosecco Conegliano Valdobbiadene:*

Filippo Taglietti

Azienda "Il Colle" (San Pietro di Feletto)

Azienda "San Giovanni Perini" (Manzana)

## Un po' di storia... Le caratteristiche del Territorio e del vino

(a cura del Consorzio di Tutela del Prosecco di Conegliano Valdobbiadene)

La morfologia dell'area di produzione della DOCG Conegliano-Valdobbiadene Prosecco si compone di una serie di rilievi collinari allungati "a cordonata", definito sistema ad "hogback", disposti con direzione nord-sud nella parte più meridionale e con direzione est-ovest nella parte settentrionale. Tali rilievi sono separati da una serie di valli percorse da piccoli corsi d'acqua (Figura 1).

Figura 1.  
Le colline della  
DOCG Conegliano  
Valdobbiadene Prosecco.



L'area a nord si appoggia sulla catena prealpina che funge da barriera naturale all'ingresso di correnti fredde, mentre a sud la zona gode delle temperature miti della laguna di Venezia, da cui dista soli 40 Km.

La disposizione est-ovest dei terreni collinari, la forte pendenza, la conseguente giacitura rivolta a sud dei vigneti, permette la massima intercettazione dei raggi solari, creando un areale ideale per la coltivazione delle uve bianche destinate al Conegliano-Valdobbiadene Prosecco.

I suoli della zona si sono originati dal sollevamento di fondali marini e sono stati successivamente modificati dall'azione dei ghiacciai e dei fiumi. I terreni sono costituiti in prevalenza da arenarie e marne, a cui si alternano strati morenici ed alluvionali. Tale profilo favorisce il costante drenaggio dell'acqua.

Il clima dell'area del Conegliano Valdobbiadene è di tipo temperato, con stagioni ben delineate, caratterizzato da un'inversione termica notturna che consente di avere, nel periodo di maturazione delle uve, marcate escursioni di temperatura fra la notte ed il giorno, grazie alla discesa lungo i pendii della colline, di aria fresca proveniente dalle Prealpi.

Le piogge frequenti del periodo estivo garantiscono l'apporto idrico sufficiente per il vitigno Glera, sensibile nel contempo sia al ristagno idrico che alla siccità. Questa condizione particolare si realizza grazie alla forte acclività ed allo scarso

spessore di suolo esplorabile dalle radici delle viti.

Nel cuore della Denominazione è presente una piccola sottozona denominata Cartizze (Figura 2), di soli 106 ha, i cui terreni presentano una particolare pendenza ed esposizione verso sud che crea una sorta di anfiteatro naturale, molto apprezzato a livello qualitativo e paesaggistico.

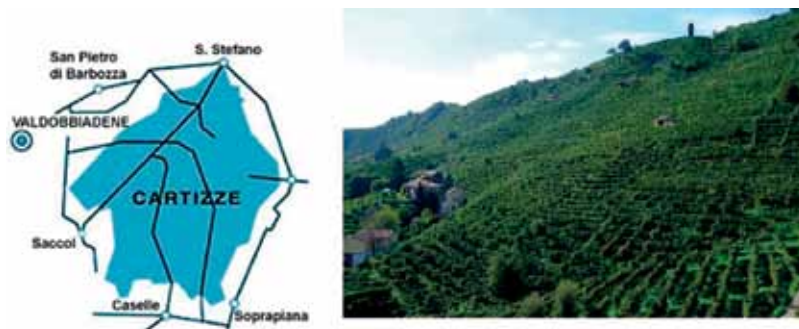


Figura 2.  
La zona del Cartizze.

La grande variabilità pedologica e climatica della denominazione trova espressione grazie alla menzione comunale “Rive”, che mette in luce la peculiare vocazione che esprimono le diverse località della zona di produzione.

#### Fattori storici

L'area collinare del Conegliano-Valdobbiadene Prosecco vanta un'antichissima tradizione legata alla coltura della vite, le cui prime testimonianze scritte risalgono alle lapidi dei coloni romani. Già alla fine del VI secolo, il vescovo di Poitiers, Venanzio Fortunato, nato a Valdobbiadene, ricordava le sue colline come *“la terra in cui eternamente fiorisce la vite sotto la montagna dalla nuda sommità ove il verde ombroso protegge e ristora”*.

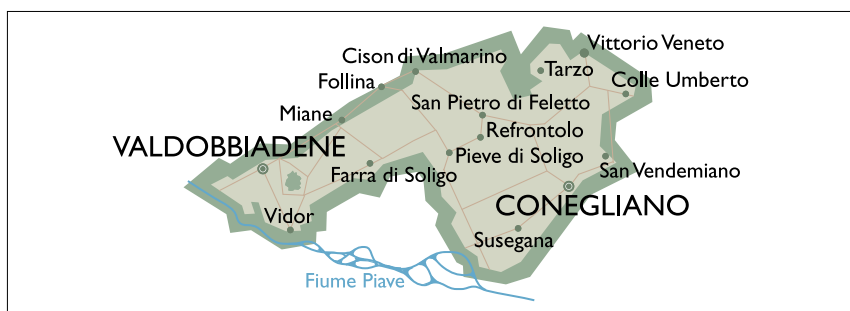
Successivamente la vocazione alla produzione di vini bianchi nella zona di Conegliano-Valdobbiadene è testimoniata da numerosissimi documenti, a partire dagli “Statuti Coneglianesi” del 1282, a quelli relativi alla dominazione della Repubblica Veneziana, alle testimonianze per l'apprezzamento del “vino bianco delle colline di Conegliano Valdobbiadene” dei regnanti inglesi, asburgici e polacchi dei secoli successivi.

La prima citazione scritta della coltivazione del Prosecco nelle colline di Conegliano Valdobbiadene, è opera del nobile coneglianese **Francesco Maria Malvolti**, che nell'VIII numero del Giornale d'Italia del 1772, parla della coltivazione della vite in quest'area. Da questo periodo le citazioni e la fama del Prosecco crebbero in tutto il comprensorio del Conegliano-Valdobbiadene, tanto che, verso la metà dell'800, iniziò ad essere coltivato in purezza. Importanti in questo senso sono le citazioni di due studiosi; il Conte Balbi Valier, selezionatore del biotipo chiamato Prosecco Balbi *“con acini tondi e dal sapore e gusto fine, tendente all'aromatico”*, ancor oggi apprezzato e largamente coltivato in tutto il comprensorio e quello dello storico Semenzi che, cita in un suo scritto *“...squisitissimi vini bianchi sono la verdisa,*

la *Prosecco e la bianchetta*”, vitigni che ancora oggi compongono l’uvaggio del Conegliano Valdobbiadene.

La tradizione vitivinicola di questo territorio e la cultura scientifica, trovano concreta applicazione con la nascita nel 1876 a Conegliano della **prima Scuola di Viticoltura ed Enologia d’Italia**, dalla quale si è sviluppata, nel 1923, la prima Stazione Sperimentale di Viticoltura ed Enologia, ancor oggi sede di riferimento per la ricerca e sperimentazione viticola per il Ministero dell’Agricoltura Italiana. Nel 1962 i produttori locali, al fine di tutelare il territorio e il vino, si riuniscono in Consorzio di tutela per definire il disciplinare di produzione, che consente di ottenere, nel 1969 dal Ministero dell’Agricoltura, il riconoscimento a **Denominazione di Origine Controllata del “Prosecco dei Colli di Conegliano Valdobbiadene”** (Figura 3).

Figura 3.  
Cartina della DOCG  
del “Prosecco dei Colli di  
Conegliano-Valdobbiadene”



Nel 1966 nasce la prima Strada del vino Italiana, a conferma della tradizione produttiva e della rinomanza e bellezza di questo territorio.

Il particolare valore del Conegliano Valdobbiadene viene riconosciuto dalla Regione Veneto, nel 2003, con l’istituzione del **primo distretto spumantistico italiano**, certificando anche sotto il profilo economico la rilevanza nazionale della denominazione. Nel **2009**, grazie al continuo miglioramento della qualità e alla notorietà che ha raggiunto in 40 anni di successi nazionali ed internazionali, la Denominazione Conegliano Valdobbiadene è stata riconosciuta dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali come **Denominazione di Origine Controllata e Garantita (DOCG)**, ponendo questo territorio al vertice qualitativo della Denominazione Prosecco (Figura 4).

Figura 4.  
Marchio della DOCG  
Prosecco di Conegliano e  
Valdobbiadene





Nel 2010, i Ministeri dell'Agricoltura e dei Beni Culturali, inseriscono il Conegliano-Valdobbiadene Prosecco nella lista Prioritaria delle **candidature italiane per il riconoscimento come Patrimonio dell'umanità dell'Unesco**.

*Fattori umani*

L'area di coltivazione da cui si ottiene il vino Conegliano-Valdobbiadene è costituita da colline fortemente acclivi i cui pendii, nel corso dei secoli, sono stati modellati dall'opera manuale e dall'ingegno dell'uomo. Le operazioni in vigneto sono **principalmente effettuate a mano** (Figura 5), poiché la forte pendenza dei terreni permette un uso solo parziale delle macchine agricole.



*Figura 5.  
Vendemmia a mano di uve Glera.*

Il termine “**Rive**”, di uso tradizionale, è una menzione che distingue i vigneti posti in singoli comuni o frazioni: qui la vendemmia manuale obbligatoria, consente di preservare l'integrità delle bucce degli acini, fondamentale per la conservazione e il successivo trasferimento degli aromi nei vini spumanti. Le colline sono coltivate con filari a “**girapoggio**” (Figura 6), una scelta sviluppata nei secoli dai viticoltori per conservare la fertilità dei suoli e contenere i fenomeni erosivi dovuti alla pendenza. Gli sforzi compiuti dall'uomo nell'arco dei millenni hanno creato e conservato un **paesaggio di rara bellezza**: vigneti che avvolgono le colline alternati a macchie arboree ed arbustive di essenze autoctone intervengono ad aumentare il patrimonio di biodiversità naturalistica, creando uno degli ambienti viticoli più singolari d'Italia.

*Figura 6.*  
*Vigneti con sistemazione*  
*“a girapoggio”*



Nei secoli l'esperienza dei viticoltori ha caratterizzato la Denominazione: la base ampelografica costituita dalla selezione e conservazione di antichi **vitigni autoctoni, coltivati nell'area fin dal 1500, (Bianchetta, Verdiso, Perera)** è utilizzata dai produttori per comporre le cuvée da avviare alla spumantizzazione. Un'altra pratica storica e tradizionale prevede l'utilizzo di piccole percentuali di Pinot e Chardonnay nella produzione dello spumante.

La spumantizzazione, che avviene in autoclave (*Figura 7*) con il **metodo Martinotti**, è stata perfezionata e codificata nella seconda metà del '900 a Conegliano dal prof. **Tullio De Rosa**, permettendo di esaltare al meglio le specificità dello spumante di questa zona.

*Figura 7.*  
*Autoclavi per*  
*spumantizzazione*



Conegliano è da sempre culla della ricerca e oltre all'antica Scuola Enologica e al Centro di Ricerche Viticole, è presente una **sede Universitaria per la laurea in Viticoltura ed Enologia** (Figura 8), strutture che consentono di tramandare alle nuove generazioni, l'enorme patrimonio umano e scientifico sviluppato nei secoli in questo territorio.



Figura 8.  
Strutture dell'Università di Padova a Conegliano

#### *Specificità del prodotto*

Il Conegliano-Valdobbiadene Prosecco viene prodotto con un vitigno principale, la **Glera**, e con altri vitigni minori, **Verdiso**, **Bianchetta**, **Perera** e **Glera lunga**, che si aggiungono a questa per un massimo del 15%.

L'unione di queste varietà di antica coltivazione nella zona, consente di ottenere un vino che riunisce il legame inscindibile fra vite ed ambiente; ne risulta uno spumante fresco e vitale nelle sue note fruttate e floreali, minerale e asciutto in bocca.

La Glera è un vitigno vigoroso, che nei secoli ha trovato nelle colline della Denominazione le condizioni ambientali più adatte per un buon accumulo di zuccheri ed una contemporanea conservazione dell'acidità malica e delle sostanze aromatiche.

Il Conegliano-Valdobbiadene Prosecco viene preparato quasi interamente nella versione spumante. Si caratterizza per un profumo leggermente aromatico, con sentori fruttati e floreali, di frutta bianca e fiori di campo ed acacia. bianco, di colore paglierino con riflessi verdognoli, sapido. Di gusto secco, equilibrato, minerale, di vivace acidità, viene prodotto nelle versioni **Brut**, **Extra Dry** e **Dry** che si distinguono per il residuo zuccherino.

La tipologia **Brut** si caratterizza per profumi freschi e fruttati, con sfumature di agrumi.

La tipologia **Extra Dry** è la versione tradizionale che combina l'aromaticità con la sapidità. Fresco, elegante ricco di profumi di fiori e frutta bianca, al palato è morbido ed al tempo stesso asciutto.

La tipologia **Dry** si caratterizza per la maggiore aromaticità, per profumi più complessi ed una maggiore pienezza gustativa.

La tipologia **Rive**, prodotta esclusivamente con uve provenienti da un unico Comune o frazione, è in grado di esaltare tutte le peculiarità dello spumante, ottenuto nei singoli territori.

L'area del Conegliano-Valdobbiadene possiede una sottozona che riassume tutte le caratteristiche più tipiche dello spumante: il **Cartizze**. Sapido ed equilibrato al gusto, ha note molto distintive, un fruttato che ricorda la mela, la pera e un floreale che ricorda i fiori bianchi, il glicine e la rosa.

Il Conegliano-Valdobbiadene viene prodotto anche nella versione **frizzante**, con fermentazione in autoclave, che esprime appieno la vivacità e la freschezza del prodotto e con rifermentazione naturale in bottiglia; sapido e minerale al gusto, si caratterizza per i profumi più maturi e per il leggero sentore di lievito.

Il **tranquillo** rappresenta una particolarità locale che si distingue per la "facilità di beva" e le note vinose tipiche del vitigno.

#### *Legame fra ambiente e prodotto*

La naturale **vocazione alla produzione di vini bianchi** è stata nei secoli il tratto distintivo dell'area Conegliano-Valdobbiadene; già nel 1936 uno studio pedologico dell'Istituto Sperimentale di Conegliano, individuava le caratteristiche pedoclimatiche dell'area della Denominazione e la sua vocazione alla produzione di vini bianchi, fruttati, floreali, sapidi ed asciutti.

Il sistema collinare "*hogback*" favorisce l'intercettazione luminosa, il drenaggio costante dell'acqua e temperature più elevate che permettono al Prosecco, varietà a scarso accumulo zuccherino, di raggiungere il giusto equilibrio fra la componente zuccherina ed acida. I suoli, composti da arenarie e marne, frammiste a rocce conglomeratiche e moreniche, conferiscono alle uve note aromatiche molto intense e fini, oltre ad una **mineralità** e **sapidità** tipiche del Conegliano-Valdobbiadene Prosecco.

Il clima temperato e le forti escursioni termiche tipiche di queste zone collinari, determinano nell'uva un accumulo di **composti aromatici complessi**, che consente di ottenere le caratteristiche note vinose e floreali.

Tali fattori inoltre determinano la conservazione dell'acidità fissa, soprattutto nella sua frazione malica, che nel Conegliano-Valdobbiadene Prosecco assicurano allo spumante una freschezza ed un'acidità mai aggressiva.

I fattori pedoclimatici di quest'area collinare, infatti, determinano una **lenta maturazione dei grappoli**, consentendo un accumulo più completo sia delle sostanze aromatiche che una degradazione molto più lenta della componente acida.

La **piovosità estiva**, che nella zona è significativamente superiore alla restante parte della provincia di Treviso, permette alla Glera e alle altre varietà minori di vegetare in modo equilibrato e di creare una parete fogliare capace sia di sostenere l'accumulo di componenti glucidiche e aromatiche sia di proteggere i grappoli nel periodo estivo da eventuali scottature solari salvaguardando così la frazione acida e aromatica che caratterizza il Prosecco di Conegliano-Valdobbiadene.

## I lieviti enologici: importanza, caratteristiche e metodi per il loro riconoscimento

(a cura di Veneto Agricoltura)

### Metodi di studio e selezione di nuovi lieviti

La qualità di un vino e la complessità delle sue caratteristiche sensoriali dipendono da molti fattori sia viticoli che tecnologici e anche se il vecchio detto “i migliori vini nascono in vigneto” è ancora valido, è assolutamente riconosciuta l'importanza del **contributo apportato dal lievito**.

Anticamente il vino si produceva sfruttando inconsapevolmente l'azione dei lieviti naturalmente presenti nel vigneto, i quali però con l'avvento delle moderne tecniche di gestione dei vigneti hanno diminuito notevolmente la loro presenza, mettendo a volte a rischio le vinificazioni “spontanee”.

Risulta quindi fondamentale disporre di metodologie analitiche che consentano di isolare e studiare i lieviti presenti in vigneto e **selezionare nuovi ceppi** con peculiari caratteristiche enologiche e di qualità. Secondo le recenti indicazioni provenienti dal settore della ricerca e della sperimentazione, la selezione di nuovi lieviti non dovrà riguardare esclusivamente ceppi appartenenti a specie abitualmente utilizzate in ambito enologico (*Saccharomyces cerevisiae* e *S. bayanus*), **ma dovrà essere estesa anche ad altre specie di lieviti non convenzionali** (Figura 9).



Figura 9.  
Immagini al microscopio ottico di specie di lieviti riscontrabili in vigneto

Studi recenti riportano infatti dati molto incoraggianti sull'impiego in vinificazione di lieviti *non-Saccharomyces*. L'impiego di questi lieviti in abbinamento ai convenzionali lieviti *Saccharomyces* può incrementare la **complessità aromatica e gustativa dei vini, valorizzare precursori varietali** di alcune cultivar aromatiche, **ridurre eventuali componenti indesiderati**.

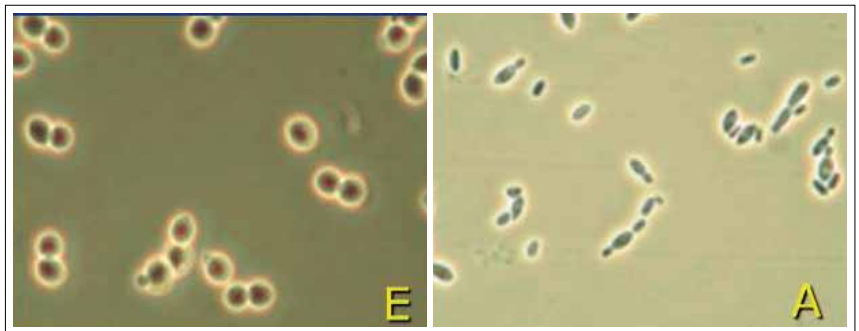
La selezione di nuovi lieviti inizia nel vigneto prelevando grappoli di uva o porzioni di tralcio che vengono trasferiti in laboratorio e sottoposti ad una fase di fermentazione al termine della quale i lieviti vengono isolati in opportuni mezzi di coltura. L'impiego di particolari terreni di coltura disponibili in commercio (WL agar e agar lisina) permette già un primo riconoscimento delle specie presenti.

*Figura 10.*  
*Supporto (Piastra Petri con*  
*mezzo culturale WL) per lo*  
*sviluppo di lieviti.*  
*Si possono osservare colonie*  
*bianche (lieviti enologici*  
*del genere Saccharomyces)*  
*e colonie verdi (lieviti non-*  
*Saccharomyces)*



Il terreno WL consente la crescita delle principali specie di lieviti che si sviluppano durante la fermentazione e, dal momento che lieviti di specie diverse assumono colorazioni e/o morfologie diverse (Figura 10), è già possibile in questa fase discriminare i lieviti *Saccharomyces* dai lieviti *non-Saccharomyces* (Figura 11).

*Figura 11.*  
*Immagini al microscopio*  
*ottico di (E) lieviti*  
*ellittici (Saccharomyces)*  
*e (A) lieviti apiculati*  
*(non-Saccharomyces,*  
*Hanseniaspora)*

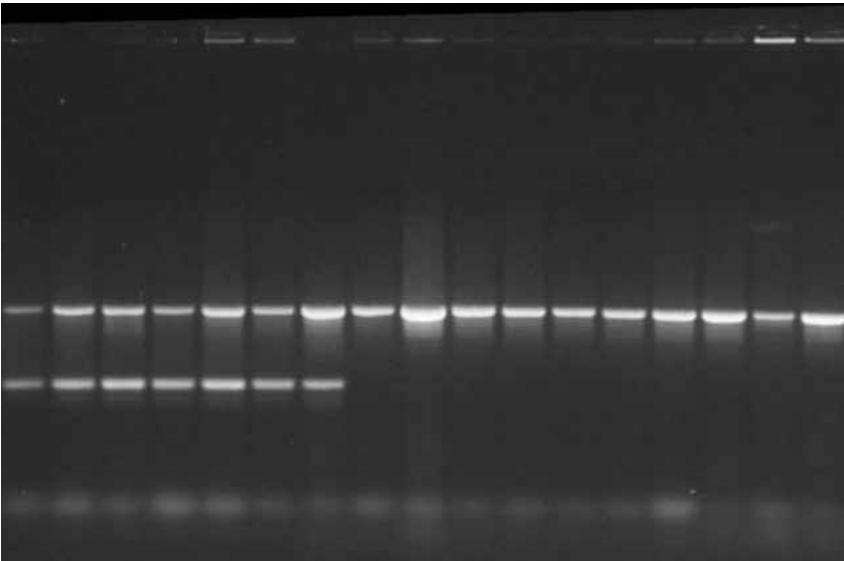


Prima di procedere alla loro caratterizzazione tecnologica, i lieviti isolati dai grappoli o dai tralci vengono sottoposti a rigorose procedure di identificazione che consentono di definire la specie di appartenenza e di individuare i diversi ceppi (=individui) presenti all'interno della specie.

A questo proposito sono disponibili diverse metodologie sia per l'**identificazione di specie** (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, etc.) che per l'**identificazione dei ceppi**. La disponibilità di **innovative metodologie molecolari** consente l'identificazione rapida ed attendibile dei ceppi isolati superando così la laboriosità e la lunghezza delle tradizionali procedure di identificazione che prevedevano lo studio di numerosi caratteri biochimici e fisiologici e che spesso non riuscivano ad arrivare ad una identificazione di specie sicura.

La stessa O.I.V. ha pubblicato nel 2011 una risoluzione (Risoluzione OIV-Oeno 408-2011) che descrive gli strumenti molecolari per l'identificazione di lieviti di interesse enologico.

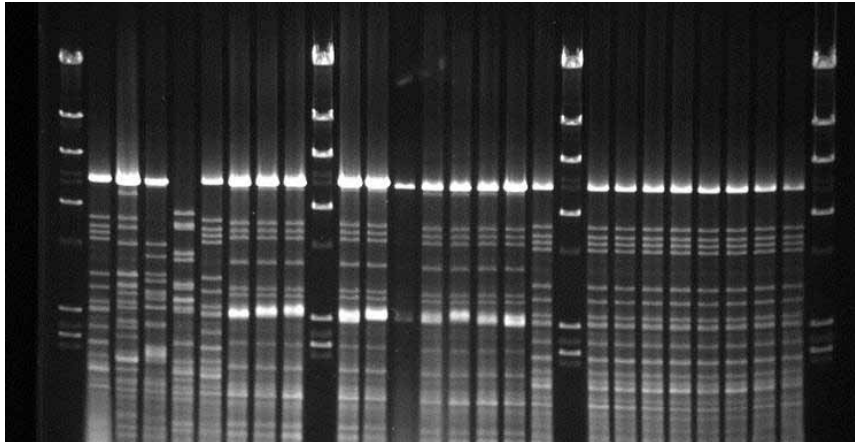
Tra i metodi applicabili per l'identificazione a livello di genere o specie vanno citati diversi **saggi di PCR** (Reazione a Catena della Polimerasi) **specifici**; a titolo di esempio si cita il metodo sviluppato dal gruppo di ricerca del Dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova che consente di riconoscere le specie di lieviti presenti nell'ambito del gruppo del *Saccharomyces sensu stricto* (Nardi T., Carlot M., De Bortoli E., Corich V., Giacomini A., 2006. *FEMS Microbiology Letters* 264: 168–173, *Figura 12*).



*Figura 12.*  
Gel elettroforesi per l'identificazione di *Saccharomyces enologici* (linee con 2 bande di DNA) rispetto ai lieviti non-*Saccharomyces* (una sola banda)

Per l'identificazione a livello di specie si può ricorrere anche alla metodologia **RAPD-PCR** (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR). Questa metodologia prevede l'amplificazione del DNA genomico utilizzando un unico *primer* (frammento di DNA di piccole dimensioni) che si appaia casualmente al DNA del genoma del lievito ogni qualvolta trova una sequenza complementare. Il profilo di amplificazione che si ottiene è composto da più bande e rappresenta una sorta di impronta digitale (*fingerprint*) che caratterizza in modo specifico il ceppo (*Figura 13*).

Figura 13.  
Esempio di tecnica di elettroforesi per la identificazione di ceppi di lievito. Ogni linea rappresenta un fingerprint (=impronta digitale) di un diverso ceppo di lievito



La RAPD-PCR viene largamente impiegata nello studio dei microrganismi (lieviti e batteri) sia per caratterizzare i nuovi isolati che per definirne la specie di appartenenza. Dato che profili di amplificazione simili indicano la presenza di genomi simili, confrontando mediante appositi software i profili di amplificazione ottenuti per gli isolati oggetto di studio con quelli di ceppi tipo o di riferimento della specie, è infatti possibile giungere ad una loro precisa classificazione.

Solitamente, l'analisi RAPD-PCR viene eseguita utilizzando più *primer* casuali e combinando i diversi profili ottenuti. Una metodologia sicuramente interessante per la identificazione a livello di specie si basa sul sequenziamento di particolari regioni del DNA del genoma dei lieviti come ad esempio la **regione D1/D2 del gene rRNA 26S** (Risoluzione O.I.V.-Oeno 408-2011) o dell'Internal Transcribed Spacers (**regione ITS1 e ITS2**), compreso il **gene rRNA 5.8S**.

L'analisi della sequenza risultante, tramite il confronto con database di sequenze disponibili online, permette una precisa identificazione del microrganismo in esame. Tale metodologia risulta particolarmente utile nel caso di lieviti *non-Saccharomyces* per i quali non sono disponibili saggi di PCR specifica.

Nei programmi di selezione di lieviti ad uso enologico è fondamentale poter disporre anche di metodologie che consentano di individuare i diversi ceppi presenti all'interno di una data specie. Questo sia allo scopo di evitare di effettuare laboriose prove di caratterizzazione tecnologica su copie ripetute di uno stesso lievito isolate ad esempio da un medesimo campione di uva o di tralcio sia di verificare che il ceppo isolato non sia in realtà un ceppo noto, già disponibile in commercio.

Tra i metodi proposti per la identificazione a livello di ceppo vanno citati l'analisi dei **profili di restrizione del DNA mitocondriale**, l'amplificazione delle sequenze delta, la tipizzazione mediante **microsatelliti**.

L'analisi dei polimorfismi di restrizione del DNA mitocondriale sfrutta la grande variabilità del DNA dei mitocondri di *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. È disponibile un metodo semplificato che si basa sull'estrazione del DNA del lievito e sulla sua



successiva frammentazione con particolari enzimi. Questo metodo è tra i metodi più utilizzati per caratterizzare i lieviti enologici isolati in vigneto, in cantina o durante la fermentazione alcolica. Le “**sequenze delta**” così come i **microsatelliti** sono invece particolari sequenze presenti all’interno del genoma del lievito caratterizzate da elevato polimorfismo: l’analisi di queste sequenze permette un’efficace differenziazione dei ceppi di *S. cerevisiae*.

Per aumentare la capacità di discriminazione delle singole tecniche, è inoltre consuetudine nei laboratori in cui vengono effettuati studi di identificazione e caratterizzazione microbica, accoppiare più tecniche in modo da combinare ed integrare più informazioni.

### **Attività sperimentale e risultati**

*(a cura dell’Università di Padova)*

#### *Premessa*

Nell’ambito dello sviluppo sostenibile c’è un forte interesse ad introdurre tecniche di biocontrollo in agricoltura. Infatti è chiaro ormai che l’**utilizzo massiccio di prodotti chimici** abbia una forte influenza sul microbiota ambientale. In questo contesto si inserisce l’obiettivo del progetto biodilieviti, ovvero il **ripopolamento del vigneto con ceppi di lievito autoctoni** appartenenti alla specie enologica *Saccharomyces cerevisiae* e lo studio del loro impatto sulla biodiversità microbica e sulla qualità dei vini prodotti.

Un ripopolamento con ceppi autoctoni, scelti in base alle caratteristiche tecnologiche, non solo può contribuire al mantenimento della biodiversità ambientale, ma permette produzioni enologiche a partire da vinificazioni spontanee e alla riduzione o eliminazione dell’uso dei solfiti in cantina. Il progetto prevede l’impiego di lieviti (selezionati in precedenti programmi di ricerca) isolati nella medesima area vitivinicola in cui si trovano i vigneti utilizzati per il ripopolamento.

Di concerto con il Consorzio di Tutela la prima fase dei lavori ha riguardato:

- coordinamento del gruppo di ricerca in funzione delle necessità scientifiche e della tipologia di corpi aziendali presso i quali effettuare le indagini e la raccolta del materiale biologico idoneo alla ricerca;
- supporto in fase di sopralluogo attraverso un’opera di sensibilizzazione aziendale al fine di segnalare il metodo di lavoro adottato dal pool di ricerca;
- effettuazione dei primi comunicati stampa sull’argomento ed interazione con il territorio al fine di dare una *sounding* nell’area collinare sulle potenzialità e gli obiettivi che la ricerca si propone.

La scelta dei siti per lo studio è quindi caduta su due vigneti nell’area di produzione del Prosecco di Conegliano-Valdobbiadene DOCG, uno gestito con **tecniche agronomiche convenzionali** e uno con **tecniche biologiche**. Per ciascuno dei due siti è stato individuato un filare (30 piante) da trattare coi lieviti ed uno da usare come controllo non trattato.

Si è proceduto quindi alla valutazione della biodiversità autoctona dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* presenti nei due vigneti mediante **campionamento di grappoli e tralci** sui filari individuati (*Figura 14*).

*Figura 14.*  
*Campionamento di lieviti*  
*in vigneto da tralcio (sopra)*  
*e da grappolo (sotto)*



I grappoli raccolti in vigneto sono stati trasferiti in laboratorio dove sono stati schiacciati manualmente ed aggiunto ad ogni campione glucosio/fruttosio e anidride solforosa per favorire lo sviluppo di lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*, i quali sono più resistenti alla  $SO_2$  rispetto agli altri lieviti (apiculati) che, molto più presenti in vigneto, generalmente dominano la prima fase delle fermentazioni spontanee. I frammenti di corteccia asportati dai tralci sono stati invece immersi in mosto sintetico addizionato con anidride solforosa. I campioni così allestiti sono stati lasciati fermentare spontaneamente (*Figura 15*). Sulla base del calo in peso è stato determinato il grado alcolico e sono stati poi raccolti e caratterizzati 10 lieviti per ogni campione tra quelli fenotipicamente riferibili al genere *Saccharomyces*.

*Figura 15.*  
*Fermentazioni in*  
*laboratorio di singoli*  
*grappoli (sinistra) e di*  
*frammenti di tralci (destra)*



L'identificazione tra gli isolati raccolti dei lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* è stata effettuata mediante **analisi genetica** (multiplex PCR). Il metodo prevede la possibilità di discriminare rapidamente questo gruppo di lieviti rispetto agli altri presenti in ambiente enologico in un unico passaggio.

Dall'analisi genetica 89 isolati sono risultati appartenenti al genere *Saccharomyces*, tutti provenienti dal vigneto convenzionale (37 dai grappoli e 52 dai tralci). L'analisi del DNA mitocondriale ha indicato la presenza di 9 diversi profili genetici, corrispondenti a 9 ceppi (=individui) diversi.

Prima di procedere con l'introduzione dei lieviti autoctoni è stata fatta una quantificazione di lieviti e batteri totali su alcuni campioni di tralcio provenienti dai due vigneti, che ha dato i risultati riportati in *figura 16*.

Vigneto	Campione	Lieviti (cell/g)	Batteri (cell/g)
Biologico	11LB	6,8x10 <sup>6</sup>	5,7x10 <sup>8</sup>
	31LB	9,2x10 <sup>6</sup>	5,0x10 <sup>8</sup>
	20NB	1,2x10 <sup>7</sup>	4,4x10 <sup>8</sup>
Convenzionale	10LC	1,4x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>
	30LC	9,1x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>7</sup>
	21NC	5,4x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>

Figura 16.  
Tabella che riporta i valori di lieviti e batteri presenti sui tralci nei vigneti prima dell'intervento di inoculo (cellule/g tralcio, peso secco)

Si è quindi proceduto alla **sceita dei ceppi di lievito** da introdurre in vigneto, scegliendoli all'interno della vasta collezione di ceppi autoctoni provenienti dalla zona della DOCG in possesso del gruppo di ricerca. Si è deciso di utilizzare un pool di 5 ceppi, tra quelli dotati di migliori caratteristiche enologiche, i cui tratti salienti sono riportati in *figura 17*.

Ceppo	Resistenza a SO <sub>2</sub> (mg/l)	Resistenza a CuSO <sub>4</sub> (µM)	Resistenza a etanolo (%vol)	Vigore fermentativo (g/100ml)	Durata fermentazione (giorni)	Potere schiumogeno (mm)	Produzione di H <sub>2</sub> S	Carattere killer
P283.4	100	200	13	1,4	15	10	medio-bassa	K
P234.15	<50	400	14	1,4	16	>18	bassa	R
P301.4	50	400	15	1,6	15	14	medio-bassa	S
P138.4	100	400	15	1,7	15	7	medio-bassa	R
P173.4	100	200	14	1,4	16	7	medio-bassa	K

Figura 17.  
Tabella delle caratteristiche dei 5 ceppi di *S. cerevisiae* introdotti in vigneto.  
Resistenza SO<sub>2</sub>: sviluppo in mosto sintetico con 0, 50, 100, 200 mg/l SO<sub>2</sub>.  
Resistenza CuSO<sub>4</sub>: sviluppo in YNB con 0, 50, 100, 200, 400, 800 µM CuSO<sub>4</sub>.  
Resistenza all'etanolo: crescita in piastre di YPD con 13, 14, 15, 16 e 17% di etanolo.  
Potere schiumogeno: altezza della schiuma nelle beute di fermentazione. Carattere killer: K, ceppi produttori di tossina killer; S, ceppi sensibili alla tossina; R, ceppi resistenti alla tossina killer.

In primavera è stato eseguito l'inoculo in vigneto, mediante **spruzzo con atomizzatore manuale**, irrorando i tralci ad una distanza di 20-30 cm.



Figura 18.  
Distribuzione dei lieviti in vigneto mediante atomizzatore manuale

La sospensione cellulare contenente i 5 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* autoctoni è stata dosata in modo da distribuire circa due milioni (2x10<sup>6</sup>) cellule di lievito per metro lineare di filare, omogeneamente distribuite su entrambi i lati delle piante. Nei filari di controllo è stata distribuita la stessa quantità di miscela, priva però dei lieviti. La distribuzione è avvenuta nel mese di marzo, prima del germogliamento delle viti. La presenza dei ceppi introdotti è stata monitorata 10 giorni dopo lo spruzzo, mediante conta in piastra e analisi molecolare. La *figura 19* riporta i dati della popolazione di lieviti presente in campioni di tralcio.

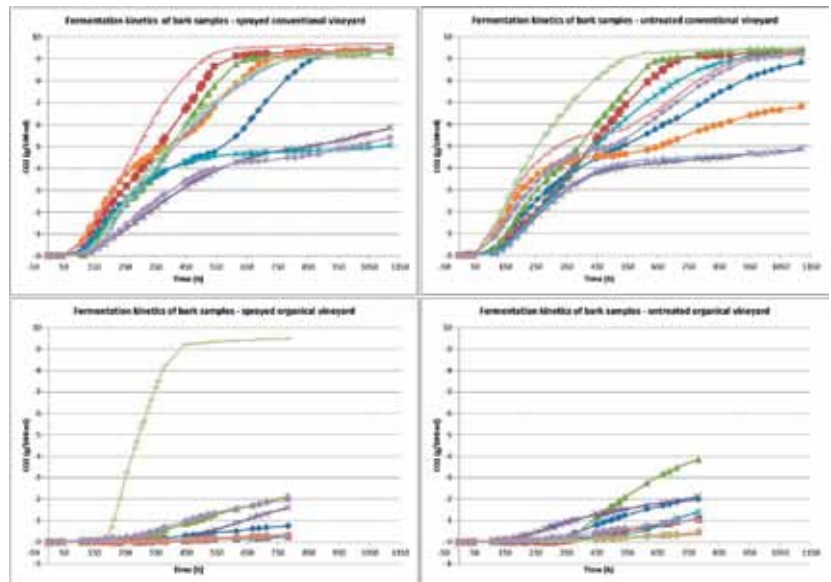
Figura 19.  
Tabella che riporta il numero di lieviti e batteri presenti sui tralci nei vigneti (cellule/g tralcio, peso secco)

Vigneto	Campione	Lieviti (cell/g)
Biologico	LB11	8,84x10 <sup>8</sup>
	LB21	1,82x10 <sup>8</sup>
	LB31	8,88x10 <sup>8</sup>
Convenzionale	LC10	2,19x10 <sup>5</sup>
	LC20	4,40x10 <sup>5</sup>
	LC30	5,24x10 <sup>5</sup>

Va precisato che nei giorni successivi l'inoculo si è verificato un brusco abbassamento delle temperature (si è avuta anche una nevicata) oltre a iniziare proprio in quei giorni un periodo piovoso anomalo che si è protratto molto a lungo. Questo ha indubbiamente influito in modo negativo sull'insediamento dei lieviti sulle piante.

Due mesi dopo la distribuzione dei lieviti sono stati raccolti 10 campioni di tralcio dal filare trattato e da quello di controllo e sono stati posti a fermentare in mosto sintetico (Figura 20).

Figura 20.  
Andamento delle fermentazioni dei ceppi prelevati dai tralci nei vigneti convenzionale trattato (in alto a sinistra), convenzionale non trattato (in alto a destra), biologico trattato (in basso a sinistra) e biologico non trattato (in basso a destra). Ogni curva rappresenta l'andamento della fermentazione di un singolo ceppo di lievito. Le migliori cinetiche sono quelle descritte dalle curve più ripide, ad indicare una rapida evoluzione di CO<sub>2</sub>, corrispondente ad una rapida fermentazione alcolica degli zuccheri.



Per quanto riguarda il vigneto convenzionale le cinetiche di fermentazione di 7 campioni provenienti dal filare trattato e di 7 campioni raccolti in quello di riferimento mostravano una produzione di etanolo superiore a 10° evidenziando quindi la presenza di ceppi di *S. cerevisiae*.

Un solo campione proveniente dal filare trattato del vigneto biologico mostrava attività fermentativa mentre nessun campione raccolto dal filare di controllo è stato in grado di fermentare il mosto. Va precisato che il vigneto biologico era molto

giovane e appena entrato in produzione; la popolazione naturale di lieviti non aveva ragionevolmente ancora avuto tempo sufficiente per insediarsi stabilmente. A settembre, prima della vendemmia, è stato eseguito un ulteriore campionamento di tralci e sono stati posti a fermentare in mosto sintetico (un substrato liquido la cui composizione ricalca quella del mosto d'uva). Per quanto riguarda il vigneto convenzionale le cinetiche di fermentazione di 8 campioni provenienti dal filare inoculato con i lieviti e di 8 campioni raccolti in quello di riferimento non trattato hanno raggiunto una produzione di etanolo superiore al 10°, indicando la presenza di ceppi di *S. cerevisiae*.

Parallelamente, invece, un solo campione del vigneto biologico, proveniente dal filare trattato, ha mostrato una performance fermentativa attribuibile a *S. cerevisiae*.

In vendemmia è poi stata eseguita la raccolta dell'uva manualmente e sono state eseguite due microvinificazioni da 50 litri ciascuna per ognuno dei filari considerati nella sperimentazione, per un totale di 8. In tutte le prove sono stati sviluppati dai 9 ai 9,3 gradi alcolici, ma i due vini prodotti con le uve del filare non trattato del vigneto convenzionale hanno lasciato un residuo zuccherino di 26 e 32 g/l.

Dai mosti in fermentazione sono stati isolati i lieviti al fine di permettere, mediante analisi genetica, di rilevare la presenza dei ceppi inoculati e la numerosità e biodiversità dei ceppi naturalmente presenti in vigneto che abbiano preso parte alla fermentazione delle microvinificazioni. Il profilo genetico di ciascun lievito isolato è stato confrontato anche con un archivio dei genomi dei lieviti commerciali usati nella zona oggetto della sperimentazione, per individuare la presenza di tali ceppi in vinificazione.

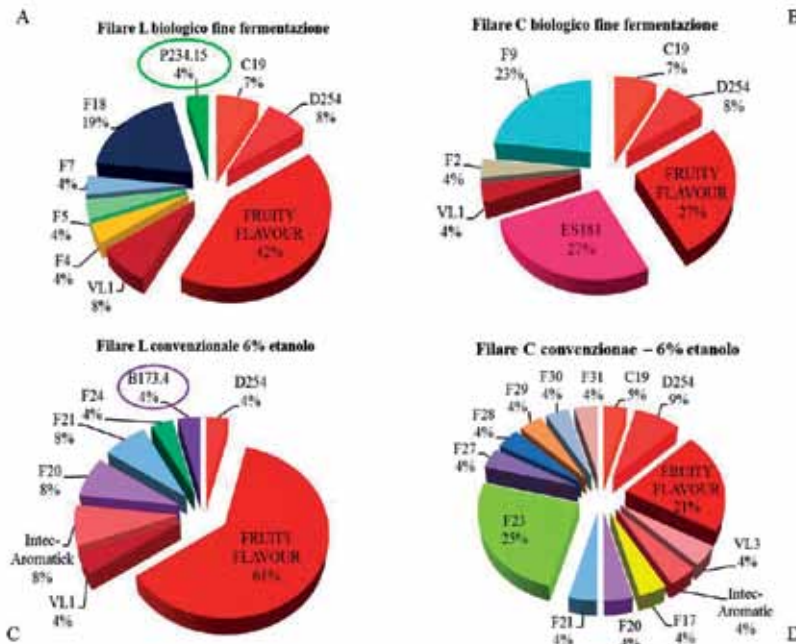


Figura 21. Ceppi isolati dalla vinificazione delle uve in microvinificazioni. A: Vigneto biologico inoculato; B: vigneto biologico non trattato; C: vigneto convenzionale trattato; D: vigneto tradizionale non trattato (controllo)

La *figura 21* riporta la frequenza con cui i diversi ceppi sono stati recuperati dall'analisi degli isolati. Nel vigneto biologico inoculato (A) a fine fermentazione sono stati isolati quattro ceppi commerciali (indicati con colori nella sfumatura del rosso). Questi ceppi commerciali erano stati utilizzati come starter per le fermentazioni dalla cantina sperimentale nella quale sono state condotte le vinificazioni e per tanto si tratta di una contaminazione. A fine fermentazione è stato isolato uno dei cinque ceppi introdotti, il P234.15.

Nella vinificazione di controllo (B) la variabilità genetica risulta più ridotta. I ceppi commerciali rappresentano il 73% della popolazione di lievito del mosto. L'analisi genetica degli isolati provenienti dalla vinificazione delle uve raccolte dal filare trattato del vigneto convenzionale (C) ha rivelato la presenza di otto ceppi diversi. Pur avendo cercato di mantenere condizioni di pulizia adeguate non è stato possibile evitare la contaminazione di cantina, che corrisponde a una percentuale di circa il 70%. Nel campionamento è stato isolato il ceppo inoculato B173.4, ritrovato anche in vigneto durante i campionamenti effettuati a due e sei mesi dopo il trattamento.

Nella vinificazione delle uve raccolte dal filare di controllo la variabilità genetica è più alta. Accanto ai ceppi commerciali, presenti rispettivamente nelle percentuali del 43% e 39%, sono stati isolati 9 e 7 ceppi autoctoni per ciascun punto di campionamento.

Durante la stagione vegetativa si è andati comunque a monitorare la presenza dei ceppi inoculati sulle superfici delle piante.

L'analisi genetica dei lieviti raccolti due mesi dopo lo spruzzo ha permesso di rilevare la presenza di due ceppi inoculati: P173.4 nel filare trattato del vigneto convenzionale e P301.4 in quello del vigneto biologico. Nel vigneto convenzionale sono stati isolati altri 5 ceppi nel filare trattato e 4 nel filare di controllo. I ceppi DV10 e Intec - Aromatic k sono ceppi commerciali usati negli anni passati dalle cantine dell'areale, i ceppi Y1.1 e Y3.1 erano già stati individuati nel campionamento eseguito prima dello spruzzo mentre si sono riscontrati 4 nuovi profili genetici (T1, T2, T3 e T10).

Dopo sei mesi dallo spruzzo si è rilevata la presenza del ceppo inoculato P173.4 in due campioni di tralcio raccolti dal filare trattato del vigneto convenzionale. Dallo stesso filare sono stati isolati nuovamente il ceppo commerciale DV10 e i ceppi C6.1 e Y3.1 i cui profili genetici erano già stati visti tra gli isolati dal vigneto prima del trattamento. Sono stati inoltre identificati 5 nuovi ceppi. Per quanto riguarda il filare di controllo l'analisi degli isolati ha portato all'identificazione del ceppo Y3.1 in 4 campioni, mentre nei rimanenti la fermentazione era stata condotta da quattro ceppi non isolati in precedenza. Nell'unico campione di tralcio fermentante proveniente dal vigneto biologico è stato isolato uno dei 5 ceppi inoculati, il P301.4.

Un anno dopo lo spruzzo non sono stati ritrovati nei filari trattati i ceppi inoculati. Nei campioni di tralcio raccolti dai filari del vigneto biologico si è rilevata l'assenza di lieviti in grado di fermentare il mosto. Nei filari del vigneto convenzionale si è

notata la presenza di ceppi già isolati dai precedenti campionamenti e che quindi possono essere considerati ceppi residenti stabilmente in quell'ambiente.

Vista la bassa percentuale con cui sono stati ritrovati i ceppi inoculati in vigneto e la loro breve persistenza, si è deciso di ripetere l'inoculo nella primavera 2014 su nuovi filari degli stessi vigneti, usando questa volta una concentrazione di lieviti per metro lineare di vigneto 100 volte superiore a quella dell'anno precedente. Va detto subito che questo incremento di lieviti utilizzati comporta un incremento di costo molto modesto e quindi economicamente assolutamente sostenibile.

Per valutare la biodiversità presente prima dell'inoculo nei filari scelti per il secondo trattamento sono stati raccolti 10 campioni di tralcio e sono stati posti a fermentare in mosto sintetico. Nei campioni di tralcio raccolti dai filari del vigneto biologico si è rilevata assenza di lieviti in grado di fermentare il mosto. Nel vigneto convenzionale, dai quattro campioni di tralcio che mostravano una dinamica fermentativa riconducibile a ceppi di *S. cerevisiae* sono stati isolati due nuovi ceppi autoctoni ed il ceppo Y3.1, già ritrovato nel vigneto l'anno precedente.

In primavera è stato eseguito l'inoculo, mediante spuzzo con atomizzatore manuale, irrorando i tralci in corrispondenza della fase fenologica del germogliamento il 17 di aprile. La sospensione cellulare contenente i 5 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* autoctoni (gli stessi dell'anno precedente) è stata dosata in modo da distribuire circa 200 milioni ( $2 \times 10^8$ ) di cellule per metro lineare di filare, omogeneamente suddiviso su entrambi i lati. Nei filari di controllo è stata distribuita la stessa miscela, priva però dei lieviti.

Due e quattro mesi dopo la distribuzione dei lieviti sono stati raccolti 10 campioni di tralcio dal filare trattato, 10 da quello di controllo e 10 dal filare trattato l'anno precedente. I campioni sono stati posti a fermentare in mosto sintetico. Dai campioni aventi cinetiche di fermentazione che mostravano una produzione di etanolo superiore a  $10^\circ$ , evidenziando quindi la presenza di ceppi di *S. cerevisiae*, sono state isolate 10 colonie e sottoposte a caratterizzazione molecolare. Nessun campione raccolto dal vigneto biologico è stato in grado di fermentare il mosto.

Per quanto riguarda invece il vigneto convenzionale, dopo 2 mesi per il filare di controllo non inoculato ha fermentato 1 campione su 10 da cui si è isolato un ceppo di lievito autoctono; nel filare trattato 4 su 10 hanno fermentato rilevando tutti la presenza di uno stesso ceppo autoctono; nel filare inoculato l'anno precedente 5 campioni hanno fermentato rilevando un ceppo autoctono e un ceppo commerciale negli altri 4.

Lo stesso campionamento ripetuto a 4 mesi dall'inoculo ha dato i seguenti risultati: filare non trattato: 3 campioni fermentati su 10 (due con un ceppo commerciale e uno con un ceppo autoctono già rilevato); filare trattato: 1 campione fermentato su 10 (da un lievito commerciale); filare trattato l'anno precedente: 1 campione fermentato su 10 (da un lievito commerciale).

Nonostante la maggior concentrazione dell'inoculo spruzzato, nessun ceppo introdotto è stato isolato dai campioni di tralcio fermentanti. Dopo due mesi dallo spruzzo, nel filare scelto per il secondo trattamento è stato isolato lo stesso ceppo autoctono T18 in tutti e quattro i campioni fermentanti. Nel filare di controllo è stato isolato un ceppo non trovato in precedenza, mentre nel filare

trattato l'anno prima è stato isolato un nuovo ceppo ed in quattro campioni è stato ritrovato il ceppo Y3.1, frequentemente isolato in questo vigneto nei precedenti campionamenti.

Nel campionamento eseguito dopo quattro mesi dal secondo inoculo è stata registrata una bassa presenza di campioni fermentanti in tutti e tre i filari. L'analisi dei profili genetici dei ceppi isolati ha portato a riconoscere tre ceppi già isolati nei precedenti campionamenti.

A settembre è stata fatta la raccolta manuale dell'uva e sono state allestite otto microvinificazioni, due per ognuno dei filari allo studio.

Le microvinificazioni di quest'anno, con lo scopo di limitare il più possibile la contaminazione ambientale a livello di cantina, sono state allestite presso la sede del Consorzio del Prosecco di Conegliano-Valdobbiadene DOCG e le operazioni di pigiatura e travaso sono state condotte manualmente, senza l'ausilio di strumentazione proveniente da cantina.

Va evidenziato che l'annata **2014** si è caratterizzata per **l'abbondante piovosità, scarsa insolazione e temperature medie inferiori alla norma**, che hanno fortemente ostacolato l'ottimale maturazione delle uve. I vini prodotti con le uve del vigneto convenzionale hanno raggiunto i 9 gradi alcolici mentre nei vini prodotti con le uve provenienti dal vigneto biologico sono stati sviluppati solo 8 gradi alcolici a causa del minor contenuto di zuccheri del mosto di partenza. In tutte le prove il residuo zuccherino è stato inferiore ai 5 g/l.

Sono stati eseguiti degli isolamenti dai campioni dei mosti in fermentazione che sono stati sottoposti ad analisi genomica per rilevare la presenza dei ceppi inoculati. Essendosi però il progetto concluso alla fine di ottobre, non è stato evidentemente possibile incorporare i dati finali nel presente documento. Tali risultati verranno illustrati durante il convegno conclusivo.



*Considerazioni conclusive*

Nonostante la mancanza dei dati conclusivi, è comunque possibile trarre delle indicazioni preliminari in base alle attività condotte nell'ambito del progetto BIODILIEVITI e ai risultati ottenuti.

- I vigneti dell'area Conegliano-Valdobbiadene Prosecco Superiore DOCG sono generalmente poveri di lieviti autoctoni naturali. Questo fatto è confermato all'interno del progetto dalla quasi assenza di lieviti nel vigneto biologico, che aveva solo tre anni di "vita" e che non era stato praticamente ancora colonizzato dai lieviti "ambientali".
- È presente un forte inquinamento di lieviti commerciali, legato al loro ampio utilizzo nelle cantine della zona.
- Non è facile riuscire ad insediare un numero importante (tecnologicamente efficace) di lieviti sulle viti in campo.
- L'andamento delle due stagioni utilizzate per la sperimentazione, che è stato anomalo, per motivi diversi, per entrambe le annate, può avere influito negativamente sulla capacità di colonizzazione e persistenza dei lieviti.
- Le prove di inoculo hanno probabilmente bisogno di essere valutate ulteriormente per quanto riguarda le modalità e le tempistiche.
- Vale la pena comunque di sottolineare che, tenuto conto di quanto esposto sopra (scarsa presenza di lieviti autoctoni e inquinamento da lieviti commerciali), un intervento di disseminazione (o "ripopolamento") di lieviti buoni fermentatori, provenienti dai vigneti della DOCG, non può che avere un effetto positivo sul ristabilimento di una situazione microbiologica più vicina a quella che era presente negli stessi vigneti in tempi passati.
- In prospettiva, questo tipo di approccio potrebbe essere testato anche per immettere in vigneto, insieme ai lieviti, anche dei microrganismi efficaci per il biocontrollo dei parassiti e patogeni delle viti.



Partner:



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**DAFNAE**  
Dipartimento di Agricoltura, Animali  
e Ambienti | Ricerca Culturale e Ambiente

**TESAF**



PROSECCO SUPERIORE  
DAL 1876

**VENETO**  
AGRICOLTURA   
Azienda Regionale per i settori Agricolo, Forestale e Agro-Alimentare

In collaborazione con:



CONSORZIO DI TUTELA DEL VINO  
CONEGLIANO VALDOBBIADENE  
PROSECCO SUPERIORE DOCG

[info@prosecco.it](mailto:info@prosecco.it) [www.prosecco.it](http://www.prosecco.it)

*Editing e coordinamento editoriale:*

PROGETTO VERDE S.R.L. - Piazza De Gasperi, 32 - 35131 Padova  
Tel. 049 8756866 - Fax. 049 8766252  
[pv@progettoverde.info](mailto:pv@progettoverde.info) - [www.progettoverde.info](http://www.progettoverde.info)

*Design:* Caseley Giovara





PROSECCO SUPERIORE  
DAL 1876

[www.prosecco.it](http://www.prosecco.it)