

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**

***Tesi di Dottorato di ricerca in  
Scienze e Tecnologie delle produzioni Agro-alimentari  
XX ciclo***

***STUDIO PROTEOMICO DI VARIETÀ DI UVA ROSSA TIPICHE DELLA CAMPANIA IN  
CONFRONTO CON LA VARIETÀ "ISABELLA" (V. LABRUSCA)***

**Relatore**

**Prof. Marcello Forlani**

**Dottoranda**

**Dott. ssa Alessandra De Martino**

**Coordinatore**

**Prof. Salvatore Spagna Musso**

# INDICE

# INDICE

<b>1. PREMESSA</b>	<b>2</b>
1.1. La poesia della vendemmia in Campania: storie di uomini e di vino	2
1.2 La tradizione enologica della Campania	5
1.3 Caratteri morfobiologici di <i>V.vinifera</i>	7
1.4 Esigenze pedoclimatiche del genere <i>Vitis</i>	10
1.5 Panoramica sulla viticoltura mondiale	12
1.6 La viticoltura in Italia	17
<b>2. INTRODUZIONE</b>	<b>22</b>
2.1 La sistematica del genere <i>Vitis</i>	22
2.2 Cenni storici sull'origine della vite. La comparsa della Filossera ed introduzione della vite americana in Europa	25
2.3 Era post-filossera: panoramica sulle problematiche relative alla vinificazione ed alla qualità del prodotto finito	29
2.4 Salvaguardia del prodotto di qualità: una panoramica sulle normative italiane ed europee in campo vitivinicolo	31
2.5 Identificazione e differenziazione dei vitigni nostrani: uno sguardo generale sulle strumentazioni classiche fino ad oggi utilizzate	36
2.6 La proteomica: una panoramica alla tecnica	38
2.7 Applicazione delle tecniche elettroforetiche e proteomiche nello studio delle proteine dell'uva	46
<b>3. OBIETTIVO DEL LAVORO</b>	<b>50</b>

## **4. MATERIALI E METODI** \_\_\_\_\_ **52**

4.1 Materiale vegetale \_\_\_\_\_ 52

4.2 Materiali chimici \_\_\_\_\_ 53

4.3 Estrazione proteica dalla bacca \_\_\_\_\_ 53

4.4 Concentrazione proteica \_\_\_\_\_ 56

4.5 Preparazione dei campioni per le analisi elettroforetiche \_\_\_\_\_ 56

4.6 Focalizzazione isoelettrica su strato ultrasottile di poliacrilammide (IEF) \_\_\_\_\_ 61

4.7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE) \_\_\_\_\_ 62

4.8 Elettroforesi bidimensionale (IPG-IEF/SDS-PAGE) \_\_\_\_\_ 62

4.9 Riduzione ed alchilazione delle proteine estratte dal gel \_\_\_\_\_ 64

5.0 Digestione Enzimatica \_\_\_\_\_ 65

5.1a Analisi in spettrometria di massa \_\_\_\_\_ 66

5.1a.1 MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry) \_\_\_\_\_ 66

5.1a.2 FT-ICR MS

(Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry) \_\_\_\_\_ 66

5.1a.3 MALDI-Q STAR MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Quadrupole-time of flight mass spectrometry) \_\_\_\_\_ 68

5.1a.4 LC/ESI-MS (Reversed-phase capillary chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry) \_\_\_\_\_ 69

## **5. RISULTATI** \_\_\_\_\_ **72**

5.1 Scelta, raccolta, conservazione e manipolazione del materiale vegetale \_\_\_\_\_ 72

5.2 Concentrazione proteica degli estratti \_\_\_\_\_ 75

5.4 Analisi elettroforetica bidimensionale (2-DE) \_\_\_\_\_ 78

5.5 Analisi proteomica \_\_\_\_\_ 84

**6. DISCUSSIONE** \_\_\_\_\_ **92**

**7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE** \_\_\_\_\_ **102**

**BIBLIOGRAFIA** \_\_\_\_\_ **121**

**FIGURE** \_\_\_\_\_ **(vedi file allegato)**

## **1. PREMESSA**

### **1.1 La poesia della vendemmia in Campania: storie di uomini e di vino**

Un rito antichissimo, ancestrale, cui sono legate generazioni di agricoltori, appassionati ed intenditori, uniti nel celebrare la moderna festa pagana in onore del dio Bacco, in cui la tradizione degli avi si fonde amabilmente con le nuove tecniche e le più aggiornate teorie enologiche: questo è il rito della vendemmia. Svoltata in quel periodo dell'anno in cui le giornate iniziano ad accorciarsi e le prime copiose piogge sanciscono la fine dell'estate, essa vede la sveglia del vignaiolo e degli altri operatori molto presto: ai primi raggi del sole, infatti, si raggiunge la vigna e si comincia il lavoro.

La cerimonia della raccolta e del trasporto di uve e grappoli conserva in sé i caratteri del romanzo e della narrazione epica. Del romanzo sono protagonisti coloro che, con la vendemmia, sperano nella buona annata e che i propri sforzi – quel lungo e duro lavoro di potatura e di continua e premurosa cura della vite- non siano vanificati.

Ma la storia del vino in Campania si colora anche di mito e ci riporta indietro, alle antiche rotte lungo il Mediterraneo, ai leggendari avventurieri di Calcide ed Eubea che nel lontano VIII secolo avanti Cristo scelsero le coste della Campania per stabilirsi e iniziare la coltivazione della vite. La vendemmia del III millennio, in Campania, è un evento che non dimentica questi echi storici e poetici, ma li fonde con un moderno ed efficiente know-how, con procedure innovative, coraggiose e

all'avanguardia. Tutto ciò sempre e costantemente all'insegna del rigore e dei sapienti insegnamenti dei propri avi.

Sono forse proprio questi saperi, questi antichi insegnamenti, la componente più attraente e suggestiva della vendemmia, quel patrimonio di conoscenze dettato dagli studi scientifici e impreziosito dall'antica esperienza e dai segreti che solo chi vive quotidianamente il contatto con la terra sa apprendere e mettere a frutto. Le ritualità della vendemmia sono proprio un condensato di queste attitudini, è un'opera di difficile, ma sempre riuscito, bilanciamento tra le nuove tendenze e l'antica maestranza. Una sorta di evoluzione ineluttabile, scandita anche nelle tradizionali espressioni lessicali, che dal suono più autenticamente dialettale mutano oggi, fino ad italianizzarsi quasi completamente.

La giornata più importante per i viticoltori è un vero proprio inno alle percezioni sensoriali. Il profumo dei grappoli appena raccolti inebria ed ubriaca, il sapore degli acini maturi al punto giusto addolciscono il palato, le canzoni, le cantilene e le filastrocche del mondo contadino rimandano all'aspetto giocoso e festoso della vendemmia. Il dorato dei chicchi di falanghina e biancolella, e rossi decisi come barbera e piedirosso incantano e sorprendono. Le molteplici varietà cromatiche avvinghiate a viti, che ora si sviluppano in verticale ora sono tenute ad altezza d'uomo, si esaltano in un mosaico che ogni anno regala emozioni differenti e sensazioni inaspettate.

Non mancano tuttavia le difficoltà durante i giorni di vendemmia, dovute alla caratteristica dei terreni sui quali viene raccolta l'uva. Spesso si tratta di

appezzamenti localizzati in aree remote, di non facile accesso e lontane dalle cantine, luogo in cui è finalizzato il processo di vinificazione. In tal caso si ricorre ad antiche pratiche e scorciatoie, come l'uso di monorotaie (come accade sull'isola d'Ischia) oppure di piccoli gozzi di legno per il trasporto dei tini. Anche questa è parte della poesia della vendemmia.

Finita la raccolta, i giorni successivi sono impegnati per pressare il mosto: i tradizionali torchi manuali, tanto amati dai più piccini, pronti a saltarvi dentro a piedi nudi e schiacciare a tempo di musica gli acini, sono stati via via sostituiti più moderni macchinari meccanici. Il risparmio del tempo, in campagna, è divenuto un imperativo. Ma la vendemmia conserva ancora oggi quella magia che ne fa una festa dove sacro e profano, fede e laicità si fondono nel più evocativo tra i culti bucolici.

## 1.2 La tradizione enologica della Campania

Per la sua storia e tradizione enologica, la Campania può essere da sempre considerata una delle culle dell'enologia mondiale. Da qui provenivano i vini più celebrati dell'epoca, famosi anche di là dalle Alpi e prediletti da imperatori e patrizi.

Pompei, rappresentava, infatti, uno dei porti vinicoli più importanti dell'età classica, un punto nodale del commercio enologico internazionale dove erano prodotti e, in seguito, esportati vini d'ogni tipo.

La viticoltura in Campania svolge, dunque, un ruolo di primaria importanza sia da un punto di vista storico che economico-sociale. Anche attualmente, benché vi sono altri comparti economicamente più forti, la coltivazione della vite continua ad avere un peso rilevante nell'economia agricola di buona parte del territorio regionale, potendo contare su una grande varietà di uve tipiche, tutte di assoluta qualità. [1-2]

Tra i vitigni a bacca bianca vanno citati **greco**, **falanghina**, **coda di volpe** e **biancolella**, mentre sul versante delle uve rosse prevalgono **piedirosso**, **sciascinoso** e **aglianico**.

Tali vitigni concorrono alla produzione dei vini riconosciuti con le denominazioni di origine tipici della nostra regione, dalle straordinarie qualità organolettiche.

Solo per citarne qualcuno ricordiamo:

- "**Lacryma Christi**" (prodotto nelle tipologie bianco, rosso e rosato), le cui uve, nel caso del rosso o rosato, appartengono al vitigno Piedirosso impiegato da solo o con lo Sciascinoso. Nei processi di vinificazione l'uva dei vitigni citati deve essere presente

con percentuali non inferiori all'80% e deve prevedere, inoltre, una presenza minima del Piediroso non inferiore al 50%. Può concorrere alla produzione anche il vitigno Aglianico (Max 20%). Il “**Lacryma Christi**” bianco è ottenuto da uve del vitigno Coda di Volpe, da solo, o con il Verdeca; presenti con percentuali non inferiori all'80%, prevedendo una presenza minima del vitigno Coda di Volpe comunque non inferiore al 35% del totale. Possono concorrere alla produzione del bianco le uve Falanghina e Greco (max 20%).

- “**Aglianico**” prodotto dal vitigno rosso omonimo (85% min.), presente o da solo o in uvaggio con Piediroso o Sangiovese;

- il “**Solopaca**” a base di Falanghina, Coda di Volpe, e Malvasia di Candia, Rosso e Rosato (a base di Sangiovese e di Aglianico), Falanghina (quasi del tutto simili a quelli del Taburno).

La vite (*Vitis vinifera* L.) ha trovato, dunque, in Campania condizioni ecologiche diversificate tali da differenziare un ricco e eterogeneo patrimonio ampelografico. Studi condotti sulla caratterizzazione dei vitigni campani, sulla scorta dei soli tratti morfologici, hanno evidenziato la grande eterogeneità del patrimonio viticolo Campano. Lo scopo di tali studi è appunto la tutela e la valorizzazione del germoplasma viticolo autoctono, in particolare l'individuazione, la descrizione e la caratterizzazione dei vitigni minori, quelli cioè relegati negli orti familiari per un'esclusiva viticoltura di tipo amatoriale [3]. Anche il nostro lavoro, come vedremo nelle sezioni successive, ha come punto di partenza, il voler dare un contributo alla descrizione e la ottimizzazione dei vitigni nostrani nonché alla qualità del prodotto

finito, mediante la messa a punto di tecniche alternative a quelle comunemente utilizzate.

### **1.3 Caratteri morfobiologici di *V.vinifera***

Racchiudiamo in un unico paragrafo quelle che sono le principali caratteristiche morfobiologiche di *V.vinifera*.

Partendo dalle **radici**, se ne distinguono due diverse tipi a seconda che la pianta derivi da seme o da talea:

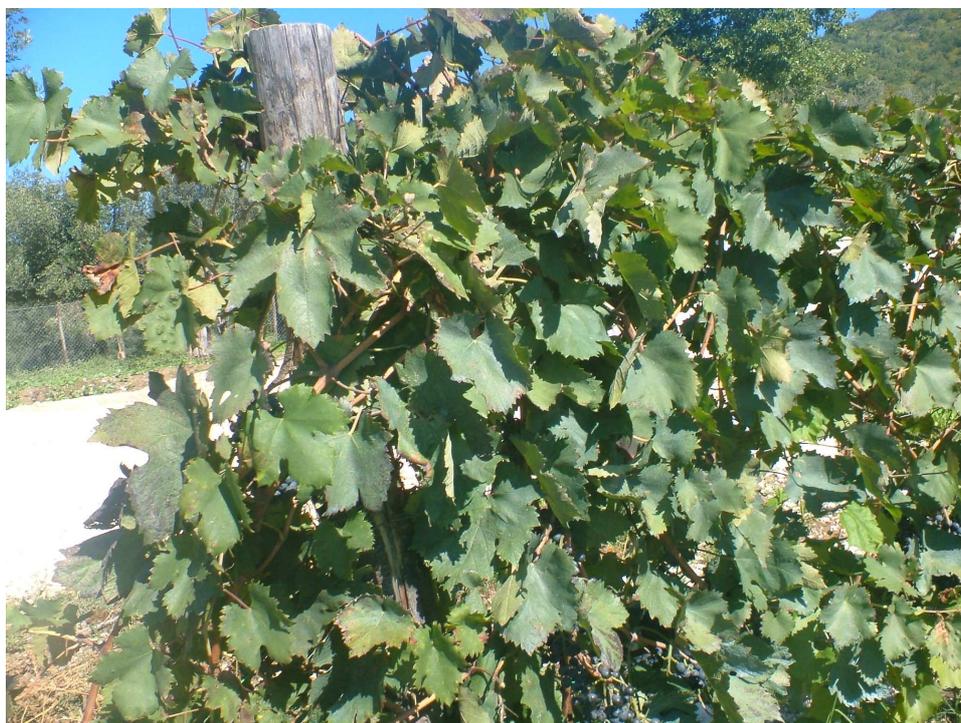
- radici fittonanti, cioè quelle originate dal seme e da cui derivano quelle di ordine inferiore e di minori dimensioni;
- radici avventizie, cioè quelle originatesi dalla talea, in genere vicino al nodo; sono di tipo fascicolato, di sviluppo omogeneo e da cui derivano quelle di ordine inferiore.

Il **fusto** o **ceppo** o tronco ha un aspetto contorto ed è avvolto dal ritidoma che si sfalda longitudinalmente. Il fusto è verticale ma può avere diversa inclinazione a seconda della forma di allevamento. Le ramificazioni sono chiamate germogli o pampini quando sono erbacee, tralci quando sono significate, sarmenti quando sono staccati dalla pianta dopo la potatura. Mentre esse sono chiamate cacchi se derivano da rami di un anno, polloni invece se derivano da legno vecchio. I tralci sono costituiti da nodi e internodi (o meristalli) in numero e lunghezza variabile.

**Le foglie** della vite sono semplici, distiche e alterne. Sono formate da un picciolo di diversa lunghezza e da una lamina palmato-lobata con cinque nervature primarie che

possono originare altrettanti lobi separati da insenature dette seni (foglie a forma intera, trilobata o pentalobata). Le foglie sono inoltre asimmetriche ed eterofille (cioè sullo stesso tralcio si hanno foglie di forma diversa). La foglia può essere ricoperta di peli.

Nella vite si trovano soltanto gemme che hanno origine dal meristema primario, e possono essere gemme pronte, ibernanti o normali e latenti.



**Fig. 1.1** – Foglie di vitigno di *Piedirosso*

**I cirri o viticci** sono organi di sostegno volubili; erbacei durante l'estate, lignificano con la fine del ciclo vegetativo. I fiori della vite non sono singoli, ma riuniti a formare un'infiorescenza, detta grappolo composto o, meglio, racemo composto o pannocchia, inserita sul tralcio in posizione opposta alla foglia.

**L'infiorescenza** è costituita da un asse principale (rachide) sul quale sono i racimoli, divisi in vari ordini, l'ultimo dei quali è detto pedicello e porta il fiore. Il numero dei

fiori per grappolo è molto variabile (fino a 100). I fiori sono ermafroditi, con calice con cinque sepali e corolla di cinque petali; cinque sono anche gli stami; l'ovario è bicarpellare e contiene 4 ovuli.

A seconda della vitalità degli organi maschili e femminili, sulla vite si possono trovare fiori ermafroditi, staminiferi e pistilliferi. Oltre a questi tipi fondamentali, in *V. vinifera*, si possono ritrovare altre tipologie intermedie di fiore. I grappoli possono avere forma diversa a seconda della varietà.

**Il frutto** della vite è una **bacca** (acino), costituito da un epicarpo o buccia, dal mesocarpo o polpa (tessuto molle e succoso) e dall'endocarpo (tessuto membranoso in cui sono contenuti i semi o vinaccioli).

Gli acini sono posti sui pedicelli che formano, con le ramificazioni del grappolo, il raspo o graspo. La forma, la dimensione, il colore e il sapore degli acini variano a seconda della varietà. [4]



**Fig. 1.2** – Grappolo d’uva di vitigno *Piedirosso*

#### **1.4 Esigenze pedoclimatiche del genere *Vitis***

La vite presenta una vasta adattabilità al clima e presenta quindi un immenso areale di coltivazione. Negli ambienti viticoli dell'Italia meridionale ed insulare non esiste il problema di un adeguata insolazione in quanto questa risulta più che sufficiente affinché si compia il ciclo biologico della vite, pianta tipicamente eliofila. Nel settentrione d'Italia esiste invece una correlazione diretta tra eliofania e contenuto zuccherino. Se la radiazione solare è in grado di determinare il grado zuccherino o l'epoca di maturazione dell'uva, la temperatura influenza tutte le fasi fenologiche della pianta, e può addirittura determinarne la morte. La vite europea inizia a manifestare danni quando si raggiungono circa i  $-15^{\circ}\text{C}$  in inverno e i  $-5^{\circ}\text{C}$  in caso di

brinate tardive. Le vite americane hanno una soglia di danno ad una temperatura inferiore di 5°C circa, mentre gli ibridi produttori diretti e gli ibridi *Vitis vinifera* x *Vitis amurensis* rispettivamente a -25°C e a -40°C nel caso di geli invernali. I danni da eccesso termico riguardano esclusivamente la viticoltura meridionale e insulare e sono in rapporto anche alla ventosità e in particolare alla presenza dello scirocco (raggrinzimento degli acini e appassimento totale).

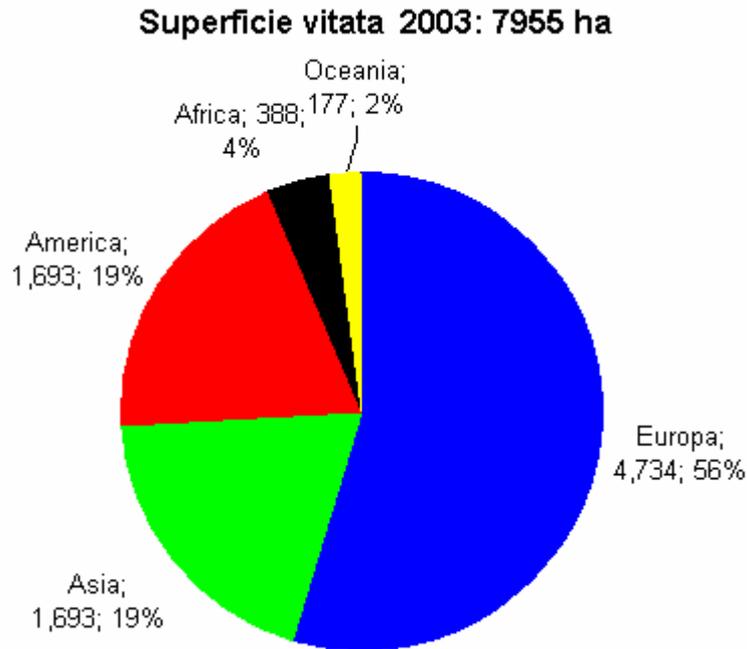
Nelle zone a bassa piovosità primaverile-estiva è necessaria un'oculata regimazione idrica in modo da conservare nel terreno l'acqua caduta durante l'inverno. La pianta di vite richiede quantitativi diversi di acqua disponibile nelle differenti fasi vegetative. Una scarsa piovosità durante l'inverno induce il risveglio vegetativo, ma i germogli, dopo l'allegagione, in genere cessano di crescere e l'uva, specialmente quella dei vitigni più vigorosi, non arriva a maturazione. Danni più o meno simili si hanno anche a causa della siccità estiva, in quanto viene a mancare la disponibilità idrica proprio nel momento in cui la pianta è particolarmente esigente. Altrettanto dannose sono le piogge eccessive durante l'estate o l'autunno. Nel primo caso si determina la formazione di un prodotto molto acquoso, con basso contenuto di zuccheri e elevato di acidi, mentre nel secondo caso vengono particolarmente favoriti gli attacchi di muffa grigia, con conseguenze dannose sul vino.

La vite europea presenta un'ampia adattabilità al terreno ma con l'introduzione dei portinnesti tale caratteristica non ha più importanza. Come il portinnesto, così anche il terreno è in grado di determinare la qualità e la quantità della produzione viticola sia direttamente (composizione chimica e fisica, colore), sia indirettamente in

relazione ad alcuni fattori, quali la giacitura e l'esposizione, che possono modificare il microclima di quel determinato ambiente [5].

## **1.5 Panoramica sulla viticoltura mondiale**

Passando ad analizzare i numeri dell'uva e del vino, i dati ISTAT del 2003 riguardanti le aree vitate nel mondo dichiarano che poco meno di 8 milioni di ettari di terreno sono stati coltivati a vite in tutto il globo (trattasi sia di viti per uva da tavola e uva da vino), di cui 4,7 milioni in Europa (3,5 milioni nella "vecchia" EU), 1,6 milioni in Asia, 1 milione in America, 0,4 milioni in Africa e 0,2 milioni in Oceania. Nel 2003, dunque, circa 3 milioni di ettari di superficie vitata erano concentrati in tre nazioni: Spagna, Francia e Italia, mentre "soltanto" 157.000 ettari in Australia, 211.000 in Argentina, e 185.000 in Cile. Queste ultime infatti sono comunemente riconosciute come tra le più minacciose fonti di importazioni di vino. I dati riportano anche che negli ultimi quindici anni, a livello mondiale, la superficie vitata è scesa del 10% circa. Questo calo, tuttavia, non ha fatto riscontrare alcuna riduzione delle produzioni d'uva, che anzi sono nettamente aumentate. La produzione mondiale annuale di uve destinate alla vinificazione, al consumo fresco e all'essiccazione oscilla dai 60 ai 70 milioni di tonnellate. Le principali aree produttive dei singoli paesi viticoli gravitano attorno alla zona temperata (tra i 20° e 40° di latitudine), sia dall'emisfero boreale che in quello australe. Attualmente in Europa è concentrato il circa 60% della superficie vitata.



**Fig. 1.3** - Distribuzione della superficie vitata mondiale (in migliaia di ettari)

In America, invece, si sono avuti incrementi al Nord (Stati Uniti e Messico) e riduzioni consistenti nella parte meridionale (Argentina, Cile, Uruguay), ma al contempo si è assistito negli ultimi anni ad un incremento della viticoltura in paesi come la Colombia, Venezuela, nord del Brasile. Per ciò che riguarda l'Asia, al regresso in paesi come la Turchia e l'Afganistan, fa riscontro un interesse crescente in India ed Estremo Oriente (Cina e Corea).

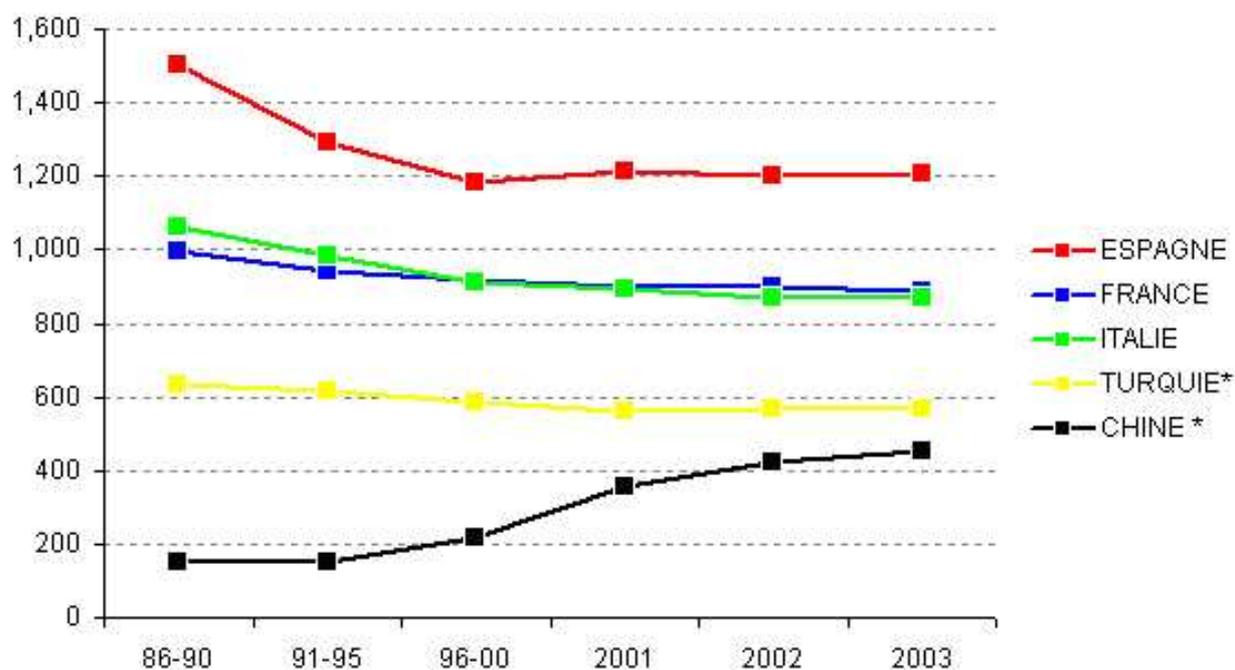
Per ciò che riguarda la situazione dei singoli paesi maggiori produttori di uva, ai primi posti, come già accennato, troviamo Spagna, Francia e Italia, seguiti da Turchia e Cina ed infine USA. I dati sono riportati nella Tabella 1.1.

<b>Pos.</b>	<b>Paese</b>	<b>2003</b>
1	SPAGNA	1,207
2	FRANCIA	887
3	ITALIA	868
4	TURCHIA	570
5	CINA	453
6	STATI UNITI	415
7	IRAN	300
8	PORTOGALLO	249
9	ROMANIA	239
10	ARGENTINA	211
11	CILE	185
12	AUSTRALIA	157
13	MOLDAVIA	148
14	AFRICA DEL SUD	132
15	GRECIA	130
16	OUZBEKISTAN	103
17	GERMANIA	102
18	BULGARIA	99
19	UCRAINA	99
20	ALGERIA	94

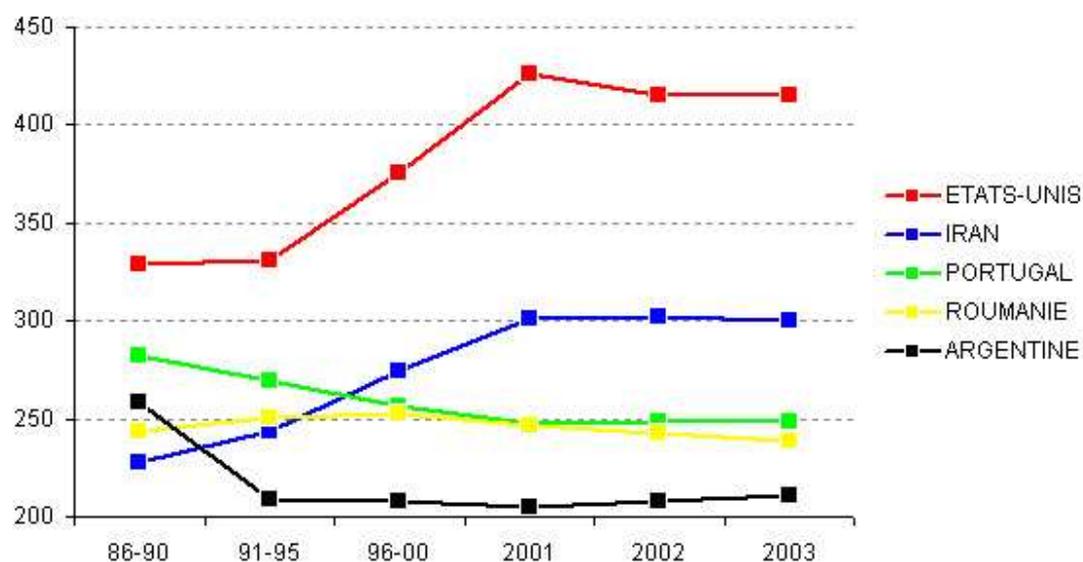
**Tab. 1.1 - Classifica dei paesi in base al numero di ettari destinati alla coltivazione della vite (in migliaia di ettari)**

Osservando, infine, il comportamento dei primi quindici paesi maggiormente coltivati a vite dai secondi anni ottanta fino al 2003, si identificano abbastanza chiaramente i paesi rampanti: la Cina che ha triplicato a 450000 ettari in 15 anni, l'Australia ha aumentato la sua produzione del +266%, il Cile del +50%, Africa del Sud e Iran del

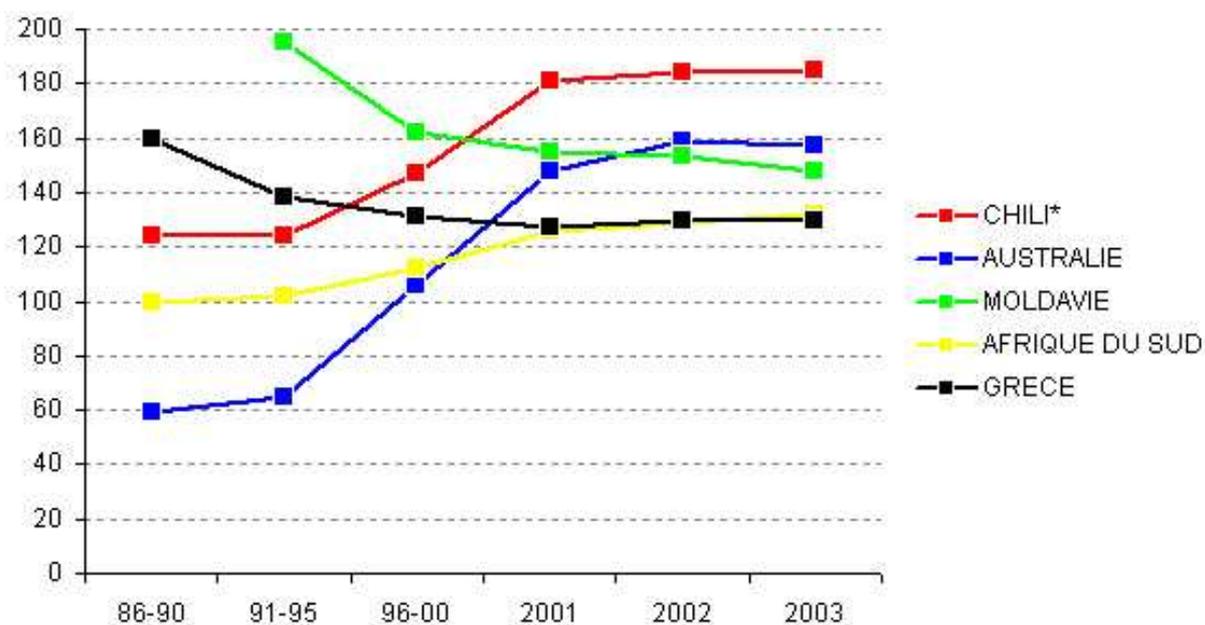
+30%. Forse la vera sorpresa e' il -19% dell'Argentina, molto simile alla variazione di Italia e Spagna (mentre la Francia fa -11%). I dati sono visualizzati nei grafici rappresentati in figura 1.4, 1.5 e 1.6



**Fig. 1.4** Andamento produttivo (dall'80 al 2003) dei primi 5 paesi maggiormente coltivati a vite



**Fig. 1.5** - Andamento produttivo (dall'80 al 2003) dei secondi 5 paesi maggiormente coltivati a vite



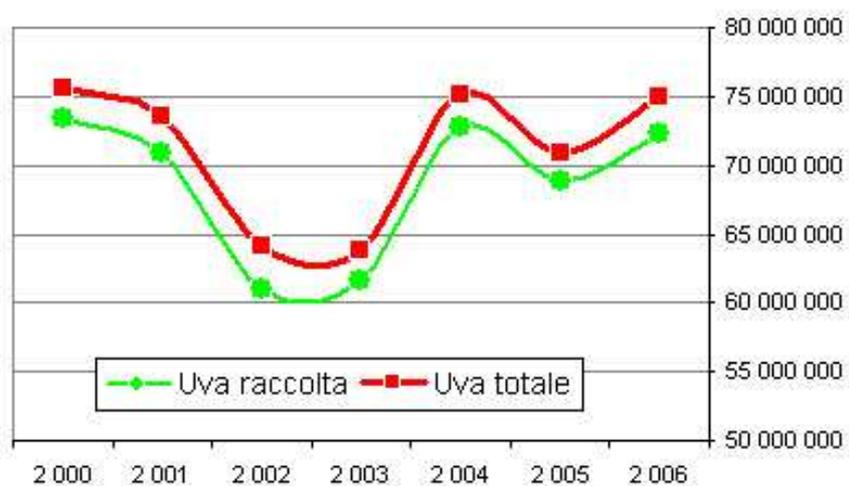
**Fig. 1.6** - Andamento produttivo (dall'80 al 2003) dei terzi 5 paesi maggiormente coltivati a vite

## 1.6 La viticoltura in Italia

La posizione privilegiata che l'Italia occupa nel bacino del Mediterraneo garantisce condizioni eccezionalmente favorevoli alla coltivazione della vite. Una peculiare caratteristica della nostra viticoltura è di essere distribuita in tutte le province e regioni, in condizioni ecopedologiche diverse. Essa si esercita all'isola di Pantelleria (36,7° di latitudine) a Bressanone (46,7° di latitudine). In questo ambiente molto vario si realizzano tutti gli obiettivi della viticoltura: dalla uva da tavola ai vini molto alcolici da taglio o da dessert, ai vini di lungo invecchiamento ai vini bianchi, freschi fruttati, ai vini di spumantizzazione. Tutto ciò è a conferma che la coltivazione della vite occupa una posizione preminente nell'economia italiana, impegnando numerosi operatori agricoli.

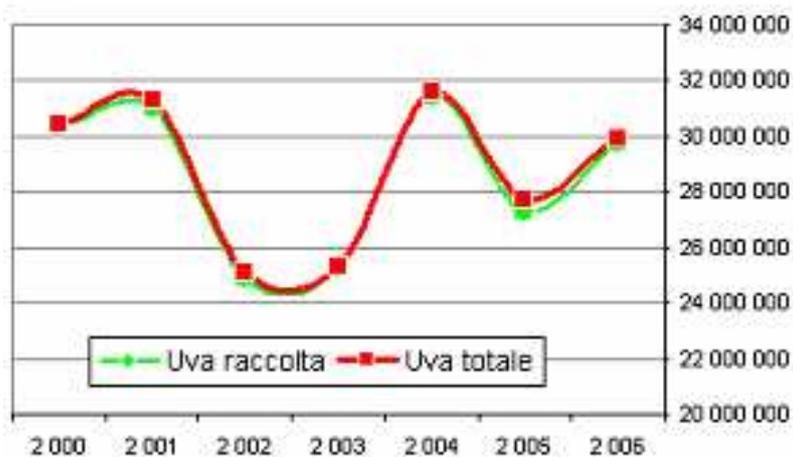
Passando ad esaminare le produzioni totali di uva, i numeri ISTAT per ciò che concerne la produzione in Italia nel 2006 riportano due dati: l'uva prodotta e l'uva raccolta: la differenza è di 2.7 milioni di quintali, circa il 3.6% del totale. Si tratta di uno "scarto di produzione", dovuto grappoli che restano sulla pianta non raccolti, che ogni tanto si vedono a novembre dopo le vendemmie.

Dunque nel 2006 in Italia sono stati prodotti circa 75 milioni di quintali di uva, 72.2 milioni di quintali sono stati raccolti. Quella del 2006 è stata un'ottima vendemmia, vicina al record del 2004 (72.7 milioni), con un incremento del 5.7% rispetto al 2005. I dati sono riportati nel grafico rappresentato in fig. 1.7.



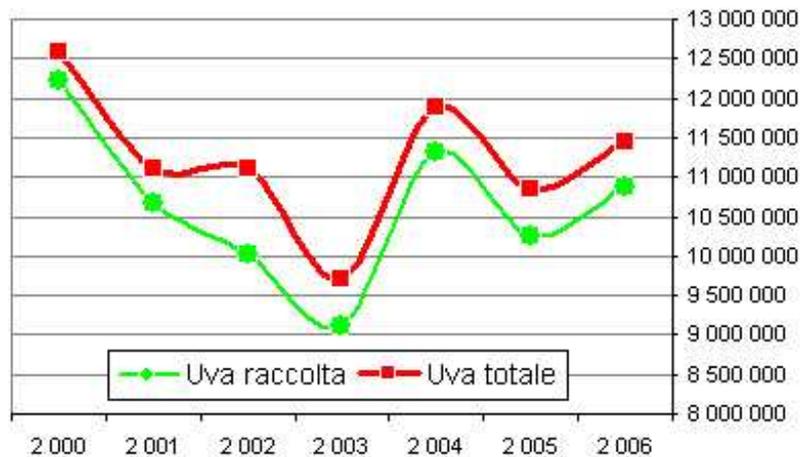
**Fig. 1.7 - Italia 2006: Andamento uva totale e raccolta (q)**

Osservando l'andamento per macroarea, al nord si è avuto un recupero più pronunciato dal 2005 al 2006, circa il +9%, in quanto si partiva da una situazione peggiore nel 2005, quando il calo era stato del 13%. Facendo un salto di 2 anni, siamo intorno al -5,3% rispetto al record del 2004 (fig. 1.8).



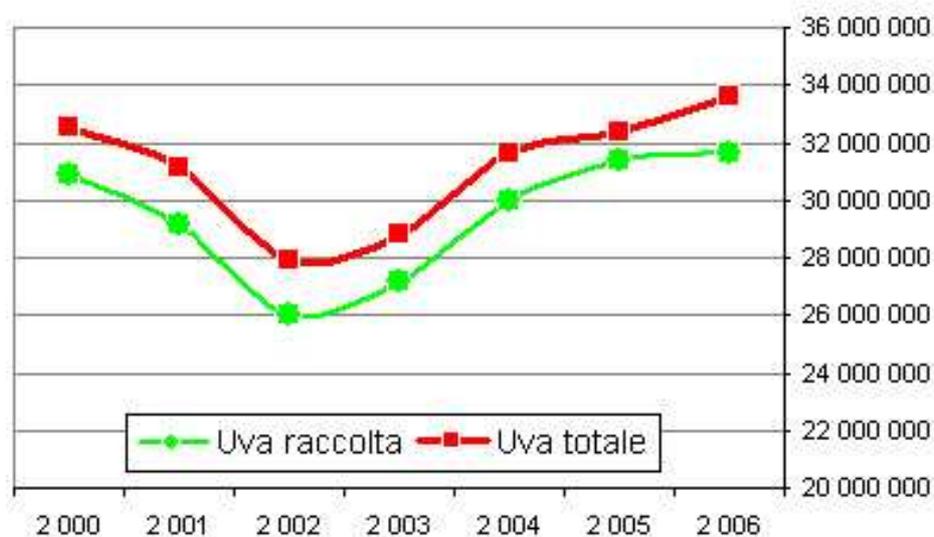
**Fig. 1.8 - Nord Italia 2006: Andamento uva totale e raccolta (q)**

In centro Italia si sono raccolti 11 milioni di quintali , il 6% in più rispetto al 2005 e intorno al 4% in meno rispetto al 2004. Quindi una situazione abbastanza simile al Nord, con una "volatilità" un po' meno pronunciata.



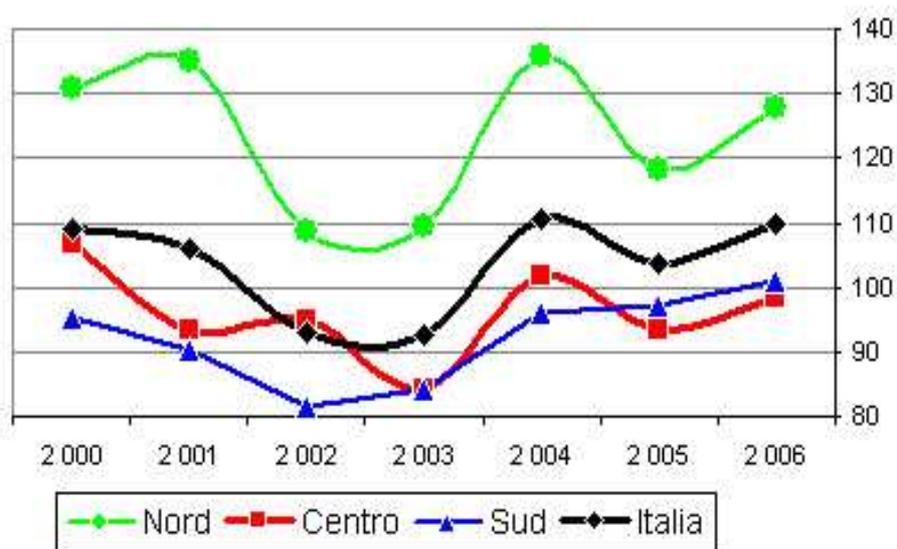
**Fig. 1.9 -** Centro Italia 2006: Andamento uva totale e raccolta (q)

Il Sud mostra un andamento più costante. Facendo riferimento all'uva raccolta e non a quella totale, al sud non troviamo la "valle" del 2004 ma un andamento palesemente più lineare rispetto al nord ed al centro. Nel 2006, dunque, la quantità d'uva raccolta, pari a 31.6 milioni di quintali, e' soltanto lo 0.7% più alta del 2005, ma la progressione sul 2004 è del 5.3%, quando invece sia Nord che Centro Italia erano sotto del 5% circa (fig.2.0).



**Fig. 2.0** - Sud Italia 2006: Andamento uva totale e raccolta (q)

Diamo uno sguardo, infine, alle rese per ettaro a livello italiano e per macroarea. In Italia nel 2006 la resa è salita a 110q/ha, il 6% in più dei 104q/ha del 2005 e a un filo dai 110.6q/ha (record degli ultimi 6 anni). Le tendenze sono le medesime della produzione (visto che le superfici non cambiano di molto): Nord e Centro sono sicuramente più volatili stagionalmente, mentre il sud ha mostrato un costante recupero dal 2002 in poi. Con una resa di 101q/ha, infatti, ha toccato il massimo da sei anni a questa parte (fig. 2.1).



**Fig. 2.1** - Resa per ettaro per macrozona (Italia 2006)

I grandi progressi compiuti dalla viticoltura e dall'enologia italiana si sono tradotti, infine, nel notevole incremento di esportazioni di vino (16-20 milioni di hl all'anno) e di uva da tavola (4,5 milioni di q).

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 La sistematica del genere *Vitis*

La vite appartiene all'ordine delle *Rhamnales*, famiglia delle *Vitaceae* o *Ampelidaceae*, che è distinta in due sottofamiglie: *Lecoideae* e *Ampelideae*.

Alla sottofamiglia delle *Ampelidee* fanno capo i generi *Ampelopsis*, *Cissus*, *Parthenocissus*, *Ampelocissus*, e *Vitis*. I primi quattro generi sono impiegati a scopo ornamentale. Il genere *Vitis* comprende due sottogeneri: *Muscadinia* e *Euvitis*.

#### *Sottogenere Muscadinia*

È caratterizzato da vinaccioli quasi tondeggianti e dall'assenza di ritidoma.

Comprende le specie:

- *Vitis rotundifolia*., specie naturale tipica delle coste meridionali degli USA e del Messico. Essendo resistente alle malattie crittogamiche alla fillossera ed ai nematodi, è utilizzata in esperimenti di ibridazione con la *V.vinifera* e per ottenere nuovi portainnesti resistenti ai nematodi e alla fillossera. Si coltivano le varietà *Scuppernong* ed *Eden*, vitigni a bacche grosse;
- *Vitis munsoniana*: di scarsa importanza;
- *Vitis popenoei*: di scarsa importanza.

### *Sottogenere Euvitis*

È caratterizzato da vinaccioli piriformi e presenza di ritidoma. Esso viene suddiviso nelle sue diverse specie in base ai climi ed alle zone geografiche in cui esse si sviluppano. (Fig. 2.2)

Come si può osservare *Vitis vinifera* comprende due sottospecie, *V.vinifera silvestris*, che racchiude le viti selvatiche dell'Europa centrale e meridionale, dell'Asia occidentale e dell'Africa settentrionale e *V.vinifera sativa*, che racchiude l'insieme delle viti coltivate, a loro volta suddivise in viti orientali (viti caspiche e antasiatiche) e viti mediterranee (viti pontiche e occidentali).

Ordine *Rhamnales* - Fam. *Vitacee* - Sottofam. *Ampelidee* - Generi: *Ampelopsis*,  
*Cissus*, *Partenocissus*, *Ampelocissus*, *Vitis*.

Genere *Vitis*

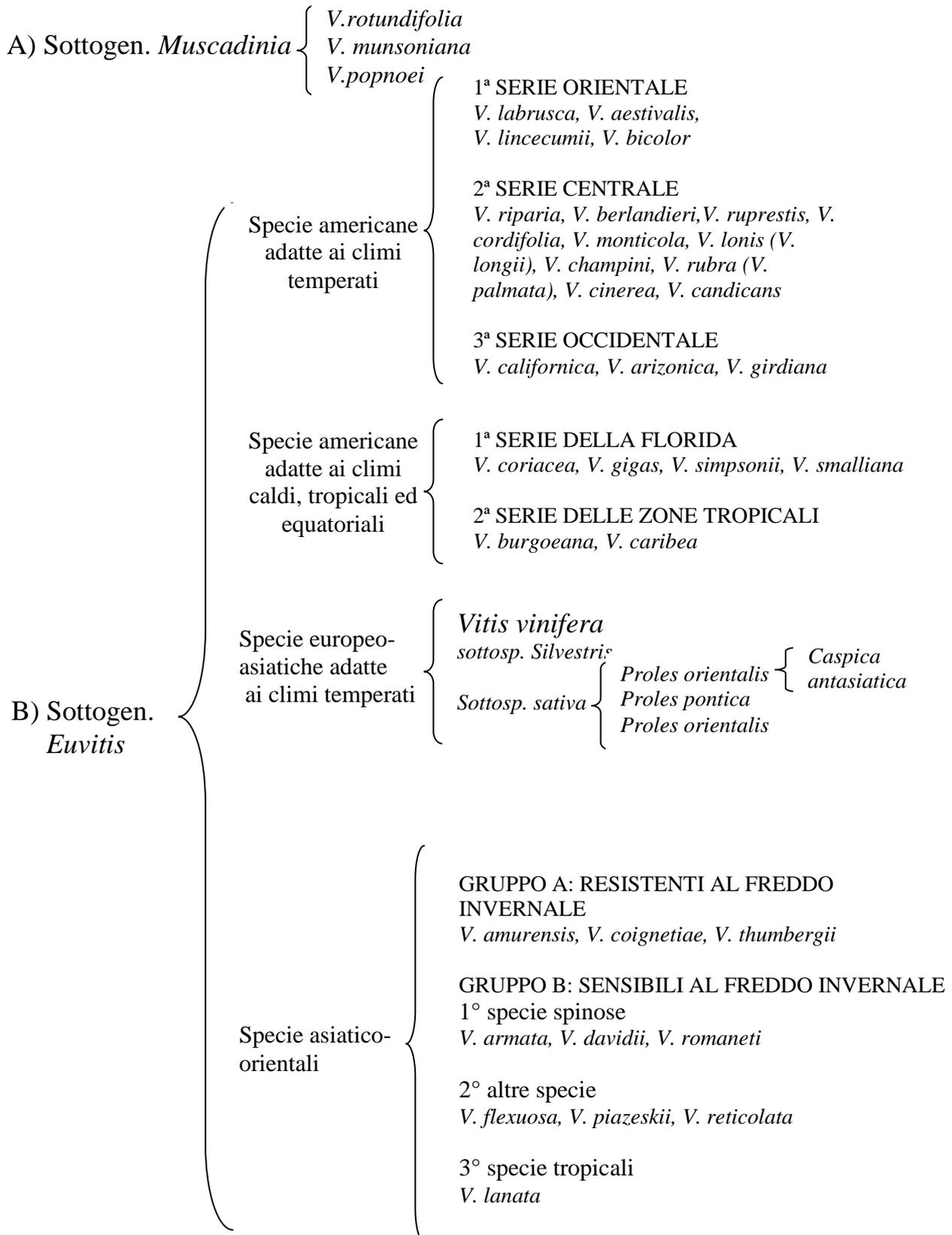


Fig. 2.2 – Sistematica del genere *Vitis*

## **2.2 Cenni storici sull'origine della vite. La comparsa della Filossera ed introduzione della vite americana in Europa**

Risulta difficile stabilire con assoluta certezza quale sia la patria di origine della vite, anche perché la ricerca delle testimonianze fossili e dei reperti archeologici è tuttora in atto. È comunque certo che il genere *Vitis* ha tre grandi centri di origine: il primo nell'America settentrionale (con qualche estensione nell'America centrale e meridionale), il secondo situato nell'Asia orientale (comprendente Nepal, Cina, Giappone), il terzo e più importante euro-asiatico, comprendente la vite definita europea (*V. vinifera*).

Della *Vitis vinifera*, l'unica specie maggiormente coltivata e subsontanea in Europa, non si conosce con esattezza la patria di origine, anche se viene considerata euro-asiatica o addirittura mediterranea, infatti alcuni autori (Negroul, 1960) riconoscevano la Transcaucasia (Asia sud-occidentale) come la patria della vite e della viticoltura. Da tale zona la vite si sarebbe poi diffusa nella Tracia, in Siria, in Grecia e di qui in Italia. Conoscenze paleontologiche consentono di affermare che in Italia la vite è comparsa in tempi remotissimi, esattamente nel Pliocene dell'età terziaria. Presso Ascoli Piceno e Fiano Romano sono stati trovati resti fossili di *V. vinifera* risalenti all'era quaternaria e reperti relativi all'età neolitica attestano il consumo e l'utilizzazione dell'uva. Il primo documento che invece testimonia la coltivazione della vite e l'uso del vino è in scrittura sumerica e risale alla prima metà del III millennio a.C. In Italia la viticoltura sarebbe giunta in Sicilia con i colonizzatori egeo-micenei e si sarebbe diffusa successivamente lungo le coste

meridionali; alla diffusione nel centro e nel nord della penisola avrebbero invece contribuito gli etruschi. Durante il periodo romano l'interesse per la vite e la sua coltura è andato accentuandosi sempre più, anzi è proprio grazie ai Romani e all'Impero Romano che la viticoltura si è potuta diffondere maggiormente a livello europeo (Francia e Germania in particolare).

Il periodo medievale si apre in Italia con una desolante situazione politica e socio-economica che ha avuto gravi ripercussioni sull'agricoltura e dunque anche sulla viticoltura. Nonostante questo, la situazione non è stata irreparabile grazie al ruolo che la vite ed il vino rivestivano nella religione cristiana: la necessaria presenza del vino nella celebrazione della santa messa indirizzò l'attenzione del clero e degli ordini monastici alla coltivazione della vite intorno alle proprie chiese e conventi, aree sicuramente molto più protette dalle scorrerie dei barbari.

Nell'età dei comuni, si ebbe infine una netta ripresa della viticoltura dovuta a nuove sanzioni che ne favorirono la diffusione e la protezione.

Con la scoperta dell'America, l'emigrazione italiana ha contribuito a creare le viticole di molti paesi dell'America del Nord, America del Sud e dell'Australia. Qualche secolo dopo, però, con le nuove viti vengono importati in Europa i peggiori parassiti di tale pianta: *Oidium thuckeri* (oidio o mal bianco della vite) un fungo scoperto a Londra nel 1845, *Viteus vitifoliae* (o fillossera della vite), un insetto scoperto nella Francia meridionale nel 1868, ed infine, nel 1878 la peronospora o *Plasmopara viticola*. La viticoltura europea ha attraversato, da allora, un momento di

grande crisi, in particolare nel periodo compreso tra il 1858 e il 1862 quando, nel nostro continente, comparve la fillossera della vite.

La fillossera (*Phylloxera vastatrix*) è stata una delle calamità naturali più gravi nella storia dell'agricoltura. Si tratta di un parassita, un'afide, che si nutre delle radici delle viti e che, una volta attaccato un vigneto, lo distrugge completamente. Originaria del continente americano, la *Phylloxera Castratrix* arriva in Europa comparso per la prima volta in Francia, ad Arles, in Provenza, nel 1863. Inizialmente non si era compresa la causa del perchè le viti morivano ed, una volta estirpate, si presentavano prive di radici. Dapprima lentamente, poi a macchia d'olio, con sempre maggior velocità, le viti da vino di tutta Europa sono state attaccate ed hanno rischiato di scomparire. In Italia la fillossera fa la sua comparsa nel 1879 (in provincia di Como e di Milano, e nell'anno successivo in provincia di Caltanissetta e Messina). Durante il suo progressivo espandersi nella nostra penisola ha distrutto circa due milioni di ettari di vigneti. I contadini e gli agronomi hanno cercato di resistere con tutto quello che la scienza di allora permetteva di fare: pericolosissime fumifugazioni, iniezioni nel terreno di sostanze chimiche e così via. Il tutto però senza riuscire a bloccare completamente lo sterminio. Poi l'intuizione, che arriva dal professor Planchoin di Montpellier il quale individua l'origine americana della fillossera, verificando che secoli di convivenza hanno permesso alle viti americane di sviluppare efficaci armi di difesa. Infatti, mentre l'attacco alla vite europea avveniva sulle foglie, sulla nostra vite, ben più pericolosamente, la fillossera scavava gallerie nelle radici per deporre le uova i tessuti radicali subivano una grave disorganizzazione, spesso aggravata da

successivi insediamenti di microrganismi patogeni e la pianta reagiva producendo dei noduli o calle e, sentendoli come corpi estranei li rigettava, procurandosi la morte per mancanza di radici.

L'unica soluzione al problema della Fillossera è stata dunque l'innesto della vite europea, produttrice di vini di qualità, su piede di vite americana o di suoi ibridi, resistenti agli attacchi della fillossera: tale metodo è tuttora di generale applicazione.

Per arrivare a un giusto equilibrio ci sono voluti anni di studi e, purtroppo, anche molte rinunce: da allora la mappa dei vitigni in Europa è cambiata completamente, e molte qualità dei vitigni "pre-fillossera" sono oggi scomparsi.



**Fig. 2.3** - Foglia di vite attaccata da *Fillossera*

### **2.3 Era post-fillossera: panoramica sulle problematiche relative alla vinificazione ed alla qualità del prodotto finito**

La conseguente ricostituzione post-fillosserica dei vigneti europei ha comportato l'abbandono di moltissime varietà, con gravi perdite genetiche e la riduzione della biodiversità, fenomeno che ha continuato e si è diffuso particolarmente nell'ultimo secolo.

I numerosi esperimenti di ibridazione alla fine dell'Ottocento tra specie europee ed americane, al fine di evitare l'innesto sul piede americano (definiti ibridi produttori diretti), portarono a dei scarsi risultati e molti difetti: vitigni con modesta resistenza ai parassiti ed alle malattie e con aromi anomali. Questi, infatti, non avevano dimostrato un'adeguata resistenza alla fillossera e non sempre si sono presentati resistenti alla peronospora e all'oidio. L'arrivo in Europa di viti americane, inoltre, ha portato anche all'impianto di ibridi in grado di produrre direttamente uva: si tratta del Clinton e di Isabella (uva fragola). Il dilagare di questi ibridi produttori diretti, troppo spesso considerati la soluzione nazionale al problema vinicolo, portarono ad una sovrapproduzione di vini scadenti e alla percezione del pericolo che rappresentavano per la qualità del prodotto. Il prodotto offerto era, infatti, di qualità nettamente inferiore rispetto a quello della *V. vinifera*, che alla degustazione ha un particolare sapore, denominato "foxy" o volpino, che può essere trasmesso al vino. Il vino derivante dagli ibridi presentava, appunto, due gravi difetti: la limitata shelf-life (inferiore all'anno) e il contenuto doppio di alcool metilico rispetto a quello ottenuto dalla vite europea. Attualmente in Italia la superficie coltivata con tali ibridi è molto limitata (circa l'1%) a differenza della Francia (circa il 20%). Tale differenza è dovuta

ai diversi divieti legislativi sulla loro diffusione nel nostro paese (a partire dal 1931).

La legislazione attuale vieta, inoltre, la commercializzazione di mosti e vini derivanti da piante di vite diversi da *V. vinifera*.

L'Italia possiede, peraltro, il più ricco patrimonio ampelografico rispetto a tutti gli altri paesi produttori di vino. Spesso, però, per motivi di pigrizia o, peggio ancora, per facili scelte commerciali, le nostre aziende coltivano sempre gli stessi vitigni che hanno permesso loro di raggiungere ottimi risultati in termini quantitativi, a scapito tuttavia della qualità. Oggi, al di là del nostro consapevole dovere etico e morale che impone di salvaguardare la biodiversità viticola, sembra opportuno percorrere nuove strade e studiare da vicino antiche varietà per esaltarne le potenzialità enologiche. Esistono però ancora delle piccole realtà locali del nostro paese in cui sono tuttora coltivate e vinificate queste uve ibride a dispetto dei divieti e delle normative vigenti. Per tale ragione per tutti i vini di qualità esistono dei regolamenti e delle norme, i famosi disciplinari, che indicano per ciascuna zona enologica (detta Denominazione d'Origine) il tipo di vitigno la cui coltivazione è ammessa e le modalità di coltivazione e di lavorazione di ciascun vitigno. I vini che sono soggetti a queste regole vengono designati con le sigle **DOC** (Denominazione d'Origine Controllata) e **DOCG** (Denominazione d'Origine Controllata e Garantita). Ad essi seguono tutta una serie di regolamenti e normative atti a controllare e preservare sia i vitigni puri caratteristici delle nostre regioni che il prodotto finale che ne deriva.

## **2.4 Salvaguardia del prodotto di qualità: una panoramica sulle normative italiane ed europee in campo vitivinicolo**

La normativa italiana in materia vitivinicola, ormai strettamente connessa a quella comunitaria, tende a regolamentare la produzione e la vendita di prodotti vitivinicoli per prevenire le sofisticazioni e/o adulterazioni, garantire la qualità del prodotto ed assicurare il consumatore.

Come abbiamo appena accennato, alla fine dell'ottocento l'unica soluzione per salvare i nostri vigneti dall'attacco della fillossera fu quella di importare, come portainnesti, dei vitigni americani divenuti resistenti al parassita, alcuni puri, altri ibridi di specie americane e, successivamente, altri ibridi di specie americane con specie europee. La prima legge atta a salvaguardare la purezza dei vitigni italiani risale al 23 marzo 1931 n. 376, la quale vietava "la coltivazione dei vitigni ibridi produttori diretti" salvo che nelle province in cui gli organi ministeriali "ne riconoscano l'utilità" e con modalità da stabilirsi con decreto ministeriale. Pochi anni dopo, la legge n. 729 del 2 aprile 1936 estendeva la norma suddetta all'uva fragola, stabilendo che il divieto era applicato "anche alla coltivazione del vitigno isabella (*Vitis labrusca*). Tale coltivazione fu però ammessa al di fuori dei limiti stabiliti, nei casi in cui risultasse accertato che veniva coltivata solo allo scopo di produzione di uva destinata al consumo diretto. Per consumo diretto doveva ovviamente intendersi sia il consumo come uva da tavola che la sua vinificazione. Queste norme venivano poi riprodotte nel T.U. del R.D. 16 luglio 1936 n. 1634, anche se disposizioni da esse derivanti non sono mai state applicate con molta rigidità, pertanto sia l'uva fragola che gli ibridi produttori diretti hanno continuato ad essere coltivati. Inoltre neanche il

ministero ha mai emanato i decreti che avrebbero dovuto disciplinare la coltivazione. L'uva fragola, dunque, in regolare vendita sul mercato ortofrutticolo. Si può quindi affermare che, a parte il divieto teorico della coltivazione e privo di sanzioni (salvo ovviamente quella patrimoniale di non poter chiedere contributi per l'impianto di coltivazioni di uva fragola o di clinton), nulla impediva all'epoca di coltivare uva fragola, di venderla e di vinificarla. Inoltre la legge non fa mai riferimento alla percentuale superiore alla media di metanolo presente nel vino prodotto con uva fragola. Meno favorevole è stata la situazione del vino prodotto con queste uve, a partire dal 1965. L'art. 22 DPR 12 febbraio 1965 n. 162 proibiva la vinificazione di uve diverse dalla *V. vinifera*. In seguito a questa legge numerose sono state le proteste dei coltivatori, pertanto essa è stata leggermente corretta mediante l'art. 1 della legge 6 aprile 1966 n. 207. Tale articolo stabiliva che "sono vietati la detenzione a scopo di commercio ed il commercio dei mosti e dei vini non rispondenti alle definizioni stabilite o che abbiano subito trattamenti ed aggiunte non consentiti o che, anche se rispondenti alle definizioni e ai requisiti del presente decreto, provengono da vitigni diversi dalla *V. vinifera*, eccezion fatta per i mosti ed i vini provenienti da determinati vitigni ibridi, la cui coltivazione potrà essere consentita con decreto del ministro per l'agricoltura e le foreste in relazione alle particolari condizioni ambientali di alcune zone ed alle caratteristiche intrinseche dei vitigni stessi". Ci vuol poco a comprendere che questa ultima legge risultava molto vaga in quanto utilizzava un'espressione generica (vitigni ibridi) che potevano concernere sia ibridi produttori diretti, sia ibridi di altro tipo, sia l'uva fragola. Quindi,

a partire dal 1966 l'uva fragola poteva essere coltivata come uva destinata al consumo diretto, non vi era alcuna sanzione per chi la vendeva come uva da tavola, ne veniva consentita la vinificazione, ed infine era consentito porre in commercio il prodotto ottenuto dalla sua vinificazione. A seguito dell'entrata in vigore di normative europea, la situazione giuridica è stata ulteriormente modificata. Il Regolamento n. 822/1987 del 16 marzo 1987 ha fissato l'elenco dei vitigni che possono essere utilizzati per la produzione di prodotti vinosi, in cui si prevede una deroga temporanea per gli incroci interspecifici (ibridi produttori diretti). Inoltre il Regolamento (CE) n. 1493/1999 del Consiglio del 17 maggio 1999 relativo all'organizzazione comune del mercato vitivinicolo, all'art. 19, ha stabilito che: "1. Gli Stati membri compilano una classificazione delle varietà di viti per la produzione di vino. Tutte le varietà classificate appartengono alla specie *V. vinifera* o provengono da un incrocio tra questa specie e altre specie del genere *Vitis*. La classificazione non può applicarsi alle varietà seguenti: Noah, Othello, Isabelle, Jacquez, Clinton e Herbémont.

2. Nella classificazione gli Stati membri indicano le varietà di viti atte alla produzione di ciascuno dei prodotti nel loro territorio. Tali varietà appartengono alla specie *Vitis vinifera*.

3. Soltanto le varietà di viti menzionate nella classificazione possono essere impiantate, reimpiantate o innestate nella Comunità per la produzione di vino. La restrizione non si applica alle viti utilizzate a scopo di ricerca ed esperimenti scientifici.

4. Le superfici piantate con varietà di viti per la produzione di vino non menzionate

nella classificazione devono essere estirpate, tranne nei casi in cui la produzione è destinata esclusivamente al consumo familiare dei viticoltori."

Questa disposizione, che ribadisce la possibilità di coltivare la *Vitis labrusca* per il consumo diretto, non avrebbe inciso più di tanto se non fosse intervenuta una nuova legge, quella del 4 novembre 1987 n. 460, che convertiva il D.L. 7-9-1987 n. 370. Con essa si stabiliva infatti l'obbligo di estirpare le viti proibite, pena la rimozione d'ufficio a spese del coltivatore (art. 4) e la pena della multa da lire 210.000 per ogni quintale di mosto o vino prodotto con uve diverse da quelle consentite da regolamento europeo del 1987 e detenute a scopo di commercio. La situazione, arrivati a questo punto, era la seguente:

- Era consentito coltivare l'uva fragola in tutto il territorio italiano "per il consumo familiare dei viticoltori". L'espressione sembra restrittiva rispetto a quella precedente che vietava solo la produzione a scopo di commercio, ma in realtà è praticamente coincidente: il consumo familiare non esclude ovviamente la possibilità di regalarlo ad estranei e/o alla famiglia.
- Vi era l'obbligo di estirpazione per i vigneti che superavano l'estensione richiesta per destinare l'uva ad un uso familiare e solo per le viti atte "alla produzione di vino"; non si applicava perciò a coltivazioni destinate a produrre uve da tavola.
- Era punito chi metteva in commercio vino fragolino prodotto da *Vitis labrusca*.
- Non era punito chi distillava l'uva fragola.

Per quel che riguarda più dettagliatamente la produzione di vino, il ventesimo secolo vede promulgate tutta una serie di leggi specifiche tese a disciplinare la produzione

del vino. Inizialmente l'obiettivo era quello di tutelare la tipicità del prodotto, in seguito, nel rispetto delle norme comunitarie, anche la sua qualità. Le più significative sono:

-il Regio Decreto Legge n. 497 del 7 marzo 1924, riguardante le disposizioni per la difesa dei vini tipici,

-il D.P.R. n. 930 del 12 luglio 1963, riguardante la regolamentazione dei vini di qualità prodotti in regioni determinate,

L'art. 22 DPR 12 febbraio 1965 n. 162 proibiva la vinificazione di uve diverse dalla *V. vinifera* e promuoveva la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio dei mosti, vini ed aceti fissando i limiti massimi entro i quali deve essere contenuta la quantità di alcool metilico nel vino (0,30 millilitri ogni cento millilitri nel rosso e 0,20 nei bianchi). Essa, inoltre, fissa i valori-limite di alcuni parametri analitici fondamentali del vino come: la gradazione alcolica, l'acidità volatile, il tenore massimo di anidride solforosa ammesso.

-la legge n. 164 del 10 febbraio 1992, riguardante la nuova disciplina delle denominazioni di origine dei vini, che stabilisce norme precise sulle "denominazioni di origine" e prevede un Comitato Nazionale (quale organo del Ministero dell'Agricoltura e delle foreste) che le faccia rispettare.

-il D.P.R. n. 506 del 24-05-1967 che racchiude le norme relative all'Albo dei vigneti e alla denuncia delle uve destinate alla produzione dei vini a denominazione di origine «controllata» o «controllata e garantita» (per vini D.O.C. e I.G.T.). La denuncia delle uve, che deve essere effettuata annualmente, riguarda la quantità di uva prodotta e

vinificata allo scopo di vendere il proprio prodotto con la "Denominazione di Origine Controllata" o "Indicazione Geografica Territoriale".

- Legge del 7 agosto 1986 n. 462 con la quale si istituisce l'anagrafe vitivinicola su base regionale destinata a raccogliere per ciascuna delle imprese che producono, detengono, elaborano e commercializzano uve, mosti, mosti concentrati, vini, vermouth, vini aromatizzati e prodotti derivati, i dati relativi alle rispettive attività.

## **2.5 Identificazione e differenziazione dei vitigni nostrani: uno sguardo generale sulle strumentazioni classiche fino ad oggi utilizzate**

L'estrema diversificazione varietale della vite, ha portato, nel corso dei secoli, all'elaborazione di criteri descrittivi utili per la classificazione botanica ed il riconoscimento dei numerosissimi tipi di vite. L' "ampelografia", come strumento di identificazione e di confronto varietale, prende forma organica all'inizio dell'ottocento, e nel corso dei decenni, verrà sempre più perfezionata. Numerosissimi studi hanno, infatti, descritto ed identificato tramite l'ampelografia svariate cultivar di vite [6-7-8]. Altra tecnica per la descrizione e l'identificazione dei vitigni che è stata ampiamente utilizzata è l' "ampelometria" [8-9-10]. Entrambe le tecniche, essendo basate su valutazioni qualitative (ampelografia) o biometriche (ampelometria) a carico di caratteri morfologici, ossia fenotipici, ampiamente influenzabili dal fattore ambiente, vengono oggi considerate avere, in molti casi, basso potere discriminatorio. Inoltre, un'ulteriore limitazione è rappresentata dall'applicazione legata a particolari fasi fenologiche della pianta. Pertanto, il loro impiego per l'identificazione varietale è

oggi più limitato, anche se la loro importanza nella descrizione dei diversi vitigni è ancora oggi indiscussa. Questo è stato causato dalla messa a punto di nuove tecniche biomolecolari di identificazione varietale, basate prima su marcatori biochimici (**profili isoenzimatici**) e successivamente sull'uso dei **marcatori genetici** (RFLP, RAPD, AFLP, SCAR, SSR), che rappresentano le cosiddette tecniche di “**DNA fingerprinting**”. Lo studio dei profili isoenzimatici ha trovato ampia utilizzazione nell'identificazione dei vitigni [6-11-12], ma questa tecnica presenta comunque minore potere di discriminazione rispetto alle tecniche che prevedono l'uso dei marcatori genetici. I grandi progressi che si sono registrati negli ultimi anni nell'impiego dei marcatori genetici hanno fornito un potentissimo strumento per una precisa ed oggettiva identificazione varietale e per tale motivo tali tecniche stanno progressivamente sostituendo sia gli approcci morfologici che quello dei profili isoenzimatici. La prima di tali tecniche ad essere stata utilizzata con successo è stata quella dei marcatori RFLP (acronimo di Restriction Fragment Length Polymorphism) [13-14-15-16], che però ha il difetto di prevedere dei protocolli di esecuzione relativamente laboriosi e lunghi. I marcatori RAPD (acronimo di Random Amplified Polymorphic DNA) hanno anch'essi dimostrato capacità di discriminazione tra le cultivar di vite [17-18-19]. Sono inoltre molto rapidi da eseguire, anche se in grado di fornire risultati poco ripetibili specialmente se eseguiti con apparecchiature diverse. Ultimamente si sono diffuse altre tre tecniche di DNA fingerprinting per l'identificazione dei vitigni: **SCAR** (acronimo di Sequence Characterized Amplified Regions), **AFLP** (acronimo di Amplified Fragment Length Polymorphism) e

microsatelliti o **SSR** (acronimo di Simple Sequence Repeat). Anche se i marcatori SCAR ed AFLP hanno trovato una certa applicazione in vite [20-21-22], i microsatelliti rappresentano probabilmente la tecnica di fingerprinting maggiormente utilizzata oggi per l'identificazione dei vitigni [23-24-22-25-26]. La tecnica dei microsatelliti è stata anche utilizzata in via sperimentale estraendo il DNA da mosto e da vino allo scopo di identificare i vitigni utilizzati per la loro produzione. Queste prove hanno fornito risultati abbastanza incoraggianti [27-28] anche se è necessario ancora affinare i protocolli d'analisi dei mosti e dei vini per una efficace difesa di tali prodotti da frodi. Nonostante la ricchezza varietale del patrimonio campano in generale e vesuviano in particolare, il limitato studio di identificazione e caratterizzazione varietale della realtà viticola locale, peraltro risalente alle descrizioni ampelografiche ottocentesche, ha portato fino ad oggi al riconoscimento ufficiale di appena dieci varietà. Pertanto risulta assolutamente necessario l'applicazione di tecniche di nuova generazione, fra cui si colloca la proteomica, per la identificazione, la valorizzazione e la conoscenza delle cultivar di vite della nostra regione.

## **2.6 La proteomica: una panoramica alla tecnica**

Il campo della Proteomica è attualmente in rapido sviluppo in quanto rappresenta il metodo per eccellenza in grado di separare ed identificare il complesso delle proteine di un organismo, rendendole disponibili per analisi successive. Il concetto di proteoma nasce dall'unione di due termini: PROTEINE e GENOMA ed indica

l'insieme di proteine codificate ed espresse dall'intero genoma di un organismo in un distretto ben preciso ed in un momento specifico del suo ciclo vitale. Dunque per proteomica si intende quell' insieme di tecnologie di analisi diverse - biochimiche, genetiche, informatiche - che consentono e che mirano a studiare il proteoma di un organismo identificando la struttura delle proteine che lo compongono, le loro funzioni e le loro interazioni. Mentre il genoma rappresenta un qualcosa di statico ed uguale in tutte le cellule ed in qualunque momento della vita di un organismo, il Proteoma è invece dinamico, in quanto capace di modificarsi qualitativamente, quantitativamente, in funzione degli stimoli esterni o più semplicemente in funzione dello specifico stato metabolico in cui l'organismo si trova. Ci si aspetta che questo approccio non porti solamente ad una maggiore comprensione delle basi molecolari della vita ma possa anche accelerare l'identificazione di nuovi bersagli molecolari da utilizzare in diagnostica e in terapia. La proteomica sta oggi vedendo la sua applicazione ed impiego in numerosi altri differenti campi, da quello medico-diagnostico al controllo qualità in campo alimentare fino al campo vegetale dove vede la sua applicazione soprattutto nell'identificazione di marcatori molecolari delle varietà oppure più semplicemente nell'identificazione di numerose proteine ancora oggi sconosciute. Le piante, organismi autotrofi ed immobili, sono strettamente vincolati all'ambiente in cui vivono, dove interagiscono più o meno intimamente con una miriade di organismi diversi. In virtù del loro piano organizzativo, gli organismi vegetali non possono facilmente sfuggire né a condizioni ambientali avverse né all'attacco di patogeni e predatori eterotrofi; di conseguenza sono stati spinti ad

evolvere specifiche forme d'adattamento e raffinati meccanismi di difesa, in grado di conferire loro capacità di tolleranza o resistenza. La metabolomica e la proteomica costituiscono, oggi, un potente mezzo per comprendere, applicando studi di tipo comparativo, quali molecole siano coinvolte nel meccanismo di reazione di un organismo al variare delle condizioni ambientali. Per questo motivo che, negli ultimi anni, l'analisi proteomica è stata applicata nello studio di un ampio range di tessuti vegetali: nei semi di pomodori nel corso della loro germinazione, nel mesocarpo maturo della bacca d'uva nonché foglie, raspi, radici ed altre parti della vite.

Per arrivare a identificare e caratterizzare, dunque, il proteoma di un organismo occorrono una serie di singoli passaggi successivi. Il primo prevede la separazione della miscela proteica, e la tecnica più comunemente utilizzata è elettroforesi bidimensionale, seguita dalla fase di identificazione delle proteine mediante l'uso di tecniche di spettrometria di massa ed analisi in data-base. L'identificazione delle proteine viene realizzata inserendo le masse peptidiche, derivanti dalla digestione degli spot *in situ* con enzimi ad alta specificità di taglio (il più comunemente usato è la tripsina) e misurate allo spettrometro, in appositi data-base di sequenze proteiche note o, in alternativa, qualora la proteina ricercata non fosse stata ancora direttamente sequenziata, in data-base genetici che prevedono la traduzione dei geni in proteine. Grazie alla bioinformatica oggi è possibile, infatti, consultare gli archivi di struttura delle proteici e genomici presenti on line, consentendo l'analisi in simultanea di migliaia di proteine e fornendo in poco tempo il risultato.

## ***Elettroforesi Bidimensionale***

E' la tecnica separativa maggiormente impiegata nel campo della proteomica in quanto altamente risolutiva, capace di separare complessi proteici costituiti da migliaia di proteine. Essa prevede che la separazione avvenga ortogonalmente mediante due diversi principi fisicochimici. Si ha una prima separazione in base al punto isoelettrico (pI) delle proteine attraverso l'ISOELECTRIC FOCUSING (IEF), seguita da una seconda separazione in base al peso molecolare (PM) attraverso l'elettroforesi SDS-PAGE (con sodio-dodecil-solfato). L'isoelettrofocalizzazione in gradiente di pH immobilizzato (IEF-IPG) prevede l'uso delle IPG-Strips sulle quali il gradiente di pH è immobilizzato nel gel mediante co-polimerizzazione degli anfoliti all'acrilammide e quindi costituisce un'unica matrice con il gel di poliacrilammide. Il gradiente di pH lungo le strisce di gel polimerico si realizza con l'utilizzo delle immobiline, composti derivati dell'acrilammide bifunzionali, in quanto hanno sia un gruppo carbossilico che un gruppo amminico terziario: ad un'estremità della molecola è posto il gruppo funzionale e all'altra il doppio gruppo acilico che reagirà durante il processo di polimerizzazione con l'acrilammide. Questo permette di ottenere una netta e stabile focalizzazione, con grande incremento della riproducibilità e riduzione al minimo della distorsione delle bande [29]. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE), che costituisce la seconda dimensione, consente di separare le proteine in base alla massa. In tal caso la separazione delle miscele proteiche viene realizzata grazie al detergente anionico sodio dodecilsolfato (SDS) che interagisce con le catene laterali non polari degli

amminoacidi, mediante le sue code idrofobiche. In questo modo la proteina è completamente aperta e l'SDS può ricoprire uniformemente la proteina. La formazione del complesso proteina-detergente rende uguale la densità di carica delle proteine (quantità di carica/dimensione molecolare) cosicché le proteine avranno la stessa mobilità elettroforetica e l'unico fattore discriminante sarà la massa molecolare (SDS-PAGE ).

### *Spettrometria di massa*

La spettrometria di massa è una tecnica analitica in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa è stata ionizzata, ossia dopo che gli è stata impartita una carica elettrica. Lo spettrometro di massa è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica e consente l'analisi di piccolissime quantità di campione. La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa. Negli ultimi anni nuove strategie nella ionizzazione di macromolecole hanno rappresentato un importante progresso nella biologia. L'introduzione dell'ESI nel 1984 e del MALDI nel 1988 rappresentano, infatti, due tappe fondamentali in questo senso. Entrambe le tecniche sono molto precise e permettono l'osservazione di polimeri intatti da 100,000 Da. I sistemi di immissione del campione devono tener conto che il campione deve passare dalla pressione atmosferica ad una condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare

frammentazioni degli stessi ioni. Di solito è necessario rispettare una condizione di alto vuoto pari a  $10^{-6}$  -  $10^{-9}$  torr. In generale uno spettrometro di massa consta di quattro parti: una sorgente di ionizzazione, l'analizzatore di massa, il detector e il data sistem. Ciò che distingue una classe di spettrometri dall'altra è il sistema di ionizzazione (in genere ESI o MALDI) ma soprattutto il tipo di analizzatore, in quanto è il componente essenziale che definisce gli intervalli di massa accessibili, la sensibilità e la risoluzione. Negli strumenti da banco sono impiegati tre tipi di selettori di massa: il quadrupolo lineare (Q), la trappola ionica (IT) oppure un analizzatore a tempo di volo (TOF-MS, Time of Flight MS). L'analizzatore a quadrupolo (Q) separa gli ioni in base alla traiettoria che essi compiono attraverso un campo elettrico che varia rapidamente. Un potenziale a corrente continua sovrapposto a una radiofrequenza (Rf) crea un campo elettrico tra i quattro poli costituiti da tubi metallici paralleli. Giungono al rivelatore, posto all'estremità del quadrupolo, solo gli ioni caratterizzati da un certo rapporto massa/carica in funzione dei valori del campo quadrupolare, valori variabili in modo continuo, cosicché, è possibile ottenere una scansione completa dell'intervallo di massa prescelto. C'è poi la possibilità di frammentare ioni parenti dopo il primo quadrupolo per generare spettri MS-MS: in questo caso gli ioni prescelti vengono accelerati linearmente e fatti collidere con gas inerte in una cella di collisione posta prima del secondo analizzatore quadrupolare, che separerà infine i frammenti ottenuti generando lo spettro MS/MS. L'analizzatore a trappola ionica (IT) si basa anch'essa sulla separazione delle masse degli ioni in base al potenziale di radiofrequenza. La gran differenza rispetto all'analizzatore a

quadrupolo è che gli ioni, una volta prodotti, non sono accelerati verso l'analizzatore esterno, ma sono mantenuti intrappolati per un certo periodo in una zona in cui è presente un campo elettrico quadrupolare. Le trappole ioniche presentano velocità di scansione paragonabili ai migliori quadrupoli lineari: il fatto di poter mantenere gli ioni confinati per un tempo finito (nei quadrupoli lineari gli ioni appena prodotti sono accelerati verso l'analizzatore) permette di effettuare vari tipi di esperimenti sugli ioni stessi: dall'acquisizione di spettri MS-MS (spettrometria tandem-MS) fino a reazioni ione-molecola. Esperimenti che, in uno strumento con selettore quadrupolare o magnetico, devono essere compiuti sequenzialmente, cioè connettendo in serie più sorgenti di ionizzazione ed analizzatori, con un evidente aggravio di costo e ingombro. Le trappole ioniche, invece, consentono una elevata flessibilità anche nel corso della medesima analisi: è possibile scegliere di operare nella modalità MS-MS o addirittura MS-MS-MS, tecnica che permette di acquisire uno spettro "figlio", per frammentazione di uno ione dello spettro di base mediante collisione risonante con elio, in modo da ottenere informazioni accessorie molto importanti nell'identificazione di sostanze la cui struttura sia incognita. Nell'analizzatore a tempo di volo (TOF) gli ioni sono accelerati alla stessa energia cinetica da un campo elettrico di forza conosciuta ed il tempo impiegato dalla particella per percorrere il tubo di volo (la cui lunghezza è nota) dipenderà esclusivamente dalla massa molecolare di ciascuna molecola. Le dimensioni del tubo di volo, infatti, determinano gran parte delle prestazioni dello strumento. Una delle caratteristiche principali del Time-of-Flight è l'alto numero di spettri prodotti nell'unità di tempo e l'accurata

definizione della forma di ogni singolo picco. Utilizzare un analizzatore a tempo di volo TOF-MS ha il vantaggio di permettere l'acquisizione di spettri in tempi brevissimi (dell'ordine dei microsecondi), permettendo di risolvere picchi strettissimi in separazioni molto veloci oppure di acquisire un numero elevato di scansioni, con conseguente aumento di sensibilità, in caso di separazioni tradizionali. Un altro vantaggio del TOF è l'aumento di risoluzione e il fatto che essa, a differenza degli analizzatori magnetici o quadrupolari, è uniforme su tutto l'intervallo di massa. Il detector, il terzo componente dello spettrometro di massa svolge il ruolo di "vedere" gli ioni uscenti dal sistema di selezione traducendo l'arrivo di uno ione in un segnale elettrico. I parametri che caratterizzano le prestazioni di un detector sono la sensibilità e la velocità di risposta. In particolare questa ultima diventa critica quando l'arrivo degli ioni è concentrato in brevi istanti di tempo. Il data-system è, infine, rappresentato da una scheda di acquisizione in grado di campionare gli spettri, da un computer e da un software che permettono di controllare lo strumento, memorizzare gli spettri ed eseguire una successiva elaborazione. Sono essenzialmente due gli approcci MS complementari maggiormente utilizzati per l'identificazione delle proteine: il mappaggio o 'fingerprinting' della massa dei peptidi mediante MALDI-TOF MS ( Matrix-Assisted Laser Desorbition Ionization) e il sequenziamento dei peptidi attraverso ESI tandem MS (o MS/MS).

## **2.7 Applicazione delle tecniche elettroforetiche e proteomiche nello studio delle proteine dell'uva**

Numerosi lavori scientifici hanno avuto ed hanno tuttora come oggetto lo studio delle proteine dell'uva, e sta gradualmente emergendo un ruolo tecnologico importante assolto da esse nel corso della trasformazione, seppure secondario rispetto ad altre specie, in quanto si ritrovano comunque nel prodotto finito insieme alle proteine dei lieviti. Il basso contenuto proteico nel prodotto finito è da attribuire, infatti, alla proteolisi ad opera delle proteasi ed alla denaturazione che esse subiscono nel corso della fermentazione in seguito alle variazioni di pH. Non a caso le proteine che si ritrovano poi nel vino sono quelle che dimostrano maggiore resistenza alla proteolisi nonché al pH notevolmente acido (2,9-3,0), caratteristico del prodotto finale [30].

Gli obiettivi principali di gran parte della ricerca svolta sulle proteine dell'uva hanno riguardato la caratterizzazione di marker per differenziare le diverse cultivar di vite [31], oppure per valutare il giusto grado di maturazione e, dunque, di definire su base obiettiva i criteri per la raccolta del frutto cercando parametri indipendenti dai fattori ambientali quali condizioni di crescita e fattori climatici [32]. Altri studi, inoltre, sono stati orientati agli aspetti immunologici delle proteine dell'uva, alcune delle quali sono ritenute responsabili di reazioni allergiche [33] ed, infine, il miglioramento delle caratteristiche qualitative del prodotto finito mediante esperimenti di ingegneria genetica è un altro filone di ricerca fra i più battuti nel settore enologico [34]. E' stata inoltre dimostrata in vitro la digeribilità e la biodisponibilità di proteine ed altri componenti estratti da buccia e semi di uva e dunque la possibilità di utilizzare questi

ultimi come ingredienti e/o alimenti funzionali, antiossidanti naturali e supplementi nella dieta [35]. Nonostante siano spesso indesiderate in quanto responsabili della formazione di torbidità e precipitati nel vino (dovuti ad una loro aggregazione, generata dalla denaturazione, che comporta formazione di sedimenti amorfi flocculati) [36], le proteine solubili del mosto rivestono comunque un ruolo tecnologico nel processo di vinificazione di alcuni particolari tipi di vini. Le glicoproteine (mannoproteine) in particolare, più che le proteine non glicosilate, giocano un ruolo prioritario nella stabilità della schiuma [37], contribuendo alla formazione del perlage e alla sua stabilità nei vini champagne [38-39], caratteristiche che dipendono in particolare dalla idrofobicità, dalla solubilità, dalla flessibilità, dal punto isoelettrico, dal peso molecolare [40].

L'uva contiene naturalmente un'ampia gamma di proteine differenti, non comparabili con le proteine degli altri frutti. Il profilo delle proteine solubili presenti nel succo d'uva però appare spesso sorprendentemente semplice, con la predominanza di poche proteine a basso peso molecolare. Ciò è dovuto molto probabilmente alla notevole difficoltà nell'estrazione e nella rilevazione delle proteine di taglia molecolare più grossa, a causa della presenza dei componenti fenolici endogeni, fenolo-ossidasi e perossidasi.

**Tabella 2.1-** Proteine solubili totali della bacca d'uva e in alcune parti della vite.

<b>Componente</b>	<b>Proteine solubili totali (<math>\mu\text{g/g}</math> prodotto fresco)</b>
Buccia	1,6
Polpa	95,6
Vinaccioli	290,0
Gambo (grappolo)	71,0
Foglia	192,0

Nel corso dell'estrazione, infatti, alcune proteine possono precipitare a causa dell'azione delle ossidasi e dei fenoli, altre ancora possono degradarsi e modificarsi senza precipitazione. Per questo motivo nel tempo sono state sperimentate e messe a punto tecniche di estrazione, ancora oggi in continua evoluzione, in grado di minimizzare l'interferenza dei componenti fenolici e degli enzimi ossidativi [41] e migliorare la solubilizzazione delle proteine sicuramente classificabili come "recalcitranti".

Le tecniche elettroforetiche si sono dimostrate molto efficaci ed utili nell'analisi delle proteine dell'uva e, in particolare, nell'applicazione degli studi tassonomici sui vitigni. Il risultato di uno studio condotto da *Moreno-Arribas et al. 1999* [42] ha confermato che con l'analisi elettroforetica è possibile accertarsi, nella maggior parte dei casi, della varietà d'uva da cui origina il mosto e che queste tecniche possono essere usate come complemento alle descrizioni morfologiche classiche per la caratterizzazione varietale dei vini.

L'analisi proteomica, con l'applicazione di elettroforesi bidimensionale accoppiata alla spettrometria di massa Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF), condotta sul mesocarpo di quattro differenti varietà di uva bianca e rossa di *Vitis Vinifera L.* e di due varietà appartenenti ad altre specie di *Vitis* (*Vitis del Rio* e *Vitis davidii*) ha permesso l'identificazione di numerose proteine coinvolte nel metabolismo energetico, nella risposta contro gli stress interni ed ambientali e nella sintesi di altre proteine [43]. L'approccio di tipo proteomico classico [44] che prevede, dunque, la separazione delle proteine in alta risoluzione e la loro successiva l'identificazione mediante analisi in spettrometria di massa dei peptidi generati dalla proteolisi in gel realizzata con enzimi ad alta specificità (Peptide Mass Fingerprinting), rappresenta un potente strumento per lo studio del proteoma delle complesse matrici alimentari e recentemente si sta estendendo anche al campo vegetale. Si tratta dunque di una tecnica di confermata affidabilità grazie anche ai progressi della spettrometria di massa che, data la sua estrema sensibilità, permette di misurare con alta accuratezza le masse dei peptidi e di identificare le proteine che li generano in quantità nell'ordine dei nano-grammi.

### 3. OBIETTIVO DEL LAVORO

Il nostro lavoro si propone l'obiettivo di caratterizzare, mediante tecniche proteomiche, il complesso delle proteine presenti nelle varie parti costituenti la bacca d'uva (buccia, polpa, vinaccioli) con l'obiettivo finale di identificare le varietà attraverso il profilo proteico, evidenziando le eventuali differenze e/o variazioni nel complesso proteico-enzimatico delle uve destinate alla vinificazione, che permetterebbero di distinguere cultivar ibride da cultivar pure di *V.vinifera*.

Ci si propone come obiettivo, inoltre, lo studio delle caratteristiche fisico-chimiche di tali proteine (specificità, *pI*, *MW*, idrofobicità, tendenza a legare gli zuccheri ed altre proprietà) cercando di offrire una tecnica di differenziazione alternativa a quella tuttora in atto. Il profiling proteico consentirebbe di disporre, infine, di una tecnica identificativa delle cultivar su base molecolare, più oggettiva e accurata rispetto alle valutazioni morfologiche comunemente impiegate, basate esclusivamente sui metodi descrittivi ampelografici.

Le conclusioni del nostro studio, dal punto di vista tecnologico, possono riguardare diversi aspetti in cui le proteine dell'uva svolgono un ruolo di primo piano. Alcuni di questi sono:

- Studio delle manno-proteine: o più in generale delle proteine glicosilate, in quanto rivestono un ruolo fondamentale nella formazione della schiuma nei vini spumante;

- Studio della maturazione della bacca: numerosi sono i cambiamenti che avvengono a carico delle proteine nel corso della maturazione, molti dei quali risultano correlati al cambiamento del colore della bacca. Sarebbe interessante trovare un marcatore molecolare di tipo proteico che indichi il giusto grado di maturazione del frutto per essere sottoposto a vinificazione;
- Studio delle proteine coinvolte nelle patologie: molte sono le proteine espresse dalla vite nel corso di un attacco fungino o di stress ambientali; sarebbe utile ricercare fra esse dei marcatori molecolari fisiopatologici che esprimano i cambiamenti in atto all'interno della bacca;
- Studio dei differenti pathway proteici-enzimatici coinvolti nei diversi processi metabolici che avvengono all'interno del frutto nel corso della sua maturazione oppure nel corso di un attacco patogeno.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 Materiale vegetale

I campioni di uva rossa analizzati nel corso del nostro studio appartengono alle varietà *Aglianico*, *Casavecchia*, *Piedirosso*, *Isabella* raccolti alla fase di maturazione commerciale (o tecnologica). Le prime tre varietà sono state coltivate nei siti di Galluccio (Caserta) e ITAS (Avellino) e raccolte nel corso delle vendemmie 2004 e 2005. I campioni della varietà *Isabella*, invece, sono stati acquistati direttamente sul mercato. Al momento della raccolta le porzioni di grappolo (mediamente 1-2 kg per porzione) sono state prelevate cercando di non danneggiare gli acini. Il campione omogeneo di ciascuna varietà è stato mantenuto separato ed analizzato indipendentemente. Tutti i campioni, inoltre, sono stati conservati evitando rotture o schiacciamento degli acini, in contenitori termici refrigerati ed una volta giunti in laboratorio, dopo essere stati analizzati per il contenuto di solidi solubili, sono stati immediatamente congelati a -20°C. Per le varietà coltivate, a partire dall'invaiatura, sono stati effettuati dei campionamenti settimanali di uva al fine di studiare l'evoluzione della concentrazione in solidi solubili totali (SST) e stabilire il momento corrispondente alla maturazione commerciale del prodotto. Tale fase è stata stabilita nel momento in cui, in prossimità della maturazione del frutto, due prelievi consecutivi di campioni non hanno riportato significative variazioni per il contenuto in SST. Per la varietà *Isabella*, il contenuto in solidi solubili è stato semplicemente

valutato al momento dell'acquisto. La concentrazione di SST, per tutti i campioni, è stata valutata mediante metodo rifrattometrico (°Brix). Delle suddette varietà sono state, infine, analizzate le frazioni proteiche estratte da buccia, polpa e vinaccioli dei campioni a maturazione commerciale.

## **4.2 Materiali chimici**

Urea, 1-propanolo, ammonio persolfato, TEMED, CBB R-250, CBB G-250, agarosio, acetonitrile sono stati forniti dalla BioRad Laboratories (Milano, Italia). Acrilammide/bisacrilammide mix, SDS, ammonio bicarbonato, CHAPS, DTT, acido iodoacetico, Trypsin TPCK-treated from bovine pancreas- sono stati provvisti dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Tris-HCl e glicina sono stati forniti dalla ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA). Blue di bromofenolo è stato provvisto dalla ESA Electrophoresis (Chelmsford, MA, USA). Iodoacetammide è stata acquistata presso la Fluka Biochemika (Milano, Italia). Glicerolo, Metanolo, Acido acetico, acetone, acido tricloroacetico sono stati forniti dalla J.T. Baker.

## **4.3 Estrazione proteica dalla bacca**

L'estrazione delle proteine dalle varie parti costituenti la bacca (buccia, polpa e vinaccioli) è stata eseguita secondo lo schema rappresentato in Figura 4.1. Le bacche

fresche sono state lavate sotto acqua corrente e pesate prima dell'estrazione. Tutte le procedure descritte in seguito sono state condotte a temperatura controllata (4°C).

Le bacche fresche sono state sottoposte a separazione manuale della buccia dalla polpa e vinaccioli, ed in seguito, questi ultimi sono stati separati dal succo e dalla polpa tramite setaccio. Le bucce, dopo lavaggio accurato con acqua deionizzata ed allontanamento dell'acqua e delle altre impurità con carta assorbente, sono state ricoperte di vitamina C e congelate a -20°C.

Le bucce congelate sono state omogeneizzate, mediante frullatore domestico, in presenza di vitamina C, fino ad ottenere una polpa morbida a cui è stata aggiunta UREA 9M nel rapporto 1:1 (p/v). Il composto è stato sottoposto ad agitazione o.n. a 4°C, in seguito alla quale è stato centrifugato a 4500 g per 10' al fine di allontanare tutte le impurità e le fibre che rappresentano il pellet. Il surnatante, invece, è stato sottoposto a precipitazione con TCA al 12% di concentrazione finale. Il precipitato, recuperato mediante centrifugazione a 12000 g per 30' e congelato a -20°C, è stato utilizzato per le successive analisi. La polpa, allontanata dai vinaccioli e costituita dal succo d'uva più la purea, è stata trattata immediatamente di vitamina C al fine di evitare eventuali fenomeni ossidazioni che potessero precludere la disponibilità delle proteine. Essa è stata successivamente sottoposta a centrifugazione a 4500 g per 15', in seguito alla quale il precipitato contenente impurità è stato allontanato, mentre il surnatante è stato sottoposto a dialisi contro acqua corrente utilizzando turbi con cut off 12000 Da per 36 h a 4°C. Questa dialisi è stata effettuata al fine di allontanare gli zuccheri dal campione. Il succo dializzato è stato sottoposto a precipitazione con

TCA al 12% di concentrazione finale. Il precipitato è stato recuperato mediante centrifugazione a 4000 g per 10'. Il pellet, ottenuto in seguito alle centrifugazioni, è stato sciolto in UREA 9M e sottoposto nuovamente a dialisi con tubi cut off 12000 Da per 4 giorni a 4°C contro acqua deionizzata al fine di allontanare l'UREA.

Al termine di questa dialisi, la polpa è stata sottoposta a liofilizzazione e così utilizzata per le successive analisi. I vinaccioli, infine, dopo essere stati accuratamente lavati con acqua corrente, sono stati essiccati all'aria o.n., ed in seguito sottoposti a trattamento con acetone ed etere dietilico.

Tale trattamento ha previsto aggiunta di acetone a temperatura ambiente ai vinaccioli nel rapporto 1:2 (p/v) ed agitazione per 24 h, ed in seguito, dopo aver allontanato l'acetone, l'aggiunta di etere di etilico (nel rapporto 1:2 p/v) ed agitazione per 1 h a temperatura ambiente. Una volta allontanato l'etere, i semi sono stati essiccati all'aria o.n. e frullati mediante frullatore domestico. Cinque grammi di polvere di vinaccioli sono stati aggiunti di 50 ml di UREA 9M e sottoposti ad agitazione over night a 4°C, ed in seguito centrifugati a 4500 g per 15'. Il surnatante, in seguito alla centrifugazione, è stato sottoposto a precipitazione con TCA al 12% di concentrazione finale. Il precipitato, recuperato mediante centrifugazione a 12000 g per 15', è stato congelato a -20°C e utilizzato per le successive analisi.

#### **4.4 Concentrazione proteica**

La concentrazione proteica degli estratti è stata determinata utilizzando il “2D Quant Kit” commercializzato dall’Amersham Biosciences, basato sul legame selettivo di ioni  $\text{Cu}^+$  alle proteine, misurando spettrofotometricamente la quantità di ione  $\text{Cu}^+$  non complessata. L’assorbanza, espressa da ciascun campione alla lunghezza d’onda di 480 nm, risulta inversamente correlata alla concentrazione proteica.

#### **4.5 Preparazione dei campioni per le analisi elettroforetiche**

Una schematizzazione della preparazione e purificazione dei campioni per le analisi elettroforetiche è riportata in figura 4.2. Gli estratti proteici da buccia, polpa e vinaccioli di uva di *Piedirosso*, *Isabella*, *Casavecchia* ed *Aglianico* sono stati sciolti, ad una concentrazione finale del 4%, in una soluzione di Urea 9M e  $\beta$ -mercaptoetanolo al 5%. Sono stati utilizzati 10  $\mu\text{l}$  della soluzione risultante per l’analisi in focalizzazione isoelettrica su gel di poliacrilammide (IEF). Per la SDS-PAGE, una quantità pari a 20  $\mu\text{g}$  di proteina della soluzione sopra descritta è stata sottoposta a purificazione mediante due sistemi: SDS-PAGE CLEAN-UP KIT (Amersham Biosciences) e precipitazione con acetone acido (5% HCl in acetone). Nel primo caso il campione, una volta purificato, è stato sciolto in 20  $\mu\text{l}$  del reattivo di O’Farrell (2,5% di Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 4% di SDS al 10%; 2% di Glicerolo all’87% (p/v); 1% di  $\beta$ -Mercaptoetanolo e tracce di Blu di Bromofenolo), nel secondo

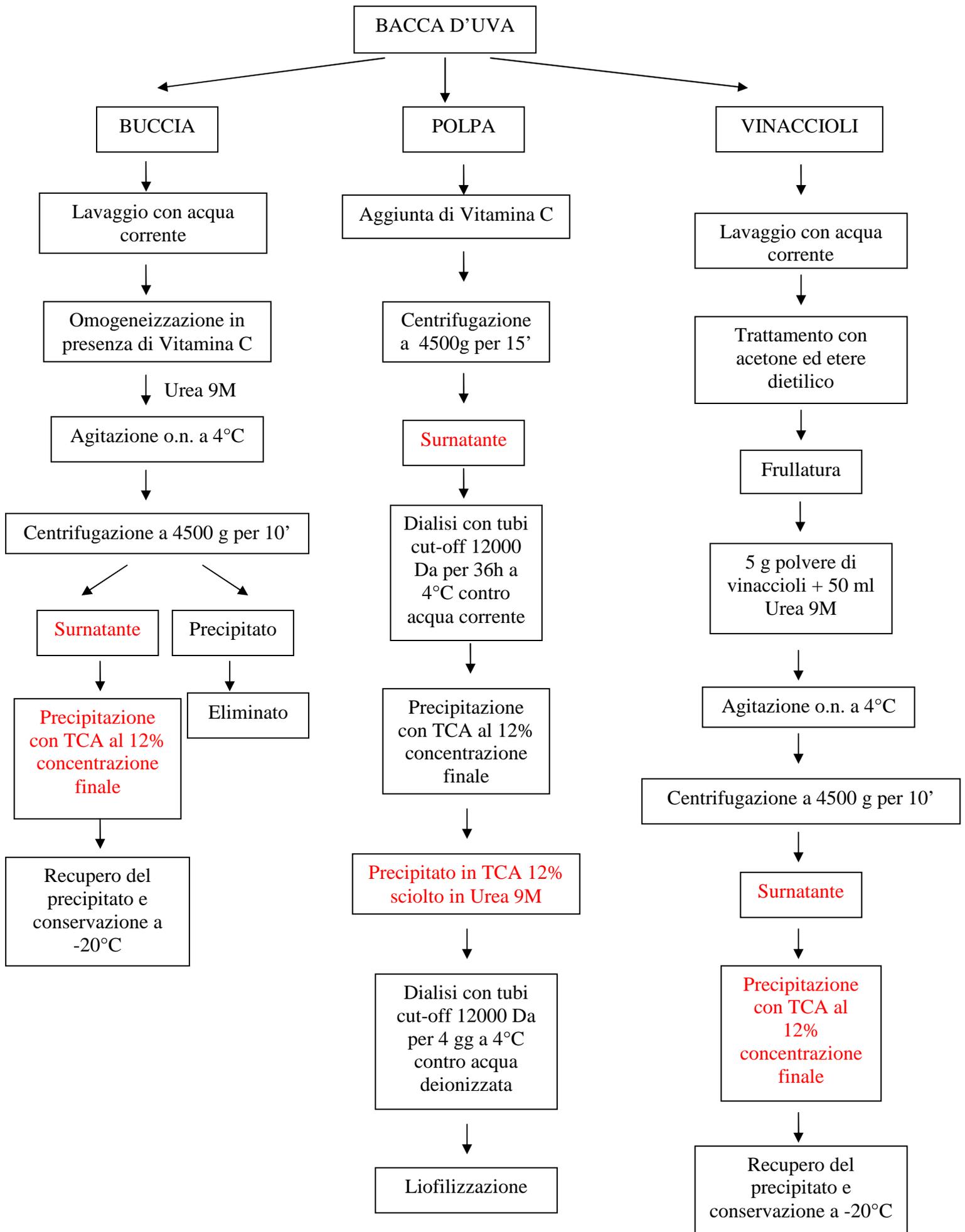
caso il precipitato ottenuto, una volta allontanato l'acetone, è stato direttamente sciolto in 12  $\mu$ l del reattivo suddetto. I campioni così preparati sono poi stati denaturati a 100°C in bagno ad acqua per 5 minuti e direttamente caricati sul gel.

Per l'elettroforesi bidimensionale (2-DE IEF/SDS-PAGE) 200  $\mu$ g degli estratti proteici da buccia e vinaccioli di tutte e quattro le varietà sono stati sottoposti a purificazione mediante diversi sistemi: "2D CLEAN-UP KIT" (Amersham Biosciences), precipitazione con acetone acido (5% HCl in acetone freddo) ed infine desalificazione mediante "PROTEIN DESALTING SPIN COLUMN" (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). In tutti e tre i casi il precipitato finale ottenuto è stato direttamente solubilizzato in 200  $\mu$ l o 400  $\mu$ l (rispettivamente per le IPG-strip da 11 o 18 cm) di una soluzione di reidratazione (Urea (8 M), Chaps (0,5-4%), DTT (0,4%), Ampholine (2%) e tracce di Blu di Bromofenolo), con cui è stata successivamente reidratata la IPG-STRIP utilizzata per la prima dimensione.

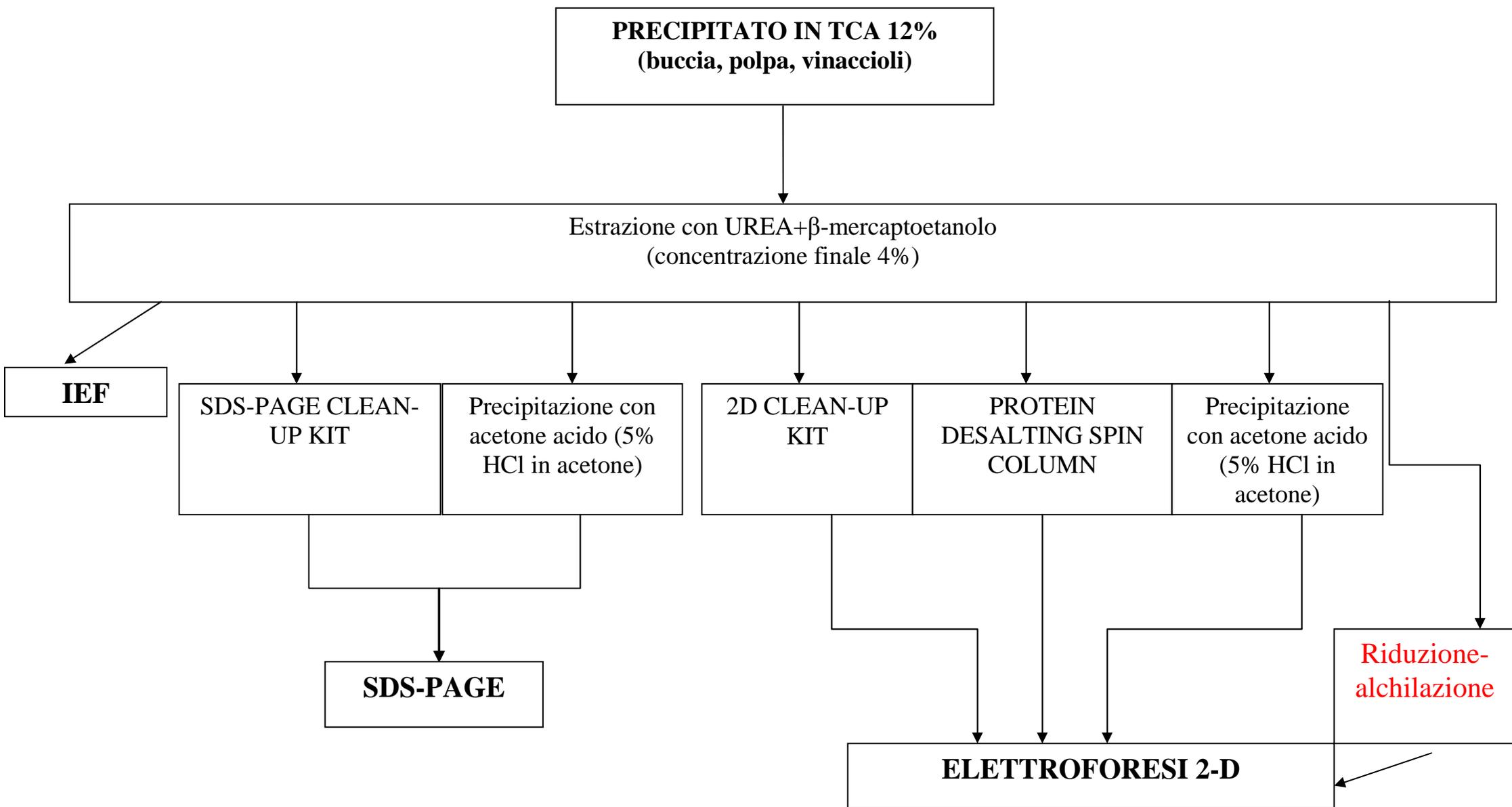
Per migliorare ulteriormente la migrazione delle proteine e dunque la risoluzione della mappa bidimensionale è stato, inoltre, applicato un protocollo di riduzione ed alchilazione delle proteine estratte prima di essere sottoposte a separazione elettroforetica 2-DE. Tale protocollo, applicato solo per le proteine estratte da buccia, ha previsto la solubilizzazione di 50 mg del precipitato al 12% di TCA in 1 ml di tampone riducente (Guanidina 6M; Tris-HCl 0.3M, EDTA 1mM, DTT 10 mM) mediante sonicazione per 30'. Successivamente il campione è stato posto in un bagnetto termostato alla temperatura di 56°C per 1h, al termine del quale è stata aggiunta in soluzione iodoacetammide alla concentrazione finale di 55mM. Il

campione è stato così riposto al buio per 1h ed, in seguito, sottoposto a cromatografia ad esclusione molecolare (PD10- Biorad), le cui frazioni che hanno dato maggiore assorbanza alla lettura spettrofotometrica ( $\lambda=215$  nm) sono state raccolte, portate a secco in savant e poi liofilizzate.

Il campione ottenuto, dopo essere stato ripreso più volte con TFA 0,1% e sciolto in UREA 9M, è stato sottoposto a quantificazione proteica. Alla quantità corrispondente a 300  $\mu$ g di proteina è stata effettuata il kit di purificazione per 2-DE e sottoposta alla procedura classica di elettroforesi bidimensionale.



**Figura 4.1** - Estrazione proteica dalle bacche



**Figura 4.2-** Procedure di trattamento dei campioni previa analisi elettroforetiche

#### 4.6 Focalizzazione isoelettrica su strato ultrasottile di poliacrilammide (IEF)

Il gel ultrasottile (0,25 cm di spessore) per la IEF è stato preparato colando un gel al 4% di acrilammide e 2% di anfoline pH 3,5-10 (Pharmacia LKB, Uppsala, Svezia) su un supporto plastico (Gel-bond, Amersham Biosciences) secondo la procedura classica descritta ampiamente in letteratura. La corsa è stata condotta su un supporto Multiphor II (Pharmacia Biotech), equipaggiato di bagno termostatico Multitemp (Pharmacia LKB, Bromma, Svezia), alla temperatura costante di 10°C applicando le condizioni elettriche riportate in tabella 4.2.

**Tabella 4.2** - Condizioni elettriche applicate per la Isoelettrofocalizzazione.

	<b>T (min )</b>	<b>V</b>	<b>mA</b>	<b>W</b>
<b>Prefocalizzazione</b>	30	2000	15	4
<b>I Focalizzazione</b>	60	2000	15	4
<b>II Focalizzazione</b>	90	3000	15	4

Al termine della corsa il gel è stato colorato seguendo la procedura di *Krause et al.* [45].

#### **4.7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE)**

L'analisi elettroforetica SDS-PAGE, è stata condotta su una camera verticale Mini-Protean (Biorad). Il gel running (o di migrazione) a pH 8,8 era al 12% di acrilammide, mentre il gel di avvio, o stacking gel a pH 8,6, era al 5% di acrilammide. La corsa elettroforetica è stata condotta a 80 Volts costanti per 10 minuti e a 160 Volt costanti fino al termine della corsa, in presenza di un tampone di corsa (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, 1% SDS). Come standard di pesi molecolari è stato utilizzato il kit Broad-Range (Biorad). I gel sono stati colorati per circa 1h con una soluzione alcolica ed acida contenente il Comassie Brilliant Blue R-250 (0,05% Comassie Brilliant Blue R-250; 30% Metanolo; 10% Acido acetico in acqua). La decolorazione è avvenuta immergendo il gel in una soluzione decolorante (7,5% Acido acetico; 5% Metanolo in acqua) e operando opportuni lavaggi con la stessa.

#### **4.8 Elettroforesi bidimensionale (IPG-IEF/SDS-PAGE)**

L'elettroforesi 2-DE classica prevede una prima separazione in base al punto isoelettrico delle proteine (pI), seguita da una seconda separazione, in base al peso molecolare (PM), in SDS-PAGE.

Le IPG-Strips (Immobiline Dry-Strip, pH 3-10 L e pH 3-5.6NL, 18 cm e 11 cm; Amersham Pharmacia, Sweden), utilizzate per la prima dimensione, sono state

reidratate in apposite scanalature di un supporto orizzontale (Immobiline Strip tray, Pharmacia Biotech), mediante soluzione di reidratazione in seguito alla quale le strips sono state sottoposte ad un campo elettrico in un sistema di isoelettrofocalizzazione (Ettan IPGphor II –Amersham Biosciences). La separazione elettroforetica in base al punto isoelettrico su IPG-strip è stata effettuata seguendo le linee guida riportate sul foglio illustrativo delle IPG-strip. Riportiamo in tabella 4.3, a titolo di esempio, le condizioni elettriche per le strip con range di pH 3-10, 11 cm.

**Tabella 4.3** - Condizioni elettriche per Immobiline DryStrip pH 3-10, 11 cm

	<b>Step Voltage mode</b>	<b>Voltage (V)</b>	<b>Time (h:min)</b>	<b>kVh</b>
1	Step and Hold	500	1:00-9:00	0.5
2	Gradient	1000	1:00	0.8
3	Gradient	6000	2:00	7.0
4	Step and Hold	6000	0:10-0:40	0.7-3.7

Le strip, dopo equilibratura, sono state successivamente poste orizzontalmente sopra il gel di poliacrilammide e bloccate con agarosio allo 0,5% in tampone di corsa (running buffer) [46-47].

La seconda dimensione è stata fatta correre in due diverse camere elettroforetiche di diverse dimensioni, l'una 16x18x0,075cm (SE 600 Series-Vertical Slab gel unit- HIS, San Francisco, California) e l'altra 25.5x20.5x0,1cm (Ettan Daltsix Electrophoresis System, Amersham Biosciences). Al termine della corsa i gel sono stati sottoposti a

diversi protocolli di colorazione, dalla classica colorazione al Coomassie Blue R-250, al nitrato di argento compatibile con la spettrometria di massa (ProteoSilver Plus Silver Stain Kit, Sigma-Aldrich St. Louis, USA), alla nuova colorazione colloidale Blue Silver con una sensibilità dieci volte superiore al Blue di Coomassie [48].

#### **4.9 Riduzione ed alchilazione delle proteine estratte dal gel**

La digestione delle proteine sul gel è stata condotta seguendo il protocollo di Shevchenko A. *et al* [49]. Gli spot proteici sui gel sono stati recisi manualmente, mediante un bisturi, posti in eppendorf e decolorati overnight con una soluzione 25 mM di ammonio bicarbonato e 50% ACN. Successivamente sono stati lavati con acqua distillata per 20 min. L'acqua è stata poi rimossa ed il gel è stato deidratato con ACN per 10 min. Una volta allontanata la soluzione, gli spot sono stati portati a secco in una centrifuga Speed-Vac per 5 min. Gli stessi sono stati poi incubati a 56°C per 60 min con una soluzione 10 mM di Ditiotreitolo (DDT) in AMBIC 25 mM. In seguito, la soluzione di DDT è stata scartata e gli spot sono stati incubati a temperatura ambiente al buio per 45 min con un soluzione di Acido Iodoacetico 55 mM in ammonio bicarbonato 50 mM pH 8.0. La soluzione è stata scartata e i pezzetti di gel sono stati lavati con acqua, successivamente deidratati con ACN e portati a secco in centrifuga speed-vac.

## 5.0a Digestione Enzimatica

Gli spot ridotti e carbossimetilati sono stati ricoperti con una soluzione di 50 mM ammonio bicarbonato, pH 8.0, contenente tripsina (12,5 ng/mL) e lasciati in ghiaccio per 45 min. L'eccesso di enzima è stato rimosso ed è stato aggiunto ammonio bicarbonato 50 mM pH 8.0. I pezzi di gel sono stati incubati overnight a 37°C. I peptidi sono stati estratti dal gel utilizzando 50%ACN e 5% acido formico per tre volte e sonicando ogni volta. Gli estratti peptidici sono stati uniti e portati a secco mediante centrifuga speed-vac. I campioni sono stati risospesi in 50 µl di una soluzione 50%ACN, 0,1% TFA e conservati per successive analisi.

Le fasi di decolorazione, riduzione/alchilazione, digestione ed estrazione dei peptidi sono state eseguite sotto una cappa a flusso laminare, al fine di evitare la contaminazione da parte della cheratina della pelle.

## **5.1a Analisi in spettrometria di massa**

### **5.1a.1 MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry)**

Gli esperimenti di spettrometria di massa sono stati condotti mediante un Voyager DE-Pro (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) provvisto di un laser a N<sub>2</sub> ( $\lambda=337$  nm; ampiezza di impulso = 3 nsec). Ciascun spettro è stato eseguito adoperando la seguente procedura: 0,5  $\mu$ l aliquota di digesto triptico estratto da ogni spot è stato caricato su una piastrina di acciaio inossidabile insieme ad 0,5  $\mu$ l di matrice organica (CHCA 10 mg in 1 mL di 50% ACN in acqua). Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modo reflector con il sistema Delay Extraction (DE) e l'accumulo di 200 impulsi laser . Il voltaggio di accelerazione è stato di 20 kV. La calibrazione esterna è stata realizzata utilizzando un kit di peptidi standard (Sigma).

### **5.1a.2 FT-ICR MS (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry)**

Gli spettri di massa mostrati sono stati acquisiti utilizzando un Bruker (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) BioAPEX II 9.4 T FT-ICR, accoppiato ad una sorgente ionica nanospray Analytica (Analytica of Branford, Branford, CT, USA). I campioni, prima dell'analisi, sono stati ridisciolti in TFA 0.1%, desalificati mediante microcolonne ZipTip™ C18 (Millipore) e iniettati mediante capillari borosilicati di medio spessore gold-coated (Proxeon, Odense Danimarca). Il voltaggio applicato al

capillare è compreso fra 400-600 V. Il periodo del tempo con cui gli ioni sono stati accumulati nell'esapolo, D1, è stato settato nel range 1-4 secondi. Il tempo durante il quale gli ioni sono stati estratti dall'esapolo e permessi di passare attraverso il sistema di lenti ottiche fino ad accumularsi nella cella analizzatore dell'FT-ICR, P2, è stato settato in un range compreso fra 3000-5000 nanosecondi. Tale parametro determina un effetto "tempo di volo" fra l'esapolo e l'analizzatore, in quanto la sua durata induce una predisposizione all'analisi delle masse a più alto o più basso peso molecolare. Un "P2" di 3000-5000 viene normalmente applicato per studiare molecole a basso peso molecolare, come appunto peptidi. I parametri della cella analizzatore, normalmente tenuti sempre costanti includono: trapping potential ("PV1" and "PV2") pari a 1.5 V (in positive mode); "dwell time" ("P3") a 12  $\mu$ s; RF attenuation for the excitation ("PL3") pari a 11,2; XBB a 200.

Gli spettri di massa sono stati raccolti e salvati a 512K ed il numero di scansioni accumulate per ciascuna acquisizione ("ns") è stato settato in un range compreso fra 40-50. Gli esperimenti di spettrometria di massa tandem mediante FT-ICR sono stati eseguiti mediante frammentazione SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-Induced Dissociation). Gli ioni isotopici a doppia carica di interesse sono stati selezionati ed isolati nella cella analizzatore mediante l'espulsione dalla stessa di tutti gli altri ioni mediante eccitazione (Correlated Sweep pulse attenuation=18000dB). Il gas di collisione (azoto) è stato introdotto nella cella mediante una valvola solenoide capace di iniettare il gas ad intervalli specifici di tempo (Pulsed Valve=960 microsecondi). In presenza del gas di collisione gli ioni

vengono eccitati “off-resonance” all’interno della cella, cioè la loro eccitazione determina un’orbita di espansione e contrazione in funzione del tempo. Durante tale movimento avvengono collisioni a bassa energia fra il gas e le particelle che determineranno la dissociazione e frammentazione dello ione parentale selezionato. Per la acquisizione ed analisi degli spettri è stato utilizzato il software Xmass 5.0 10 (Bruker).

### **5.1a.3 MALDI-Q STAR MS(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Quadrupole- time of flight mass spectrometry)**

Gli spettri MALDI-Q TOF sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro di massa ibrido quadrupolo/TOF modello Q-star Pulsar (Sciex. Orlando, Canada) equipaggiato con una sorgente SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) prodotta dalla Ciphergen Biosystem (Ciphergen ., Fremont, CA,USA ).

0.5 µl di estratto peptidico è stato posto su una piastrina di acciaio inossidabile insieme a 0.5 µl di matrice organica (CHCA 10 mg in 1 mL di 50% ACN in acqua).

La doppia o tripla carica sono state selezionate dal quadrupolo (MS1) ed indotta frammentazione mediante collisione utilizzando come gas l’azoto. L’energia di collisione variava tra i 25 e i 30V a seconda del grandezza del peptide.

#### **5.1a.4 LC/ESI-MS (Reversed-phase capillary chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry)**

Gli esperimenti di cromatografia liquida capillare a fase inversa seguita da analisi in spettrometria di massa sono stati eseguiti mediante un sistema di pompe ternario Waters CapLC collegato, attraverso una valvola-modulo stream-select, ad una sorgente nano Z-spray dello spettrometro di massa. Questo ultimo è rappresentato da uno spettrometro ibrido Q-TOF (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester, UK) equipaggiato da una sorgente nano-spray operante in modo positivo. Le condizioni di ionizzazione utilizzate sono state le seguenti: voltaggio del capillare 2.3 kV, voltaggio del cono e delle lenti RF1 pari a 30 e 100 V rispettivamente ed energia di collisione pari a 10 eV. La temperatura della sorgente è stata di 70°C, N<sub>2</sub> era il gas all'interno del cono ad una velocità di flusso di 80 l h<sup>-1</sup>; mentre non è stato utilizzato nessun gas nebulizzato per ottenere lo spray. Argon è il gas che è stato usato per frammentare gli ioni nella cella di collisione. La calibrazione esterna è stata effettuata mediante sodio iodide, per un range di massa compreso fra 50 e 3500 m/z. Tutti gli spettri sono stati acquisiti con un analizzatore TOF in "V-mode" (voltaggio D TOF 9.1 kV, voltaggio MCP 2150 V). Il campione è stato iniettato nel sistema mediante un autocampionatore CapLC ed il metodo di iniezione "microliter pickup". Come solvente A è stato utilizzato 95% H<sub>2</sub>O and 5% acetonitrile in 0.1% TFA; come solvente B 95% acetonitrile and 5% H<sub>2</sub>O in 0.1%TFA, ed infine come solvente C 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O. Il digesto proteico è stato preconcentrato e desalificato su di una precolonna (i.d.=300 µm), impaccata con una resina C<sub>18</sub> PepMap e collegata alla

pompa C mediante una valvola modulo streamselect. Lo step di preconcentrazione/desalificazione è stato effettuato a  $30 \mu\text{l min}^{-1}$  per 3 min, utilizzando la pompa C. In seguito all'accensione delle pompe A e B, alla precolonna è stato applicato un gradiente di modo da eluire il campione direttamente nella colonna analitica impaccata con una resina  $\text{C}_{18}$  PepMap (15 cm x  $75 \mu\text{m i.d.}$ ). La colonna è stata inizialmente equilibrata con 5% del solvente B, in seguito è stato applicato un gradiente lineare da 5 al 70% di B in 60 min ad una velocità di flusso di  $200 \text{ nl min}^{-1}$ , utilizzando una precolonna con una pompa alla velocità di  $1 \mu\text{l min}^{-1}$ . L'analisi TOF MS è stata condotta on-line mediante separazione cromatografia capillare del digesto triptico derivante dalla proteina nativa ed alchilata, per un range di massa compreso fra 400 -2000 m/z e ad una velocità di scansione pari a 2s per scansione. L'acquisizione dei dati è stata condotta mediante separazione cromatografia capillare del digesto triptico delle sole proteine alchilate. Una prima indagine TOF-MS è stata effettuata acquisendo masse comprese fra 400-2000 m/z al secondo, con un criterio di passaggio dall'analisi MS a quella MS/MS basato sull'abbondanza ionica e sullo stato di carica. I dati MS/MS sono stati acquisiti in u

n range compreso fra 50-2000 m/z al secondo per più di tre peptidi coeluiti e solo per ioni a doppia e tripla carica. Il passaggio dall'analisi MS/MS a quella MS è stata settata in modo che avvenisse dopo 20 s. L'energia di collisione variava automaticamente in base alla massa ed allo stato di carica dei peptidi eluiti. I dati di frammentazione sono stati confrontati con le informazioni contenute nel database NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizzando il software Mascot MS/MS Ion Search (<http://www.matrixscience.com>). Per l'interpretazione degli spettri MS ed MS/MS è stato utilizzato il software: Protein prospector (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/mspattern.htm>) e PeptIdent (<http://www.expasy.ch/tools/peptident.html>).

## 5. Risultati

### 5.1 Scelta, raccolta, conservazione e manipolazione del materiale vegetale

Il materiale vegetale di partenza su cui si è basato il nostro lavoro è rappresentato da tre varietà di uva rossa tipiche della nostra regione: *Piedirosso*, *Casavecchia* ed *Aglianico* utilizzate nella vinificazione di alcuni dei più importanti e noti vini DOC della nostra regione. Il quarto campione in esame è, invece, rappresentato da una varietà ibrida di uva rossa produttore diretto, ottenuto da un incrocio tra vite americana e vite europea, presente nel nostro paese già dal 1800 ed utilizzata “clandestinamente” sia come uva da tavola che per la vinificazione del “fragolino”, la varietà *Isabella* o più comunemente conosciuta come “uva fragola”. Obiettivo della scelta di tali campioni è quello di mettere a confronto, dal punto di vista proteomico, varietà pure di *V.vinifera* con una varietà ibrida di vite americana, per valutarne ed evidenziarne le differenze e/o le similitudini.

La raccolta di tutti i campioni (tranne che la varietà *Isabella*, acquistata sul mercato) è avvenuta a maturazione commerciale (o tecnologica), ovvero momento in cui la bacca d'uva presenta le caratteristiche di maturazione giuste per poter essere sottoposta alla vinificazione. Come già ampiamente descritto nei materiali, per stabilire il momento della maturazione corrispondente a quella commerciale è stato valutato l'andamento settimanale dei °Brix (che esprime il contenuto in solidi solubili totali -SST-) mediante metodo rifrattometrico. In dati corrispondenti ai °Brix

raggiunti alla maturazione commerciale per ciascun campione analizzato sono riportati in tabella 5.1.

L'estrazione proteica "differenziata" dalle varie parti della bacca (buccia, polpa e vinaccioli separatamente) si è basata su un protocollo di base su cui sono state effettuate opportune modifiche. Essa ha visto l'uso di un'antiossidante (vitamina C) in alcuni "punti critici" dell'estrazione, come le fasi di omogeneizzazione e congelamento, al fine di evitare eventuali reazioni di ossidazione a carico delle proteine, e l'applicazione di specifici kit o protocolli di purificazione al fine di eliminare tutte le impurità che potessero interferire con le successive analisi. La scelta di soffermare, infine, la nostra attenzione sul tessuto buccia per le identificazioni proteiche è dovuta al ruolo chiave che essa riveste nello sviluppo dei principali componenti responsabili della qualità del vino. La buccia risulta metabolicamente attiva durante lo sviluppo e la maturazione della bacca ed inoltre esso svolge anche una funzione endocrina [50]. La buccia costituisce una barriera fisica fra l'ambiente esterno ed i tessuti interni e la sua integrità rappresenta un fattore chiave nella prevenzione delle infezioni da patogeni ed è, infine, il tessuto in cui ritroviamo tutti gli enzimi coinvolti nella via metabolica di sintesi dei coloranti dell'uva rossa, ovvero gli antociani.

**Tabella 5.1** - °Brix a maturazione commerciale dei campioni analizzati

<b>Campione</b>	<b>Data Raccolta</b>	<b>Sito Raccolta</b>	<b>°Brix (SST)</b>
Aglanico	25/10/2004	ITAS Avellino	22,36
Aglanico	30/09/2005	Galluccio (CE)	22,79
Piedirosso NA	22/10/2004	Galluccio (CE)	22,97
Piedirosso AV	25/10/2004	ITAS Avellino	22,54
Piedirosso AV	30/09/2005	Galluccio (CE)	21,01
Piedirosso NA	30/09/2005	ITAS Avellino	20,05
Casavecchia	22/10/2004	Galluccio (CE)	21,45
Casavecchia	30/09/2005	Galluccio (CE)	21,65
Isabella	Data acquisto: 05/09/2004		17,0
Isabella	Data acquisto: 06/09/2005		18,21
Isabella	Data acquisto: 04/09/2006		16,33

## 5.2 Concentrazione proteica degli estratti

A partire da una quantità di campione (inteso come grappolo intero dopo scongelamento) pari ad 1 kg, la concentrazione proteica ottenuta dagli estratti da buccia, polpa e vinaccioli delle varietà *Isabella*, *Piedirosso*, *Casavecchia* ed *Aglianico* è stata determinata mediante saggio colorimetrico. I risultati sono riportati nella tabella 5.2.

**Tabella 5.2-** Concentrazione proteica degli estratti proteici da buccia, polpa e vinaccioli delle varietà *Isabella*, *Piedirosso*, *Casavecchia* ed *Aglianico*

<b>CAMPIONE</b>	<b>CONCENTRAZIONE MEDIA (mg/ml di estratto)</b>
Buccia <i>Isabella</i>	1,36
Vinaccioli <i>Isabella</i>	8,0
Polpa <i>Isabella</i>	0,81
Buccia <i>Piedirosso</i>	5,50
Vinaccioli <i>Piedirosso</i>	15,0
Polpa <i>Piedirosso</i>	N.R.
Buccia <i>Casavecchia</i>	2,9
Vinaccioli <i>Casavecchia</i>	8,0
Buccia <i>Aglianico</i>	2,15
Vinaccioli <i>Aglianico</i>	6,37

I dati ottenuti hanno evidenziato una concentrazione pressoché simile per le bucce di tutte e quattro le varietà. Lo stesso vale anche per i vinaccioli. La polpa (analizzata esclusivamente nella varietà *Isabella* e *Piedirosso*) ha presentato una bassa quantità proteica in entrambi i campioni analizzati, in taluni casi (*Piedirosso*) addirittura non rilevabile. Ciò ci ha indotto, pertanto, a focalizzare inizialmente la nostra attenzione sulle frazioni proteiche derivanti da buccia e vinaccioli, in particolare nel condurre le analisi elettroforetiche bidimensionali.

### **5.3 Analisi elettroforetica monodimensionale (1-DE)**

L'analisi elettroforetica monodimensionale preliminare, condotta mediante SDS-PAGE e IEF è stata effettuata al fine di determinare il comportamento elettroforetico delle proteine estratte e per verificare l'efficacia della strategia estrattiva, prima di passare alla classica analisi proteomica 2-DE.

#### ***SDS-PAGE (Sodio Dodecil Solfato –Poliacrilammide Gel Elettroforesi)***

L'analisi preliminare 1-DE è stata condotta su due varietà rappresentative: *Isabella*, come specie ibrida e *Piedirosso*, come rappresentante di *V.vinifera* pura. In figura 5.1 sono rappresentati i profili elettroforetici della varietà *Isabella*, prima (panel A) e dopo (panel B) purificazione mediante SDS-PAGE CLEAN-UP KIT, separati su SDS-PAGE al 12% di acrilammide. Come si osserva, il gel dopo purificazione presenta profili proteici in cui le bande sono meglio risolte e separate, indice che la purificazione ha eliminato le evidenti sbavature, dovute a composti interferenti che

possono legarsi alle proteine nel corso dell'estrazione come coloranti (fenoli, antociani) oppure grassi. I profili relativi ai campioni di buccia (Figura 5.1 linea 1 e 2), presentano una maggiore concentrazione di bande a basso peso molecolare (compreso fra 21 e 31 kDa) e minori quantità proteiche a pesi molecolari più alti (fra 66 e 97 kDa). Il profilo relativo ai vinaccioli (Figura 5.1 linea 3) è, invece, chiaramente più ricco di bande, distribuite lungo tutto il range di pesi molecolari (fra 21 e 97 kDa). In figura 5.2 sono riportati i profili elettroforetici, dei campioni estratti dalle varietà *Isabella* e *Piedirosso*. In tal caso i campioni sono stati caricati direttamente dopo procedura di purificazione. Nei profili relativi alla polpa (Figura 5.2 linea 1 e 2) di entrambe le varietà, non si osserva alcuna banda, dato confermato dalla concentrazione proteica pressoché nulla nella polpa. A parità di concentrazione (20 µg) i vinaccioli di *Piedirosso* risultano meno ricchi di bande rispetto alla *Isabella* (Figura 5.2 linea 4 e 3), mentre per le bucce i profili delle due varietà risultano praticamente identici ed inaspettatamente poveri in bande proteiche (Figura 5.2 linea 6 e 7).

### ***IEF (Isoelettrofocalizzazione)***

Alla separazione elettroforetica in base al peso molecolare è seguita un'investigazione sul comportamento delle proteine in oggetto, in base al loro punto isoelettrico, mediante isoelettrofocalizzazione su gel ultrasottile di poliacrilammide nel range di pH 3-10. In figura 5.3 sono riportati i profili elettroforetici di buccia, polpa e vinaccioli delle due varietà. In entrambe le cultivar si osserva che le proteine estratte dalla buccia (Figura 5.3 linea 1,2,3 e 4) presentano bande focalizzate

prevalentemente nella zona acida del gel (pH 3-4.5 circa). Il profilo proteico della buccia del *Piedirosso* (Figura 5.3 linea 3 e 4) mostra, inoltre, qualche banda a pH compreso fra 5 e 7, che nella varietà *Isabella* (Figura 5.3 linea 1 e 2) non si evidenziano. Il numero di bande proteiche rilevate mediante IEF, in generale, è comunque più elevato di quanto evidenziato con SDS-PAGE. Per ciò che riguarda i profili relativi alla polpa (Figura 5.3 linea 5 e 6), coerentemente con i dati SDS-PAGE e di quantificazione spettrofotometrica, in entrambe le cultivar si osserva un minimo contenuto proteico, ritenuto poco significativo. Infine i profili relativi ai vinaccioli sia di *Piedirosso* (Figura 5.3 linea 8 e 9) che di *Isabella* (Figura 5.3 linea 7) risultano ricchi di bande focalizzate lungo tutto il range di pH.

#### **5.4 Analisi elettroforetica bidimensionale (2-DE)**

##### ***Varietà Isabella (uva Fragola)***

L'analisi elettroforetica bidimensionale è stata inizialmente condotta solo sulla varietà *Isabella* al fine di mettere a punto una strategia efficace di separazione. In seguito la tecnica è stata applicata alle altre varietà con lo scopo di individuare eventuali analogie e/o differenze fra le mappe, prima di procedere con le identificazioni degli spot mediante spettrometria di massa.

In Figura 5.4 sono riportate le mappe bidimensionali relative ai campioni di vinaccioli di *Isabella*. Il range di pH applicato per la prima dimensione in entrambe le mappe è 3-10, ciò che varia è la percentuale di acrilammide nella seconda dimensione

che in Figura 5.4-A è al 10% ed in Figura 5.4-B al 12%. In questa ultima figura si osserva che vi è un numero maggiore di spot a basso peso molecolare (*range* compreso fra 6-21 kDa) che in Figura 5.4-A sono evidentemente persi a causa della bassa porosità del gel. La mappa dei vinaccioli risulta comunque uniformemente ricca di spot. Le mappe relative alla buccia di *Isabella* sono riportate in Figura 5.5-A dove la prima dimensione è stata condotta nel range di pH 3-10 mentre in Figura 5.5-B nel range 3-5.6. Le due mappe si differenziano inoltre anche per la seconda dimensione: in Figura 5.5-A è al 10% mentre in Figura 5.5-B è al 12% di acrilammide. In questo caso la separazione degli estratti proteici è stata realizzata anche variando il range di pH in quanto la grande maggioranza degli spot proteici era localizzata in range di pH (acido) relativamente ristretto. È evidente che la migliore separazione per le bucce è stata ottenuta applicando un range di pH più stretto, in quando esse contengono proteine prevalentemente acide ed applicando una porosità più alta che permette una migliore visualizzazione delle proteine sulla mappa. Tuttavia anche nel caso della separazione nel range di pH 3-10 in prima dimensione gli spot proteici sembrano essere completamente separati. Pertanto, ai fini di un confronto diretto fra le proteine della buccia e quelle dei vinaccioli, si è scelto di impiegare negli esperimenti successivi, la separazione IEF su range di pH 3-10.

### ***Varietà Isabella e Piedirosso***

In figura 5.6 è stato riportato un primo risultato di separazione mediante 2-D delle proteine della buccia estratte dalla varietà *Piedirosso* ed un primo confronto con la varietà *Isabella*, entrambe separate in prima dimensione nel range di pH 3-5.6 ed in

seconda dimensione mediante SDS-PAGE al 12% di acrilammide. In questo caso sono mostrate le mappe bidimensionali colorate all'argento (Silver stain). Nella mappa del *Piedirosso* (Figura 5.6-B) si osserva una ricchezza di spot a basso peso molecolare e lungo tutto il range di pH (6-21 kDa; pH 3-5), che non si osserva nella mappa della *Isabella* (Figura 5.6-A). Nella varietà *Piedirosso*, inoltre, si evidenziano spot a più alto peso molecolare (66-97 kDa) completamente assenti nella mappa della *Isabella*. Anche se la colorazione all'argento ha una elevata sensibilità nel rilevamento delle proteine sul gel (cento volte più sensibile rispetto alla colorazione al Blue di Comassie R-250) [51], essa è stata successivamente sostituita, nella colorazione delle mappe 2-DE, con la colorazione blue Silver, che è risultata molto più rapida nella preparazione, oltre che più riproducibile, ed è dotata comunque di un'ottima sensibilità (dieci volte superiore alla colorazione al Blue di Comassie R-250) [48]. Questa preferenza è dovuta al fatto che la colorazione all'argento impiegata comunemente per le analisi in spettrometria di massa non prevede l'uso della glutaraldeide, la quale agisce aumentando il contrasto fra gli spot ed il rumore di fondo del gel. La sua assenza nel protocollo di colorazione, pertanto, determina un peggioramento nella risoluzione delle mappe. La colorazione al Blue Silver è stata applicata nel rivelamento degli spot proteici sulle mappe bidimensionali rappresentate in Figura 5.7, con pH 3-10 in prima dimensione, dove sono rappresentate le proteine da buccia di *Isabella* (Figura 5.7-A) e quelle estratte da buccia di *Piedirosso* (Figura 5.7-B). Rispetto alle mappe raffigurate in Figura 5.6, in questo caso, le differenze fra le due varietà sono più facilmente rilevabili. La presenza elevata di spot a basso peso

molecolare del *Piedirosso* risultano ancora più evidenti, come anche la presenza dello spot a peso molecolare di circa 66 kDa nella mappa del *Piedirosso* e visivamente assente nella *Isabella*.

***Varietà Isabella, Piedirosso, Casavecchia, Aglianico (bucce)***

A questo primo confronto fra le due varietà sopra citate, è seguita un'analisi più ampia che ha incluso, oltre alle proteine estratte da buccia delle varietà *Aglianico* e *Casavecchia*, anche l'analisi delle proteine estratte da vinaccioli di tutte e quattro le varietà esaminate.

In figura 5.8 sono riportate le mappe 2-DE di bucce estratte da *Aglianico* (Figura 5.8-A); *Casavecchia* (Figura 5.8-B); *Piedirosso* (Figura 5.8-C); *Isabella* (Figura 5.8-D), ottenute da una corsa elettroforetica realizzata in contemporanea, al fine di avere un confronto diretto fra le quattro varietà. La prima dimensione ha previsto una separazione nel range di pH 3-10, mentre la seconda dimensione è stata un SDS-PAGE al 12% di acrilammide; la quantità proteica caricata è pari a 250 µg; il rilevamento degli spot sul gel è stato ottenuto mediante colorazione al Blue Silver. Confrontando le quattro mappe, si osserva che lo spot a peso molecolare di circa 66 kDa e *pI* di circa 4.5-5 risulta molto intenso nella mappa del *Casavecchia* e dell'*Aglianico*, mentre nel *Piedirosso* è meno evidente, come anche nella *Isabella* (nella cui mappa precedente era completamente assente) è lievemente accennato. Segue poi una zona centrale di spot, di peso molecolare intermedio (fra 21 e 31 kDa circa) e punto isoelettrico intorno a 5-6 che è pressoché comune a tutte e quattro le varietà, anche se con diverse intensità e con qualche variazione. A parità di

concentrazione, infatti, gli spot di tale zona risultano più intensi nella varietà *Casavecchia*, seguita poi dal *Piedirosso* ed *Aglianico* (con intensità molto simile). In ultimo troviamo la *Isabella* nella cui mappa tale zona risulta meno intensa e meno ricca di spot rispetto alle altre. In questa ultima varietà ritroviamo due spot ben evidenti (P.M. intorno a 26-27 kDa e *pI* circa 7) che nelle altre varietà risultano assenti. Inoltre anche nella mappa del *Casavecchia* si osservano tre spot con stesso peso molecolare (intorno a 33 kDa) e diverso *pI*, spostato verso la zona basica (intorno a 6.5-7), assenti nelle altre varietà. Passando ad esaminare, infine, le zone a più basso peso molecolare (fra 6-21 kDa), colpisce la abbondanza di spot nella varietà *Piedirosso* rispetto a tutte le altre varietà, che comunque presentano, chi più chi meno, spot in questa zona. Per questi gel la preparazione dei campioni ha previsto una purificazione mediante precipitazione con acetone acido, che pur allontanando gran parte degli interferenti, ha comunque prodotto spot proteici che lasciano strisciature verticali, indice della presenza di ulteriori impurezze.

Per questo motivo è stato applicato un protocollo di preparazione dei campioni che ha previsto un processo di riduzione e carbossimetilazione del campione previa reidratazione della strip (differentemente dalla procedura classica, che vede la riduzione e carbossimetilazione del campione sulla strip stessa). In Figura 5.9 troviamo raffigurate le bucce delle quattro varietà separate nelle medesime condizioni della Figura 5.8. Chiaramente si osserva, rispetto alle bidimensionali rappresentate in questa ultima figura, un miglioramento nella separazione e nella risoluzione degli spot ed assenza di strisciature verticali. Ciò consente una migliore visualizzazione

delle zone centrali dei gel, consentendoci di esaminare ancor meglio tutti quegli spot con stesso peso molecolare e diverso punto isoelettrico, rappresentanti le diverse isoforme di una medesima proteina.

### ***Varietà Isabella, Piediroso, Casavecchia, Aglianico (vinaccioli)***

Passando ad esaminare le mappe delle proteine estratte dai vinaccioli delle quattro varietà (Figura 6.0), è evidente la ricchezza di proteine presenti lungo tutto il range di pH 3-10, sia ad alti che a bassi pesi molecolari. Osserviamo che la zona compresa fra 21 e 45 kDa ( $pI$  compreso fra 4.5 e 6.5) risulta pressoché comune a tutte le cultivar, con un agglomerato di proteine a peso molecolare di circa 39 kDa e  $pI$  di circa 5. Mantenendoci sempre su pesi molecolari alti (fra 45 e 66 kDa), ma spostandoci verso la zona basica, si osservano una serie di spot, a pH compreso fra 7-8, molto evidenti nelle varietà *Casavecchia* (Figura 6.0-B) e *Piediroso* (Figura 6.0-C), mentre sono lievemente accennati nella varietà *Aglianico* (Figura 6.0-A), assenti invece nella *Isabella* (Figura 6.0-D). Altra zona comune a tutte e quattro le varietà è rappresentata dalla zona altamente basica ( $pI = 10$ ) dove ritroviamo proteine lungo tutto il range di pesi molecolari. A pesi molecolari intermedi (31 kDa circa) e pH basico (fra 6 e 7.5) si osservano tre spot molto intensi nella mappa dell'*Aglianico*, lì dove nel *Casavecchia* e nel *Piediroso* sono lievemente accennati, mentre nella *Isabella* sono completamente assenti. La zona che invece caratterizza e differenzia le quattro varietà è invece a basso peso molecolare (intorno a 16-17 kDa) e a pH basico (fra 6 e 10 come  $pI$ ). Qui ritroviamo una serie di spot adiacenti l'uno all'altro e disposti su due file nella varietà *Isabella*; presenti solo in parte (disposti cioè su un'unica fila)

nella varietà *Piedirosso*; nell'*Aglianico* sono invece presenti solo gli spot con *pI* più basici, nella varietà *Casavecchia* tali spot risultano completamente assenti.

## 5.5 Analisi proteomica

### *Peptide Mass Fingerprinting (PMF)*

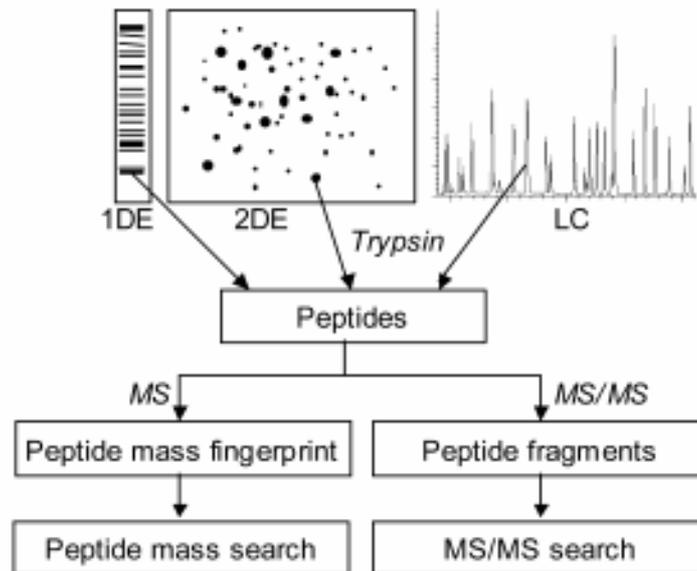
La tecnica di analisi proteomica, finalizzata all'identificazione delle proteine separate sul gel 2-DE mediante tecniche di spettrometria di massa, previa digestione degli spot *in situ* con enzimi ad alta specificità di taglio (nel nostro caso tripsina), è stata condotta esclusivamente sulle mappe bidimensionali delle proteine estratte dalle bucce delle quattro varietà esaminate. La proteomica prevede, secondo lo schema rappresentato in Figura 5.5.1, un primo approccio definito "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF). Esso consiste essenzialmente nella misura delle masse molecolari dei peptidi ottenuti dalla digestione enzimatica (generalmente triptica) delle proteine separate per via elettroforetica. L'insieme delle masse peptidiche derivanti da ogni specifica proteina è assolutamente caratteristico, e consente di identificare in maniera univoca la proteina originaria.. L'insieme delle masse dei peptidi rappresenta, infatti, una vera e propria "impronta digitale" della proteina che permette, nella maggior parte dei casi, l'identificazione della stessa comparando le masse peptidiche misurate con le masse peptidiche teoriche delle proteine presenti in banche dati disponibili on-line. Il confronto viene effettuato mediante appositi software dotati di algoritmi capaci di correlare le masse peptidiche inserite con i frammenti proteici derivanti dall'idrolisi *in silico* di sequenze presenti in banche dati

proteiche o di traslazione genica. Il PMF generalmente viene realizzato misurando le masse molecolari dei peptidi impiegando la tecnica di spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight), grazie alla particolare attitudine della sorgente di ionizzazione MALDI ad effettuare analisi di molecole in miscela. La ionizzazione MALDI, infatti, genera quasi esclusivamente ioni monocaricati ( $M+H^+$ ) semplificando notevolmente l'interpretazione dello spettro rispetto ad altre tecniche di ionizzazione "soft" (electrospray).

La tecnica di analisi MALDI-TOF è rapida, affidabile, facile da eseguire, sensibile (ordine dei fmol), accurata, relativamente tollerante a diversi contaminanti e può essere automatizzata [52]. Nel nostro caso, il PMF è stato condotto anche con la tecnica FT-ICR MS (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) che è, fra tutte le diverse tecniche di spettrometria di massa, quella caratterizzata dalla più alta risoluzione ed accuratezza nella misura della massa molecolare (dell'ordine inferiore o uguale ad 1 ppm) e, negli ultimi anni, grazie ai miglioramenti nel design della cella analizzatore e nella forza del campo magnetico, sta assumendo un ruolo sempre più di primo piano nello studio delle molecole biologiche e nel campo della proteomica [53].

Pur essendo un'analisi il più delle volte efficace, il PMF, non è spesso sufficiente per l'identificazione delle proteine. In particolare, il PMF può fallire quando la sequenza proteica in esame non è presente nei vari data-base, oppure la proteina è ricavata dalla traslazione della sequenza nucleotidica, non consentendo di tener conto di eventuali fenomeni di splicing alternativo dell'm-RNA, modificazioni post-traduzionali e

esistenza di diverse isoforme proteiche. Tuttavia, per organismi il cui genoma è parzialmente o totalmente non caratterizzato si può procedere confrontando le sequenze delle proteine in oggetto con proteine derivanti da sequenze genomiche di specie filogeneticamente vicine, permettendo l'identificazione finale della proteina per omologia.



**Figura 5.5.1** – Comune procedura per l'identificazione di proteina mediante spettrometria di massa.

Nonostante quanto detto, in alcuni casi la tecnica di PMF è intrinsecamente limitata per l'identificazione proteica ed è pertanto richiesto il sequenziamento *de novo* di parti della proteina, che viene realizzato con la tecnica Tandem MS (detto anche MS/MS) utilizzando strumenti a doppio analizzatore. Il *de novo sequencing* prevede l'isolamento di uno ione peptidico derivante dalla digestione enzimatica della proteina, sfruttando il primo analizzatore dello strumento (in genere un quadrupolo), la frammentazione dello ione in fase gas in una cella di collisione opportuna e la separazione degli ioni frammento con il secondo analizzatore. I peptidi generalmente

frammentano secondo regole ben precise e note, in particolare lungo lo scheletro peptidico. Le informazioni contenute in uno spettro MS/MS permettono una rapida e chiara identificazione del peptide frammentato, in quanto dall'analisi delle masse molecolari dei frammenti ottenuti è possibile ricostruire la sequenza specifica del peptide e quindi risalire alla "proteina parente" che lo ha generato (shotgun proteomic). Spesso la miscela di peptidi può essere sottoposta a cromatografia prima dell'analisi MS o MS/MS (LC/MS e LC-MS/MS); la preventiva separazione dei peptidi previene fenomeni di soppressione del segnale che limitano di avere "coverage" estensivi della proteina. [54].

Nel nostro caso il PMF non ha consentito un'identificazione affidabile delle proteine, ma ci ha permesso esclusivamente di effettuare uno screening preventivo delle masse dei peptidi triptici e di ottenere una iniziale conferma sulla riproducibilità della separazione delle proteine sui gel. La limitatezza delle banche dati per quanto riguarda le proteine di origine vegetale, in particolare da *V. vinifera* ci hanno portato ad identificare solo alcuni degli spot presenti sulle mappe proteiche, applicando la sola analisi MS/MS, sequenziando uno o più peptidi. Quelle vegetali sono, infatti, proteine che, per la loro struttura, composizione e per la matrice in cui si trovano, sono altamente recalcitranti (instabili o insolubili nella gran parte dei tamponi comunemente impiegati), pertanto risultano molto difficili da estrarre, isolare e dunque identificare. Nel caso specifico di *V. vinifera*, anche dal punto di vista genomico, molto poco è stato fatto per caratterizzare le proteine della bacca d'uva e gli enzimi che concorrono alla sintesi dei comuni metabolici secondari. Se solo

consideriamo, a titolo esemplificativo, un confronto del numero di proteine identificate di *V. vinifera* con quelle di *A. thaliana*, una delle specie vegetali il cui DNA, ad oggi, è stato quasi del tutto sequenziato, si osserva una netta differenza: la prima specie conta 556 proteine contro 50035 proteine identificate della seconda (data-base Swiss-prot/TrEMBL - [www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

L'identificazione delle proteine potrebbe essere ulteriormente complicata da fattori quali la presenza di modificazioni post-traduzionali o di isoforme derivanti da varianti proteiche.

### ***PMF mediante analisi MALDI-TOF***

In figura 6.1 ritroviamo, a titolo di esempio, la mappa 2-DE relativa al campione di proteine estratte dalla buccia di uva *Isabella* separata nel range di pH 3-10 in prima dimensione e in SDS-PAGE al 12% in seconda dimensione (Fig. 6.1-A) e le masse MALDI-TOF dei peptidi triptici relative agli spot 1, 2, e 3 (Fig. 6.1-B). In giallo sono contrassegnate le masse peptidiche, comuni ai tre spot. In figura 6.2 sono riportati, a titolo dimostrativo, gli spettri MALDI-TOF relativi agli spot 1, 2, e 3. La qualità degli spettri di massa MALDI-TOF delle miscele peptidiche è elevata in termini di sensibilità e risoluzione, ma il PMF, condotto utilizzando la lista delle masse derivate dagli spettri, non ha fornito identificazioni statisticamente significative. Il numero rilevante di masse peptidiche comuni suggerisce che i tre spot sono strettamente correlati e potrebbero rappresentare la medesima proteina, con minori differenze derivanti da sostituzioni amminoacidiche o modificazioni quali la fosforilazione, che ne alterano il *pI* e non influenzando il peso molecolare.

### ***PMF mediante FT-ICR***

La comparazione delle mappe elettroforetiche 2-DE di due diverse varietà, *Isabella* e *Piedirosso* è stata condotta inizialmente mediante Peptide Mass Fingerprinting con la tecnica FT-ICR; le miscele proteiche estratte dalle bucce sono state separate in prima dimensione nel range di pH 3-10 ed in seconda dimensione in SDS-PAGE al 12%. La stretta analogia fra i pattern proteici è chiaramente osservabile dalla presenza di spot che presentano pI e MW pressoché identici; la presenza negli spettri FT-ICR MS di un elevato numero di masse peptidiche comuni, fra spot in analogia posizione, conferma l'identità delle proteine che si presentano in entrambe le due varietà di uva. In figura 6.3 sono state riportate le mappe delle due varietà, *Isabella* (Figura 6.3-A) e *Piedirosso* (Figura 6.3-B), in cui sono contrassegnate tre zone comuni ad entrambe definite zona A, zona B, Zona C, racchiudenti ciascuna un certo numero di spot. Le tre tabelle sottostanti, ciascuna per ogni zona evidenziata, riportano, invece, le masse peptidiche degli spot digeriti con tripsina e misurate mediante spettrometria di massa FT-ICR. In giallo sono state evidenziate le masse peptidiche comuni agli spot appartenenti alla stessa zona e derivanti dalle due varietà. Come detto, ciò conferma che le due varietà hanno sostanzialmente diverse proteine in comune. Inoltre le poco significative differenze osservate devono essere attribuite a sostituzioni amminoacidiche e/o modificazioni quali la fosforilazione, che alterano il *pI* dell'isoforma proteica e non influenzano in maniera apprezzabile il peso molecolare. A titolo rappresentativo, in figura 6.4 è riportato lo spettro FT-ICR MS della miscela di digestione triplica *in gel* dello spot BP2 del *Piedirosso* ed in figura 6.5 lo spettro di

frammentazione SORI-CID relativo allo ione selezionato 881,41 m/z. Nonostante l'alta qualità tecnica degli spettri in termini di risoluzione ed accuratezza della massa l'analisi PMF condotta sulla base dei dati FT-ICR non è stata risolutiva ai fini dell'identificazione delle proteine.

### ***Identificazione proteica mediante LC-ESI-Q-TOF (MS/MS analisi)***

La tecnica Tandem MS, eventualmente accoppiata a strategie altamente risolutive di separazione, come la cromatografia HPLC è in grado di fornire informazioni aggiuntive rispetto alla sola misura della massa molecolare. La frammentazione di specifici ioni peptidici porta ad un ulteriore set di masse molecolari (relative ai frammenti) o ad intere sequenze amminoacidiche. Queste informazioni sono altamente specifiche e con l'ausilio di appositi motori di ricerca aumentano notevolmente la possibilità di identificazione proteica rispetto al solo PMF.

Nel nostro caso l'analisi Tandem MS sulle miscele peptidiche è stata effettuata mediante due diverse tecniche di Tandem MS, ovvero MALDI-Q STAR e nanoLC/ESI-Q-TOF, solo sulle mappe 2-DE relative alle proteine estratte da bucce delle varietà *Isabella*, *Casavecchia*, *Piedirosso* ed *Aglianico*. La tecnica in questo caso si è dimostrata efficace nell'identificazione gli spot proteici più rappresentativi e che mostrano una maggiore variazione fra le quattro varietà. In tabella 5.1 sono riportati i punti isoelettrici, le masse molecolari, lo score fornito dal motore di ricerca MASCOT e le sequenze dei peptidi relativi agli spots identificati come invertasi vacuolare (AAB47171.1), classe IV endochitinasi (AAB65777.1), taumatina

(CAB85636.1), osmotina (CAA71883.1),  $\beta$ -glucanasi (CAB60154.1) e fattore di trascrizione putativo (AAK69513.1).

In figura 6.6 sono riportate le mappe 2-DE delle proteine estratte da buccia delle quattro varietà mostranti gli spot identificati e riportati in tabella 5.1.

## 6. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni la ricerca nel campo della viticoltura si è proposta, come obiettivo principale, la definizione delle caratteristiche e dell'identità del prodotto, mediante la determinazione di parametri strettamente correlati all'origine della materia prima. Pertanto l'attenzione della ricerca vitivinicola è stata focalizzata sul conferimento e sull'accertamento della qualità della materia prima, che si ripercuote sulle caratteristiche qualitative e di sicurezza del prodotto finito. A titolo di esempio, in molti paesi la produzione e la commercializzazione di vini prodotti con varietà di uva differenti dalla specie *Vitis vinifera* pura è attualmente proibita.

L'incremento della qualità del vino da parte dei produttori e l'accresciuta richiesta, da parte del mercato, di prodotti di elevato contenuto qualitativo sono alla base della necessità di definire parametri oggettivi per valutare la qualità del prodotto finito e delle materie prime, ma anche di identificare i vitigni e le relative zone geografiche di provenienza.

Per la caratterizzazione varietale delle uve sono stati sviluppati metodi di identificazione su base genetica (DNA) che hanno quasi del tutto soppiantato le valutazioni semi-empiriche di tipo ampelografico. Su base proteica la ricerca si sta dirigendo sulla catalogazione di isoenzimi quali marcatori molecolari di specie. Anche i metaboliti secondari della *Vitis sp.* [55], rappresentati da terpeni e terpenoli, metossipirazine, componenti volatili dello zolfo, benzenoidi, nor-isoprenoidi e polifenoli, sono molecole strettamente legate alla varietà, anche se non indispensabili

per la sopravvivenza della pianta; inoltre, la loro struttura e il contenuto relativo risultano essere notevolmente influenzati da fattori ambientali e climatici [56-57].

Lo studio del profilo antocianinico di diverse varietà d'uva appartenenti sia a varietà ibride che a varietà pure di *V. vinifera* si è rivelato un utile strumento per la caratterizzazione e la determinazione dell'origine del prodotto e l'identificazione di possibili adulterazioni. In uno studio di *Mazzuca et al. 2005* [58], inserito nell'ottica di valorizzazione e caratterizzazione delle uve autoctone campane, le antocianine glicosidiche di uve tipiche sono state caratterizzate con tecniche complementari di spettrometria di massa, con lo scopo di distinguere cultivar di *V. vinifera* da cultivar ibride di uva rossa. In particolare, è stata messa a punto una tecnica cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa finalizzata alla determinazione di 3,5-O-diglucosidi e loro derivati di acilazione quali marcatori molecolari di uve ibride. Questi metaboliti, infatti, sono pressoché assenti in uve di *V. vinifera* pura.

Le tecniche classiche di ricerca delle specie diglucosidiche basate sulla determinazione spettrofotometrica non sono infatti adeguate per la ricerca di tali specie e anche tecniche più avanzate quali HPLC accoppiata alla Diode Array Detection (DDA) mancano della specificità e della sensibilità in grado di caratterizzare le specie ibride in cui il carattere distintivo è stato "diluito" nel corso delle generazioni successive della specie vegetale in esame.

La definizione di pattern metabolici caratteristici implica la presenza di corredi enzimatici cultivar-dipendenti e questo è stato il principale presupposto da cui questo lavoro di tesi ha preso inizio.

Per quanto detto l'obiettivo principale dello studio del proteoma della bacca d'uva, a diversi stadi di maturazione oppure quello espresso da diverse varietà d'uva a uno stesso stadio di maturazione, era quello di identificare marcatori molecolari di origine proteica, per la definizione oggettiva delle cultivar.

Il nostro lavoro, che si inserisce in questa ottica, ha avuto come obiettivo principale lo studio e la caratterizzazione del proteoma estratto in maniera "differenziata" (cioè da buccia, vinaccioli e polpa separatamente) espresso da tre varietà di uva rossa, usate per la vinificazione, tipiche della nostra regione (*Aglianico*, *Piedirosso del Vesuvio*, *Casavecchia*) paragonandolo con una varietà ibrida di vite americana, la varietà *Isabella* (o più conosciuta come *uva Fragola*), molto conosciuta e commercializzata nel nostro paese.

L'estrazione proteica dai tessuti vegetali in esame è stata resa complessa da una serie di fattori che rendono le proteine vegetali e, in particolare, quelle dell'uva altamente recalcitranti. Le cellule vegetali contengono, infatti, una serie di componenti che possono interferire con l'estrazione, la separazione e la purificazione delle proteine ed, in particolare, la bacca d'uva risulta essere molto ricca di queste sostanze interferenti: tannini, terpeni, fenoli, antociani (soprattutto per l'estrazione delle proteine dalla buccia) ed ossidasi, nel corso dell'estrazione, possono facilmente legarsi alle proteine, farle precipitare o rendere indisponibili parte di esse; così come la presenza di zuccheri e di specie glucosidiche complica le procedure di liofilizzazione. Inoltre i trattamenti termici, che possono promuovere reazioni di coupling (ad es. reazione di Maillard) fra le proteine e gli zuccheri e la scarsa

solubilità delle proteine in esame in solventi compatibili con l'analisi proteomica, hanno condizionato non di poco l'efficienza di estrazione. Si può affermare, pertanto, che non esistono ancora specifici protocolli di estrazione e separazione proteica dai tessuti vegetali "isolati". A queste difficoltà si aggiunge infine la scarsità di informazioni e la povertà delle banche-dati proteiche per ciò che concerne le proteine dell'uva hanno notevolmente limitato l'identificazione degli spot proteici isolati per via elettroforetica.

Tra le proteine da noi identificate nelle mappe bidimensionali degli estratti di bucce delle quattro varietà sono stati ritrovati fattori di trascrizione, proteine legate al metabolismo glucidico e, più prevalentemente, una buona parte delle proteine definite "pathogenesis related" (PR) ovvero proteine espresse dalle piante in particolari condizioni di stress. È interessante osservare che in tutte le varietà, *Aglianico*, *Piedirosso del Vesuvio*, *Casavecchia* e *Isabella*, è presente la sequenza di spot a MW= 31 kDa identificati come classe IV endochitinase, mentre gli spot identificati come osmotina (MW=23,8 kDa) e thaumatin-like protein (MW=24,05 kDa) sono stati ritrovati solo nelle mappe del *Piedirosso del Vesuvio* e del *Casavecchia*. La  $\beta$ -glucanase (MW=37,45 kDa) è invece presente esclusivamente nella mappa del *Casavecchia* così come i due spot identificati come putative transcription factor (MW= 16,7 kDa) sono indicati solo nella mappa della *Isabella*. Lo spot, infine, con massa molecolare di circa 71,5 kDa ed identificato come vacuolar invertasi è stato ritrovato in tutti i campioni, espresso però in diversi rapporti quantitativi.

Recentemente molte proteine espresse alla maturità tecnologica della bacca d'uva sono state identificate mediante con il classico approccio proteomico basato su elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa [32-75]; comunque, gli studi di natura proteomica in questo campo sono stati condotti solo sull'intero frutto e non facendo la distinzione fra polpa, semi e buccia. Tuttavia i tre tessuti differenziati presentano le maggiori differenze nella composizione e nella struttura.

Lo studio del proteoma "differenziato" sui tre tessuti che compongono la bacca d'uva è stato, infatti, l'obiettivo principale del nostro lavoro, al fine di poter osservare differenze, in maniera più consistente e rilevante, fra le cultivar analizzate. La scelta di soffermare la nostra attenzione sul tessuto buccia per le identificazioni proteiche è dovuta al ruolo chiave che essa riveste nello sviluppo dei principali componenti responsabili della qualità del vino. La buccia è innanzitutto il tessuto in cui ritroviamo tutti gli enzimi coinvolti nella via metabolica di sintesi dei coloranti dell'uva rossa, ovvero le antocianine, il cui profilo è già stato trovato essere cultivar dipendente. La buccia risulta metabolicamente attiva durante lo sviluppo e la maturazione della bacca ed inoltre esso svolge anche una funzione endocrina [50]. La buccia costituisce, infine, una barriera fisica fra l'ambiente esterno ed i tessuti interni e la sua integrità rappresenta un fattore chiave nella prevenzione delle infezioni da patogeni.

Le differenze nell'espressione proteica fra le diverse cultivar rilevate in questo studio non sono comunque riconducibili a diversi pathway enzimatici per la produzione di metaboliti secondari. Fra le proteine identificate nelle mappe delle bucce appartenenti

alle quattro varietà analizzate, infatti, non figurano enzimi implicati nella sintesi degli antociani. Uno dei limiti della tecnica di analisi proteomica è dovuto all'alto range dinamico dei profili di espressione che nella nostra fattispecie si riflette nella difficoltà di rilevare di proteine poco espresse. Con ogni probabilità quindi gli enzimi coinvolti nella sintesi dei glucosidi sono espressi in quantità relativamente minime da non poter esseri rilevati mediante tecniche separative quale l'elettroforesi bidimensionale. A questo scopo sarebbe necessario introdurre un opportuno step di "deplezione" delle proteine più abbondanti in modo da evidenziare anche quelle meno rappresentate.

La maggior parte delle proteine identificate in tutte le quattro varietà, sono classificabili come fattori di risposta delle piante a diverse condizioni di stress ambientali quali deficienza idrica, attacco da funghi patogeni, induzione di ferite, shock termici. È stato ampiamente dimostrato da *Jacobs et al.* [59] che le piante rispondono all'attacco patogeno mediante l'induzione di svariati meccanismi di difesa, quali la deposizione di barriere meccaniche come carboidrati, glicoproteine ricche in idrossiprolina all'interno delle pareti cellulari, per limitare l'invasione delle ife fungine [60-61] e la sintesi di piccoli metaboliti secondari, come le fitoalexine, che presentano attività fungo-tossica [62]. Questa risposta, in particolare quella all'attacco fungino, si traduce nella "over-espressione" di un corredo di proteine "defense-related" ovvero correlate ai meccanismi di difesa, rappresentate da enzimi generanti le fitoalexine, enzimi di protezione dallo stress ossidativo, di riparo dei tessuti e di lignificazione, nonché piccoli peptidi con attività antimicrobica, come

thionine, defensine e proteine di trasporto dei lipidi [63-64-65-66]. Inoltre l'espressione di un'ampia gamma di proteine, definite "pathogenesis-related" (PR), è rapidamente e massivamente indotta attorno al sito di infezione [67]. Le proteine PR racchiudono varie classi di proteine strutturalmente e funzionalmente differenti ma che sono raggruppate in undici diverse famiglie sulla base delle loro somiglianze a livello di sequenza. Fra queste ritroviamo le thaumatine like protein e le osmotine - PR-1 e PR-5- che creano pori transmembrana e pertanto sono nominate "permatine"; le glucanasi - PR-3, PR-4 E PR-8 - e le chitinasi - PR-11 - che attaccano rispettivamente i glucani e la chitina, componenti della parete cellulare della maggior parte dei funghi.

È stato dimostrato che thaumatine like protein e l'osmotina sono le due proteine che, in *Vitis vinifera*, hanno una forte attività antifungina contro *Phomopsis viticola* e *Botrytis cinerea*, e sono in grado di inibire sia *in vitro* che *in vivo* la crescita miceliale e la germinazione delle spore di questi funghi; inoltre, sembra che la loro contemporanea presenza sia nelle bacche che nelle foglie della pianta, determini un effetto sinergico [68]. L'espressione dell'osmotina in seguito ad attacchi da funghi patogeni è stata anche documentata in altri vegetali quali patata e tabacco. L'osmotina di tabacco, ad esempio, è attiva contro alcune linee di lieviti di *S. cerevisiae* [69].

Le PR proteins persistono ai processi tecnologici di vinificazione [70] e possono essere causa di torbidità e sedimenti nel vino. Tuttavia la proposta di utilizzare le thaumatin-like proteins e le chitinasi quali marcatori molecolari di cultivar o di stati

fisiologici dell'uva [71] sembra essere non applicabile data la natura di queste proteine non correlata strettamente alla varietà.

In un lavoro recentissimo di caratterizzazione del profilo proteomico delle bucce d'uva nel corso della maturazione della bacca [72] è stato dimostrato che le proteine coinvolte nella fotosintesi, nel metabolismo dei carboidrati e nella risposta agli stress vengono sovra-esprese nella bacca nella fase iniziale della colorazione, mentre al termine della colorazione avviene l'espressione degli enzimi responsabili della sintesi degli antociani, ed infine, a maturazione completa della bacca le proteine dominanti risultano essere proprio quelle coinvolte in meccanismi difensivi. In particolare, a questa fase, risultano incrementate sia le concentrazioni che le attività delle diverse isoforme di chitinasi e di beta-1,3-glucanasi. Tali enzimi non solo risultano sovra-espressi a maturazione completa del frutto, ma risultano presenti nel tessuto buccia fin dall'inizio della maturazione della bacca, in assenza di infezione patogena esterna. Questo dato suggerisce che nella buccia dell'uva si accumulano naturalmente determinate PR-proteine (chitinasi e glucanasi in particolare), senza essere indotte da alcun attacco patogeno, e la cui attività si amplifica nel corso della maturazione.

Il meccanismo protettivo nel corso della maturazione avverrebbe, pertanto, naturalmente, di modo che il frutto possa disporre di un pool di enzimi difensivi per rispondere rapidamente in caso di attacco patogeno.

A conferma dei meccanismi difensivi che si innescano naturalmente nella bacca d'uva, in uno studio [73] condotto sui numerosi e svariati cambiamenti che avvengono a livello di espressione genica nel corso della maturazione del frutto, è

stato messo in luce un drastico aumento delle condizioni di stress biotici ed abiotici cui viene sottoposta la bacca nel corso della sua maturazione, inducendo l' "over-expression" delle PR- protein specifica di questa fase. Inoltre recentissimi studi condotti a livello dell'espressione dell'm-RNA sui diversi tessuti che compongono la bacca d'uva (buccia, polpa e vinaccioli) hanno evidenziato la marcata differenza di espressione fra il tessuto semi e polpa/buccia. L'esocarpo che, in particolare, risulta maggiormente coinvolto nella difesa contro i patogeni, mostra una maggiore abbondanza relativa di m-RNA rispetto agli altri tessuti per i geni implicati nella resistenza ai patogeni, nelle modificazioni della parete cellulare ed infine biosintesi dei flavonoidi [74]. Gli elementi discussi in precedenza, nel loro insieme, sono coerenti con i nostri risultati e giustificano il ritrovamento in prevalenza di proteine correlate alla patogenesi nelle mappe bidimensionali dei campioni d'uva analizzati, raccolti ed estratti a maturazione tecnologica.

L'identificazione dei profili enzimatici correlati alle cultivar si gioverebbe di ulteriori protocolli analitici progettati in maniera opportuna per l'analisi dei componenti proteici minori della bacca d'uva. Sono in fase di elaborazione strategie basate sull'approccio proteomico classico che prevedono uno step preliminare di arricchimento delle specie meno rappresentate. Si sta valutando anche la possibilità di realizzare un'analisi proteomica electrophoresis-free, basata su diversi step di separazione cromatografica dei peptidi derivanti dalla digestione proteolitiche delle miscele proteiche e successiva identificazione in spettrometria di massa tandem delle proteine genitrici (shot gun proteomics).

Il progressivo e rapido incremento dei dati di natura genomica sulle specie vegetali e sull'uva in particolare sarà indubbiamente di supporto, in un futuro molto prossimo, alla definizione dei pathway metabolici che portano alla biosintesi di metaboliti secondari specifici delle cultivar.

## 7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il lavoro presentato in questa sede non è riuscito pienamente nel suo intento iniziale, ossia nell'individuazione di uno o più marcatori proteico-enzimatici che identificassero in maniera univoca le varietà ibride di uva rossa, differenziandole dalle varietà *V. vinifera* pure. Il contenuto proteico del tessuto vegetale di partenza, la buccia della bacca d'uva, si è rilevato particolarmente complesso da analizzare per una serie di motivi, illustrati a più riprese in precedenza.

Tuttavia, sono emerse dal nostro studio diverse indicazioni di carattere tecnico che lasciano supporre che sarà possibile, in tempi ragionevolmente brevi, riuscire a mettere a punto la strategia più opportuna di analisi e di fornire una risposta univoca e puntuale sul possibile utilizzo dei marcatori proteici ai fini dell'identificazione varietale.

Più in dettaglio, è stata migliorata la fase estrattiva delle proteine, mentre lo step di riduzione e alchilazione proteica, preliminare alla separazione elettroforetica bidimensionale, si è rilevato cruciale ai fini dell'incremento della risoluzione separativa. Si sta attualmente valutando se l'estrazione proteica effettuata nelle condizioni descritte è quantitativa o altre proteine recalcitranti restino saldamente ancorate alla buccia d'uva, valutando anche la possibilità di impiego di solventi organici nell'estrazione (fenolo).

E' stato verificato che l'espressione proteica nel tessuto buccia è caratterizzata, in tutte e quattro le varietà analizzate, dalla netta prevalenza di proteine correlate alla

patogenesi (PR-proteins) espresse, di norma, dalla bacca a maturazione tecnologica completa. L'impiego di sistemi di colorazione più sensibili, compatibili con le successive analisi in spettrometria di massa (blu silver) permette la rilevazione di bande proteiche meno rappresentate e dovrebbe essere decisivo nel superare il limite nell'analisi elettroforetica 2D imposto dall'alto range dinamico dell'espressione proteica. Con lo scopo di superare questo limite analitico è in fase di studio l'applicazione di una tecnica separativa cromatografica bidimensionale, preliminare al *de novo sequencing* peptidico mediante LC-ESI MS/MS. In questa maniera si potrebbe essere in grado di evitare del tutto lo step elettroforetico che può introdurre variabili in grado di influenzare la riproducibilità analitica. D'altro canto, riteniamo che la fase di deplezione delle proteine più rappresentate non dovrebbe essere applicabile in tempi rapidi, non essendo disponibili sistemi di affinità che ne consentono la cattura selettiva.

Dopo la definizione dell'opportuna strategia analitica la tecnica verrà applicata anche allo studio proteomico dei vinaccioli. Gli studi condotti in via preliminare sulle quattro varietà considerate in questa sede, infatti, suggeriscono che i pattern proteici dei vinaccioli potrebbero rilevarsi altamente informativi.

Infine, per esigenze di completezza, l'analisi proteomica dovrà essere applicata alle varie fasi di maturazione della bacca per le diverse varietà, individuando la stadio al quale è massima l'espressione degli enzimi del pathway biosintetico delle antocianine.

# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Moio L., Addeo F., 1989. **Focalizzazione isoelettrica delle proteine dei mosti e dei vini.** *VigneVini*, 4: 53-57.
- [2] Moio L., Addeo F., Iannini B., Pilone N., 1991. **La “Falanghina” in provincia di Benevento: cinetiche di maturazione dell’uva e caratteristiche analitiche del vino.** *VigneVini*, 6: 39-44.
- [3] Pasquarella C., Scaglione G., Marra F., **Il germoplasma dei vitigni campani minori: similarità ampelografiche in un gruppo di 21 accessioni-** IV convegno nazionale sulle Biodiversità “*Opportunità di Sviluppo Sostenibile*”-Settore Arboreo e Forestale-Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale-Università degli Studi di Napoli “*Federico II*”.
- [4] Eynard I., Dalmasso G., 1990. **Viticultura moderna**, , Hoepli, Milano.
- [5] Fregoni M., 2005. **Viticultura di qualità**,. Edizioni Phytoline, Affi (VR).
- [6]Walker M.A., Boursiquot J.M., 1992. **Ampelographic and isozyme data correcting the misnaming of the grape rootstock SO4 at the University of California, Davis.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 43 (3): 261-265.
- [7] Boselli M., Corso C., Monaco A., Bouquet A., Boursiquot J.M., 2000a. **Ampelographic characterization of white grape varieties in Campania (southern Italy) by multivariate analysis.** *Proceedings of the Seventh International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Montpellier (France), 6-10 July 1998, volume 1. Acta Horticulturae*, 528:75-81.

- [8] Boselli M., Iannini C., Corso C., Monaco A., Iannelli D., Cottone C., Bouquet A., Boursiquot J.M., 2000b. **Analysis of variability in the Aglianico grapevine (*Vitis vinifera*) in Campania.** *Proceedings of the Seventh International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Montpellier (France), 6-10 July 1998, volume 1. Acta Horticulturae, 528:45-50.*
- [9] Martinez M.C., Boursiquot J.M., Grenan S., Boidron R., 1997. **Ampelometric study of adult leaves of somaclones of cv. Grenache N. (*Vitis vinifera* L.).** *Canadian Journal of Botany, 75 (2): 333-345.*
- [10] Boselli M., Forlani M., Masi E., Monaco A., 2001. **Ampelometric characterisation of presumed clones of the Greco di Tufo vine varieties and comparison with some standard varieties.** *Advances in Horticultural Science, 15 (1-4):66-71.*
- [11] Walker M.A., Liu L., 1995. **The use of isozymes to identify 60 grapevine rootstocks (*Vitis* spp.).** *American Journal of Enology and Viticulture, 46 (3):299-305.*
- [12] Sanchez Escribano E., Ortiz J.M., Cenis J.L., 1998. **Identification of table grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by the isoenzymes from the woody stems.** *Genetic Resources and Crop Evolution, 45 (2):173-179.*
- [13] Mauro M.C., Strefeler M., Weeden N.F., Reisch B.I., 1992. **Genetic analysis of restriction fragment length polymorphisms in *Vitis*.** *Journal of Heredity, 83 (1): 18-21.*

- [14] Bowers J.E., Bandman E.B., Meredith C.P., 1993. **DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars.** *American Journal of Enology and Viticultur*, 44 (3): 266-274.
- [15] Guerra B., Meredith C.P., 1995. **Comparison of *Vitis berlandieri* X *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis.** *Vitis*, 34 (2): 109-112.
- [16] Bowers J.E., Meredith C.P., 1996. **Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis.** *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121 (4):620-624.
- [17] Simon Herrera R., Bruns S., Mantell S., Tragardh C., Viana A.M., 1998. **Study of genetic diversity in *Vitis vinifera* using RAPDs. Recent advances in biotechnology for tree conservation and management.** *Proceedings of an IFS Workshop, Florianopolis (Brazil), 15-19 September 1997: 112-121.*
- [18] Wolf T., Eimert K., Ries R., 1999. **Reliable identification of grapevine rootstock varieties using RAPD PCR on woody samples.** *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5 (2): 34-38.
- [19] Schneider A., Carra A., Akkak A., This P., Laucou V., Botta R., 2001. **Verifying synonymies between grape cultivars from France and Northwestern Italy using molecular markers.** *Vitis*, 40 (4): 197-203.
- [20] Xu H., Bakalinsky A.T., 1996. **Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers.** *HortScience*, 31 (2):267-268.

- [21] Cervera M.T., Cabezas J.A., Sanchez Escribano E., Cenis J.L., Martinez Zapater J.M., 2000. **Characterization of genetic variation within table grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers.** *Vitis*, 39 (3):109-114.
- [22] Fossati T., Labra M., Castiglione S., Failla O., Scienza A., Sala F., 2001. **The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave".** *Theoretical and Applied Genetics*, 102 (2-3): 200-205.
- [23] Forlani M., Monaco A., Costantini L., Tosco D., Manzo M., Spiezia A., Grando M.S., 2000. **Microsatellite variability in *Vitis vinifera* gene pool from the grape-growing area of Campania (Italy).** *International Conference: Prospects for Viticulture and Enology. Zagreb (Croatia), November 2000*, 2:90.
- [24] Borrego J., Rodriguez I., de Andres M.T., Martin J., Chavez J., Cabello F., Ibanez J., de Andres M.T., Dore C., Dosba F., Baril C., 2001. **Characterization of the most important Spanish grape varieties through isozyme and microsatellite analysis. Proceedings of the International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars.** *Acta Horticulturae*, 546:371-375.
- [25] Monaco A., Costantini L., Segala C., Forlani M., Grando M.S., 2001. **Genetic relationships among the local *Vitis vinifera* varieties from grape-growing area of Campania (Italy).** *XLV Annual Congress. Società Italiana di Genetica Agraria (S.I.G.A.). Salsomaggiore Terme 26-29 September 2001.*

- [26] Pellerone F.I., Edwards K.J., Thomas M.R., 2001. **Grapevine microsatellite repeats: isolation, characterization and use for genotyping of grape germplasm from Southern Italy.** *Vitis*, 40 (4):179-186.
- [27] Faria M.A., Magalhaes R., Ferreira M.A., Meredith C.P., Ferreira Monteiro F., 2000. **Vitis vinifera must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4):1096-1100.
- [28] Siret R., Boursiquot J.M., Merle M.H., Cabanis J.C., This P., 2000. **Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (Vitis vinifera L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (10): 5035-5040.
- [29] Righetti, P.G. 1984. **Isoelectric focusing in immobilized pH gradients.** *Chromat. Reviews*, 176: 166-174.
- .
- [30] Waters, E.J. Fallace, W., & Williams, P.J., 1992. **The identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1514-1519.
- [31] Lamikanra, O. 1993. **Identification of grape cultivars from their seed polypeptide composition.** *Phytochemistry*, 32 (5): 1199-1202.
- [32] Abdi N., Holford P., McGlasson B., 2002. **Application of two-dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit.** *Postharvest Biology and Technology*, 26 (1):1-13.

- [33] Pastorello E., Farioli L., Pravettoni V., Ortolani C., Fortunato D., Giuffrida M.G., Perono Garoffo L., Calamari A.M., Brenna O., Conti A., 2003. **Identification of grape and wine allergens as an endochitinase a 4,lipid-transfer protein, and a thaumatin.** *Journal of allergy and clinical immunology*, 111: 350-359.
- [34] Iocco P., Franks T., Thomas M.R., 2001. **Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L.** *Transgenic Research*, 10 (2): 105–11.
- [35] Goñi I., Martin N., Saura-Calixto F., 2005. **In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel.** *Food Chemistry*, 9: 281–286.
- [36] Waters, E.J.; Wallace, W., Tate, M., Williams, P.J., 1993. **Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41: 724-730.
- [37] Roberts, R.T., 1975. **Glycoproteins and beer foam.** *J. Inst. Brew. Proc. EBC Congr.*, 454-464.
- [38] Brissonnet, F., Maujean, A., 1993. **Characterization of foaming proteins in a champagne base wine.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 44 (3): 297-301.
- [39] Brissonnet, F., Maujean, A., 1991. **Identification of some foam-active compounds in Champagne base wine.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 42 (2): 97-102.

- [40] Marchal, R., Seguin, V., Maujean, A., 1997. **Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in Champagne area wines by Bradford method.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3) :303-309.
- [41] Hsu J-C., Heatherbell D.A., 1987. **Isolation and Characterization of soluble proteins in grapes, grape Juice and wine.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 38 (1): 6-10.
- [42] Moreno-Arribas MV., Cabello F., Polo MC; Martin-Alvarez PJ., Pueyo E., 1999. **Assessment of the native electrophoretic analysis of the total grape must proteins for the characterization of Vitis vinifera L.cultivars.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1): 114-20.
- [43] Sarry J. E., Sommerer N., Sauvage F.X., Bergoin A., Rossignol M., Albagnac G., Romieu C., 2004. **Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp.** *Proteomics*, 4: 201-215.
- [44] Matsui N.M., Smith D.M., Clauser K.R., Fichmann J., Andrews L.E., Sullivan C.M., Burlingame A.L., Epstein L.B., 1997. **Immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometric identification of cytokine-regulated proteins in ME-180 cervical carcinoma cells.** *Electrophoresis*, 18: 409-417.
- [45] Krause I., Buchberger J., Weiss G., Pfluger M., Klostermeyer H. 1988. **Isoelectric focusing in immobilized pH gradients with carrier ampholytes added for high-resolution phenotyping of bovine lactoblogulins: characterization of a new genetic variant.** *Electrophoresis*, 9: 609-616.

- [46] Strahler J.R., Hanosh S.M. e Somerlot L., 1987. **High resolution two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of basic myeloid polypeptides: use of immobilized pH gradients in the first dimension.** *Electrophoresis*, 8: 165-172.
- [47] Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss, W., 2000. **The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.** *Electrophoresis*, 21: 1037-1053.
- [48] Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemmola B., Orecchia P., Zardi L., Rigetti P.G. 2004. **Blue Silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.** *Electrophoresis*, 25:1327-1333.
- [49] Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. e Mann, M., 1996. **Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrilamyde gels.** *Analytical Chemistry*, 68 (5): 850-858.
- [50] Kanellis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A., 1993. **Biochemistry of fruit ripening.** 189–234, *Chapman and Hall, London*.
- [51] Rabilloud T., Vuillard L., Gilly C., Lawrence J.J., 1994. **Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview,** *Cellular and Molecular Biology*, 40: 57-75.
- [52 ] Thiedea B., Höhenwarterb W., Kraha A., Mattowc J., Schmidb M., Schmidtb F., Jungblutb P.R.,. 2005. **Peptide mass Wngerprinting.** *Methods*, 35: 237–247.

[53] Barrow M.P., Burkitt W.I., Derrick P.J., 2005. **Principles of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and its application in structural biology.** *Analyst*, 130: 18-28.

[54 ] Henzel W. J., Watanabe C. J., Stults J. T., 2003. **Protein Identification: The Origins of Peptide Mass Fingerprinting.** *American Society of Mass Spectrometry*, 14: 931–942.

[55] Costacurta A., Calò A., Crespan M., Milani M., Carraro R., Aggio L., Flamini R., Ajmone-Marsan P., 2001. **Morphological, aromatic and molecular characteristics of Moscato vine varieties and research on phylogenetic relations.** *Bulletin del' O.I.V. ([Office International du Vin](#))* 841-842:133–150.

[56] Di Stefano R. 1996. **Metodi chimici nella caratterizzazione varietale.** *Rivista di Viticoltura ed Enologia*, 49 (1) :51–56.

[57] Flamini R., Dalla Vedova A., Calò A., 2001. **Study on the monoterpene contents of 23 accessions of Muscat grape: Correlation between aroma profile and variety.** *Rivista di Viticoltura ed Enologia*, 2 (3):35–49.

[58] Mazzuca P., Ferranti P., Picariello G., Chianese L., Addeo F., 2005. **Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis Vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry*, 40:83-90.

- [59] Jacobs A. K., Dry I. B., Robinson S.P., 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, 48:325-336.
- [60] Aist J. R., 1976. **Papillae and related wound plugs of plant cells.** *Annual Review of Phytopathology*, 14:145-163.
- [61] Showalter A. M., Bell J. N., Cramer C. L., Bailey J. A., Varner J. E., Lamb C. J., 1985. **Accumulation of hydroxyproline rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection.** *Proc. Natl. Acad. Sci*, 82:6551-6555.
- [62] Hain R., Reif H., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P. H., Stöcker R. H., Stenzel K., 1993. **Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant.** *Nature*, 361:153-156.
- [63] Bergey D. R., Howe G. A., Ryan C.A., 1996. **Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals.** *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:12053-12058.
- [64] Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M. F., C., Thevissen, K., Desamblanx, G. W., and Osborn, R. W., 1997. **Antimicrobial peptides from plants.** *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16:297-323.
- [65] Fritig B., Heitz T., Legrand M., 1998. **Antimicrobial proteins in induced plant defence.** *Curr. Opin. Immunol.*, 10:16-22.

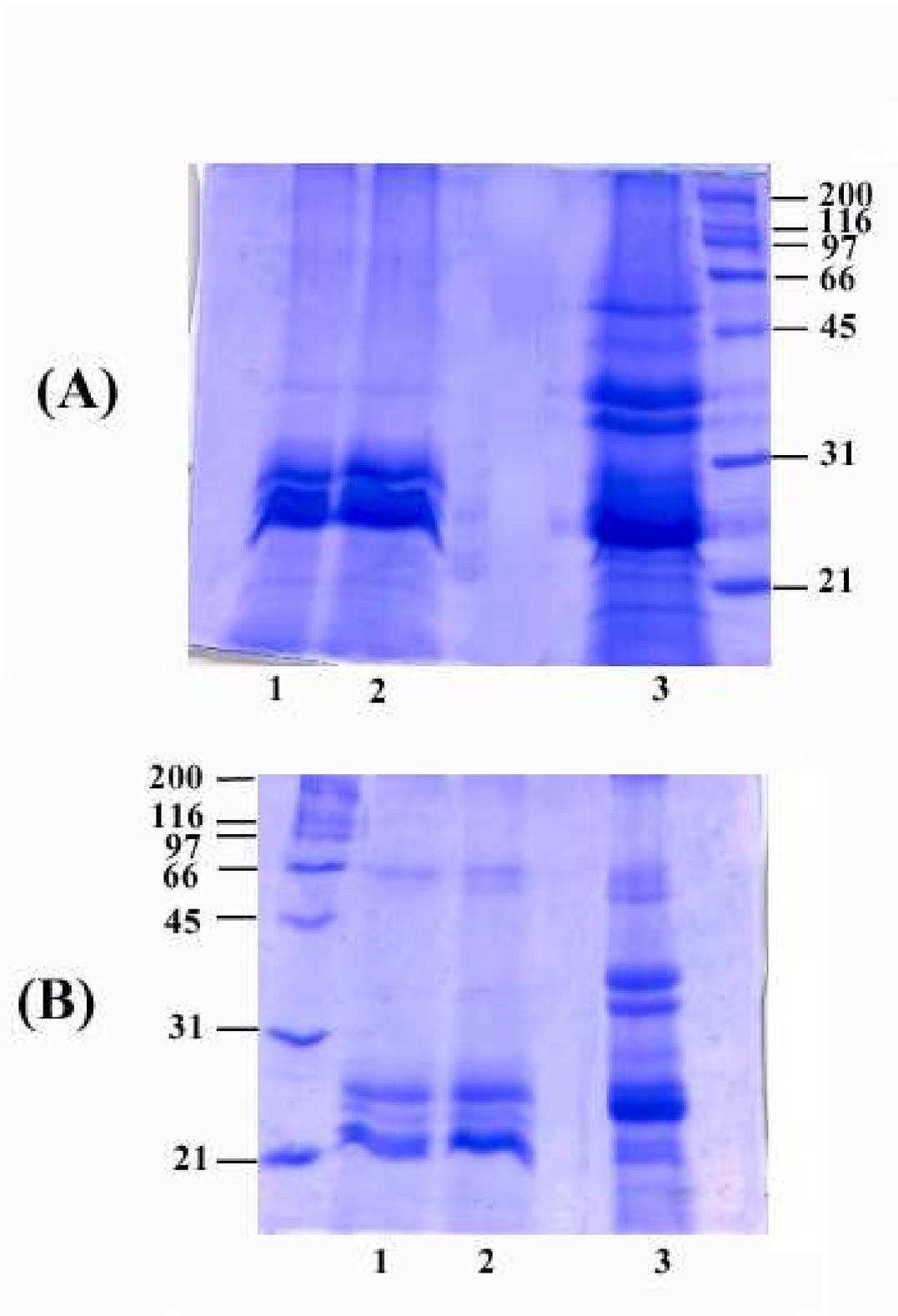
- [66] Odjakova M., Hadjiivanova C., 2001. **The complexity of pathogen defense in plants.** *Bulg. J. Plant Physiol*, 27:101-109.
- [67] Kombrink E., Somssich I. E., 1997. **Pathogenesis-related proteins and plant defense.** Pages 107-128 in: *The Mycota (Part A, Plant Relationships)*. G. Carrol and P. Tudzynski, eds. Springer-Verlag, Münster, Germany.
- [68] Monteiro S., Barakat M., Piçarra-Pereira M.A., Teixeira A.R., Ferriera R.B., 2003. **Osmotin and Thaumatin from Grape: A Putative General Defense Mechanism Against Pathogenic Fungi.** *The American Phytopathological Society*, 93 (12): 1505-1512.
- [69] Yun D., Zhao Y., Pardo J.M., Narasimhan M.L., Damsz B., Lee H., Abad L.R., D'Urzo M.P., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1997. **Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7082–7087.
- [70] Flamini R., De Rosso M., 2006. **Mass spectrometry in the analysis of grape and wine proteins.** *Expert Rev Proteomics* 3: 321–331.
- [71] Weiss K.C., Yip T.-T., Hutchens T.W., Bisson L. F., 1998. **Rapid and Sensitive Fingerprinting of Wine Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry.** *Am. J. Enol. Vitic.*, 49(3):231-239.
- [72] Deytieux C., Geny L., Lapaillerie D., Claverol S., Bonneu M., Doneche B. 2007. **Proteome analysis of grape skins during ripening.** *J. Exp. Bot.*, 58 (7): 1851–1862.

[73] [Terrier N.](#), [Glissant D.](#), [Grimplet J.](#), [Barrieu F.](#), [Abbal P.](#), [Couture C.](#), [Ageorges A.](#), [Atanassova R.](#), [Léon C.](#), [Renaudin J.P.](#), [Dédaldéchamp F.](#), [Romieu C.](#), [Delrot S.](#), [Hamdi S.](#), 2005. **Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development.** *Planta*, 222(5): 832-4

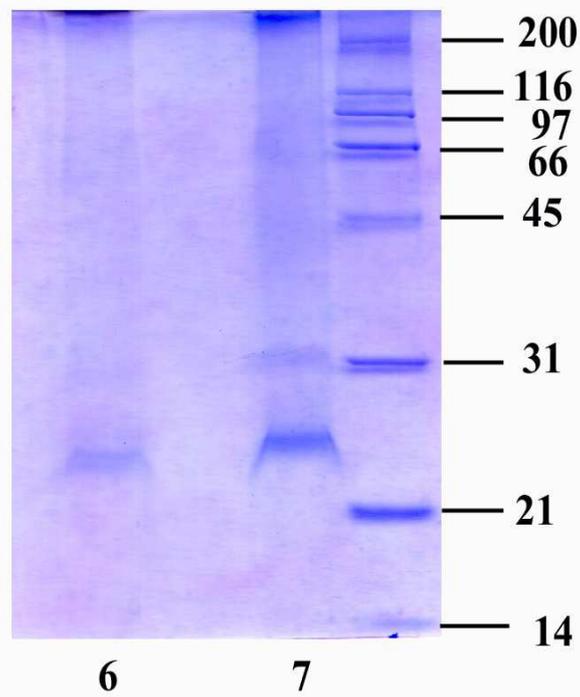
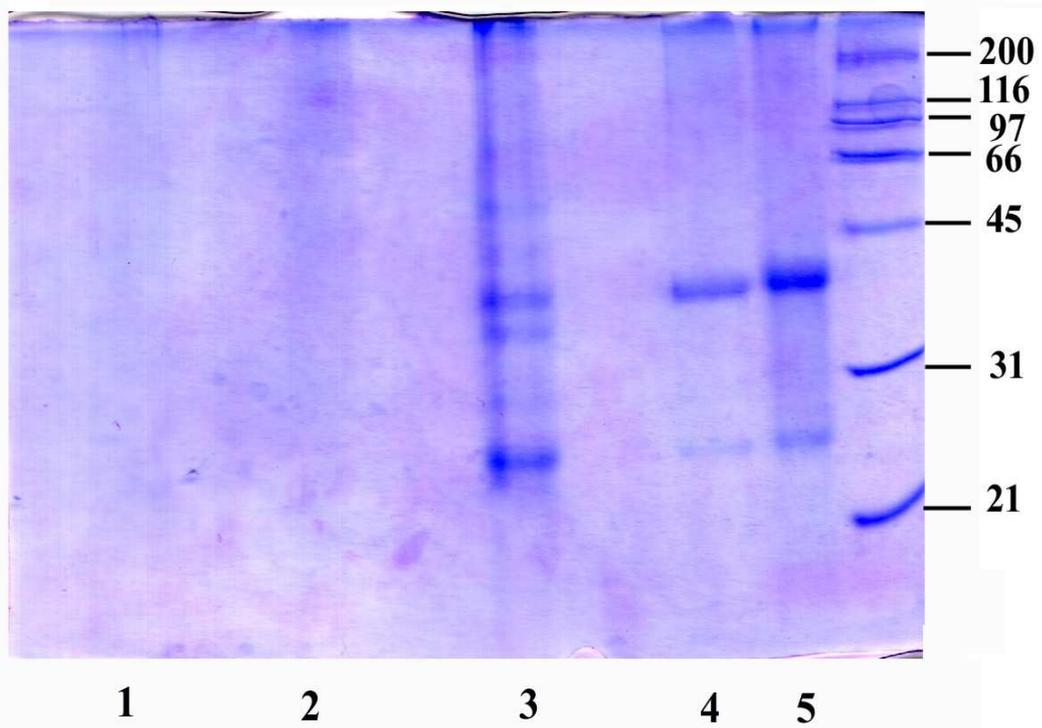
[74] Grimplet J., Deluc L.G., Tillett R.L., Wheatley M.D., Schlauch K.A., Cramer G.R., Cushman J.C., 2007. **Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues**, *BCM Genomics*, 8:187.

[75] Barraclough D, Obenland D, Laing W, Carroll T., 2004. **A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples.** *Postharvest Biology and Technology* 32, 175–181.

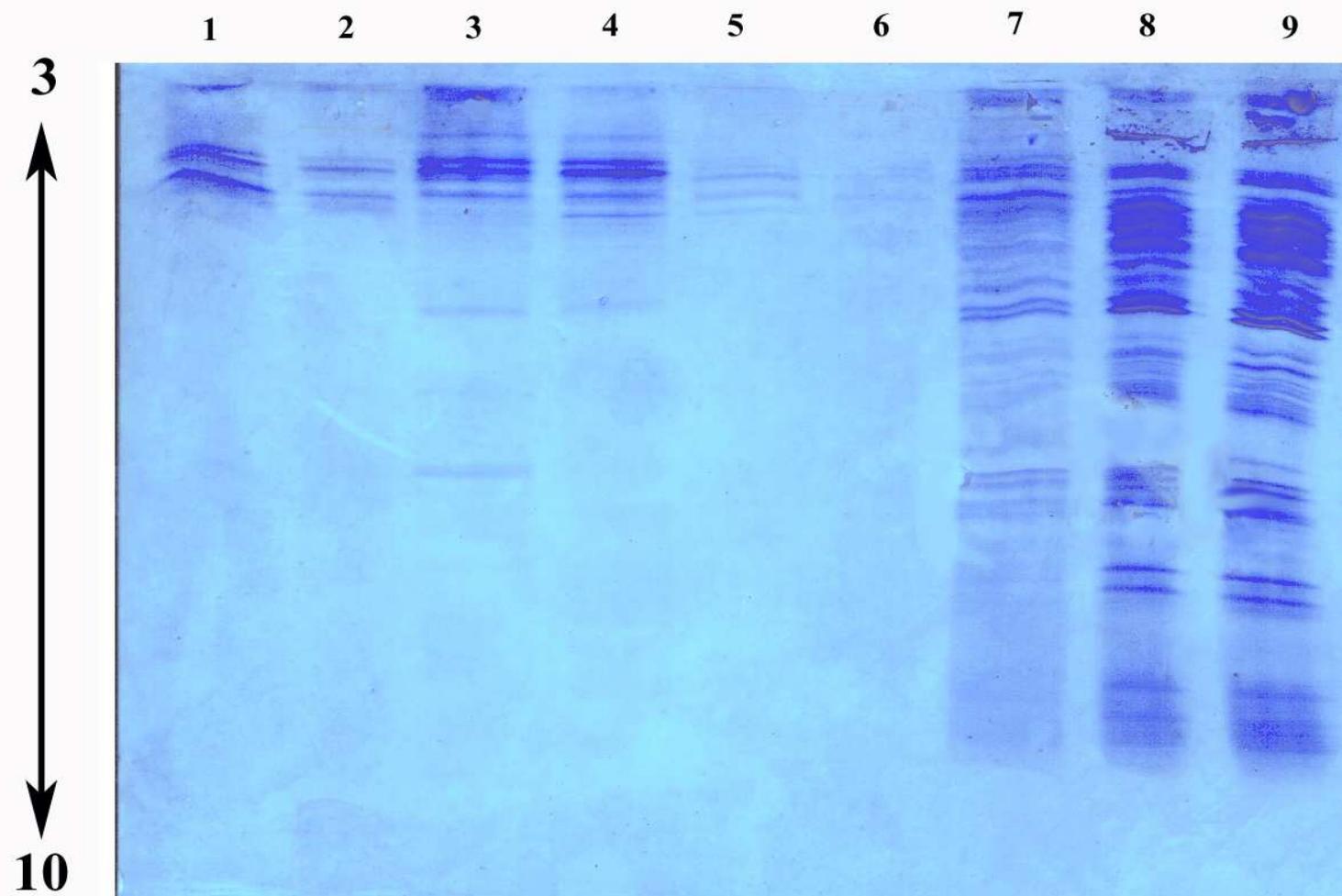
# FIGURE



**Figura 5.1** – SDS-PAGE al 12% di acrilammide delle proteine estratte da buccia (1,2) e vinaccioli (3) di *Isabella* prima (A) e dopo (B) purificazione.

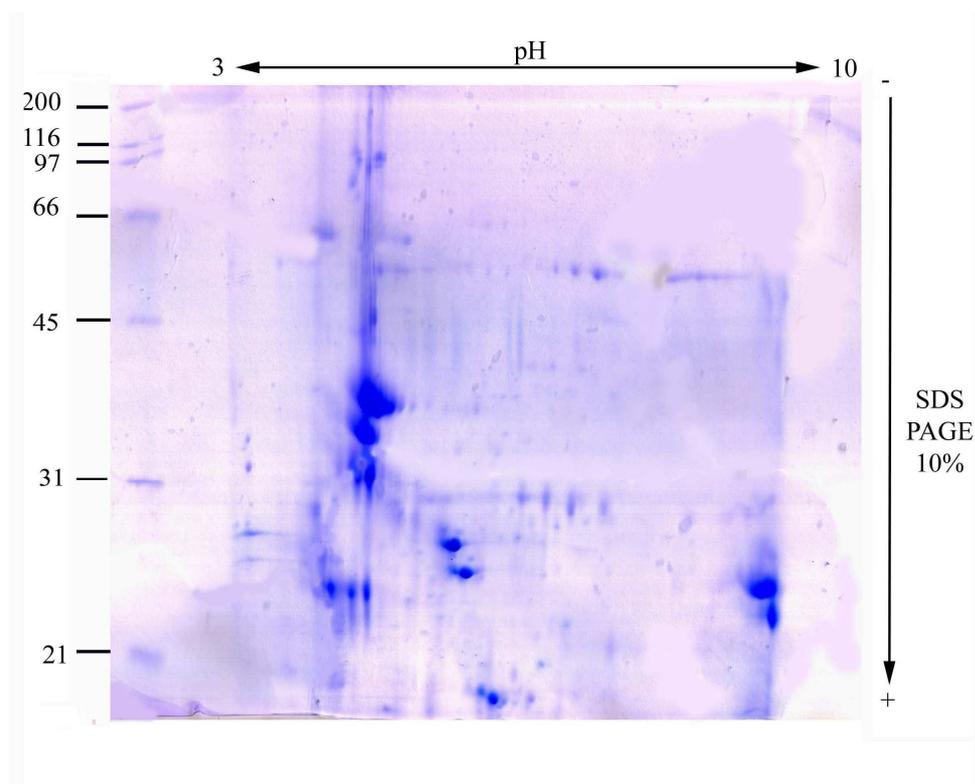


**Figura 5.2** – SDS-PAGE al 12% di acrilammide delle proteine estratte da polpa, vinaccioli e buccia di *Isabella* (1,3,6) e *Piedirosso* (2,4,5,7)

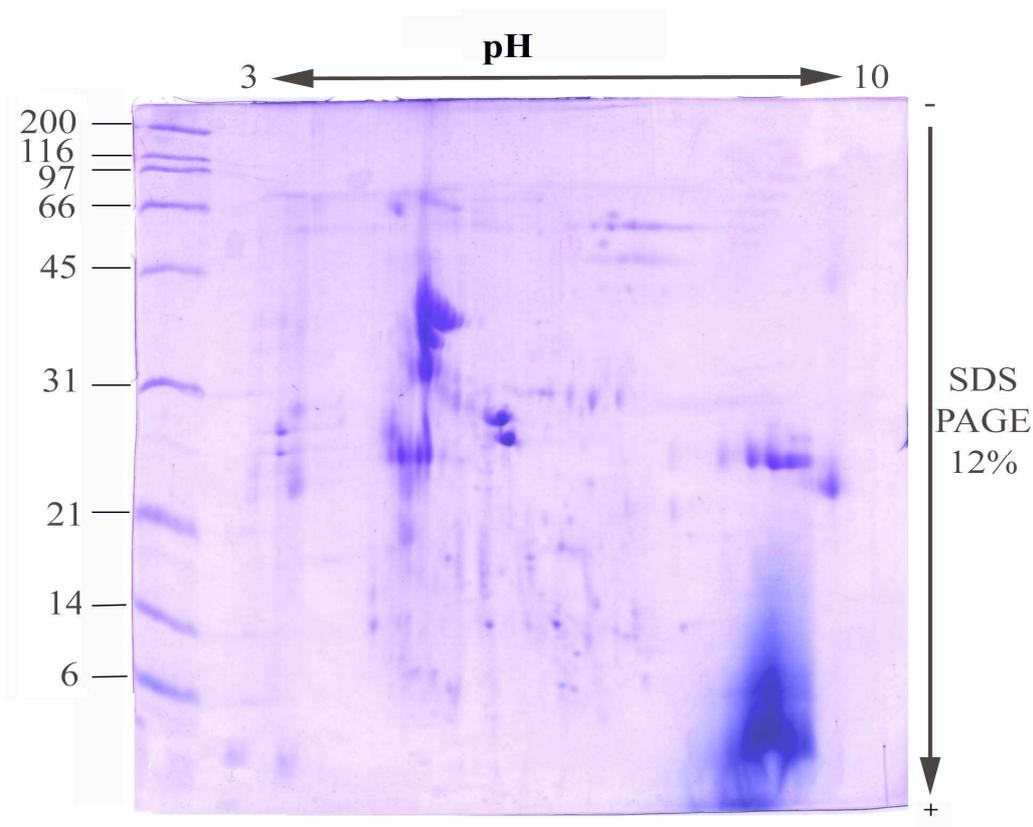


**Figura 5.3** – Isoelettrofocalizzazione nel range pH 3-10 delle proteine di buccia, polpa e vinaccioli di *Isabella* (1,2,5,7) e *Piedirosso* (3,4,6,8,9)

**(A)**

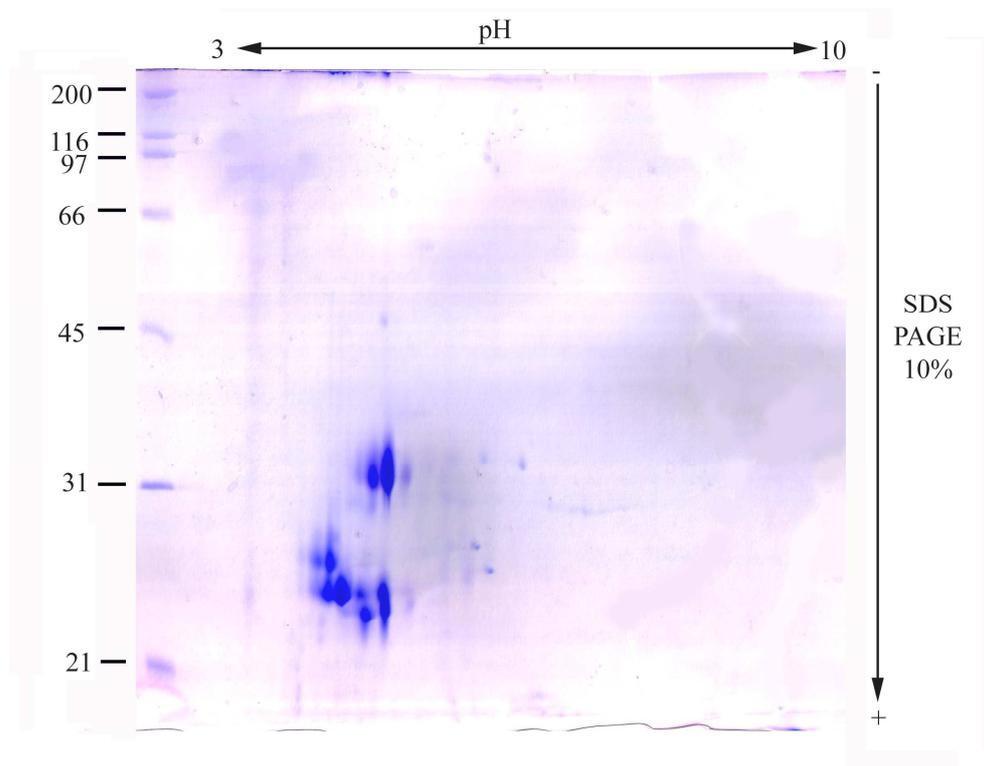


**(B)**

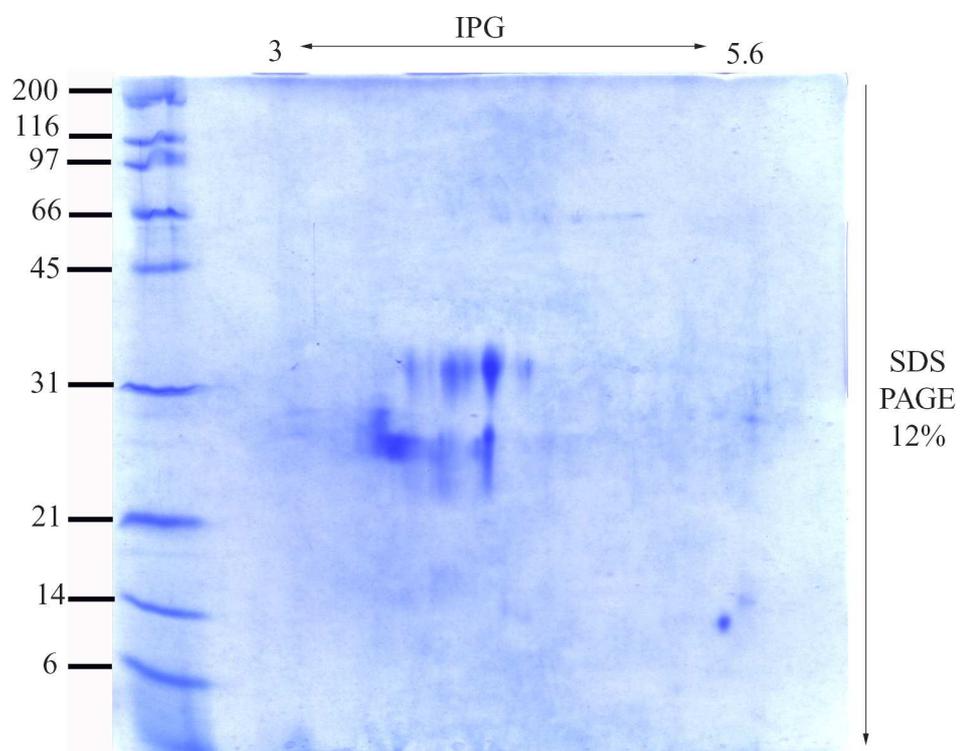


**Figura 5.4** – Elettroforesi 2D al 10% (A) e al 12% di acrilammide (B) in seconda dimensione delle proteine estratte da vinaccioli di *Isabella*.

**(A)**

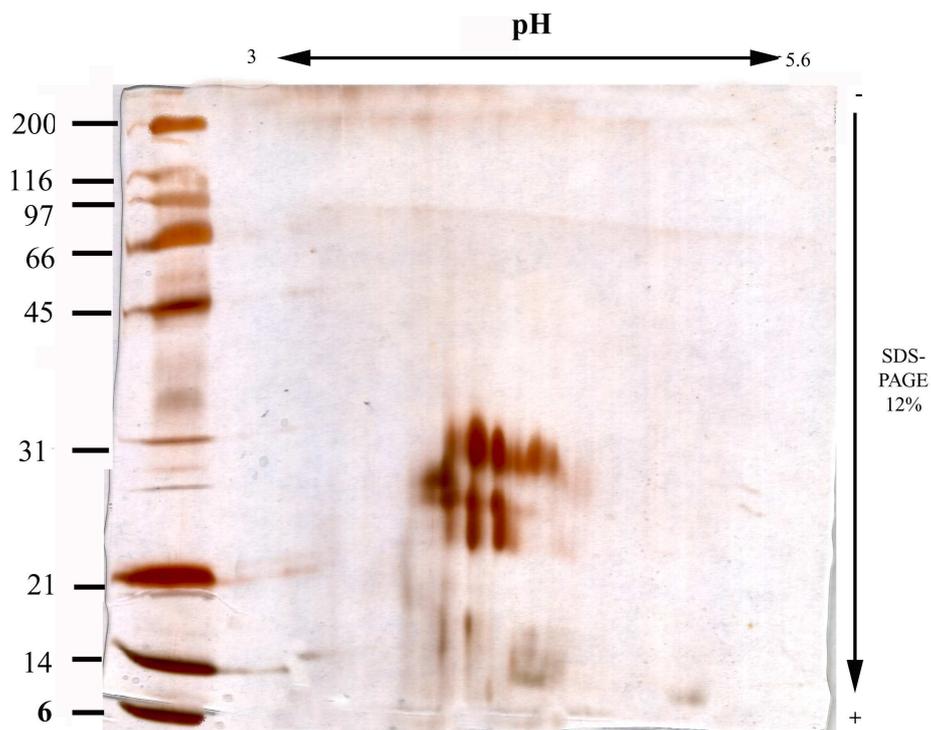


**(B)**

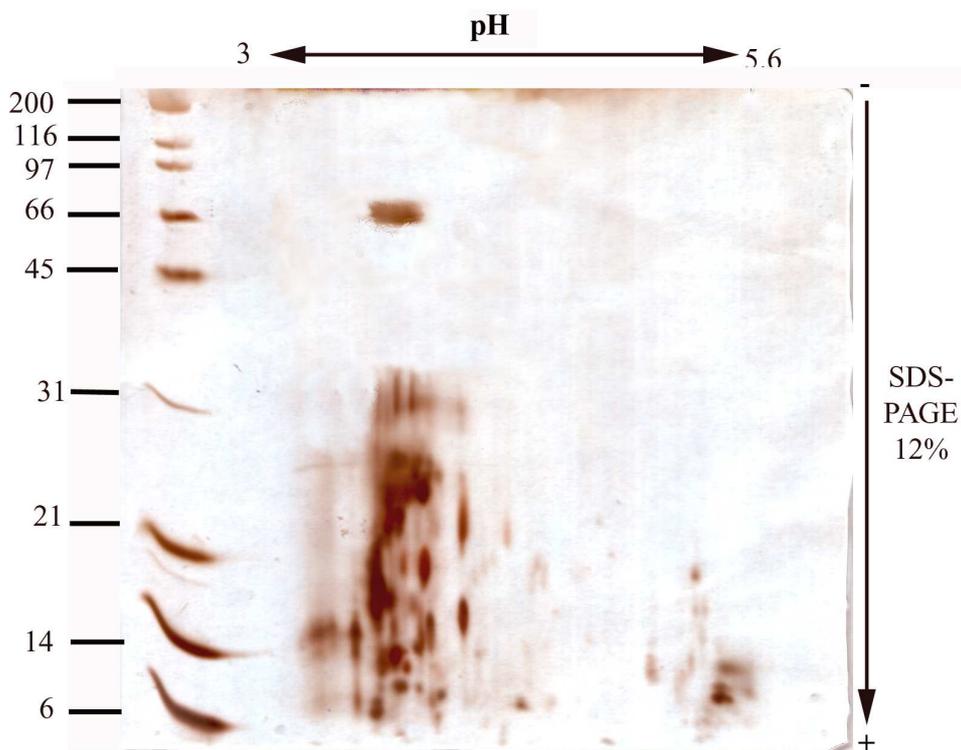


**Figura 5.5** – Elettroforesi 2D pH 3-10 e 10% di acrilammide (A) ed a pH 3-5.6 e 12% di acrilammide (B) delle proteine estratte da buccia di *Isabella*.

(A)

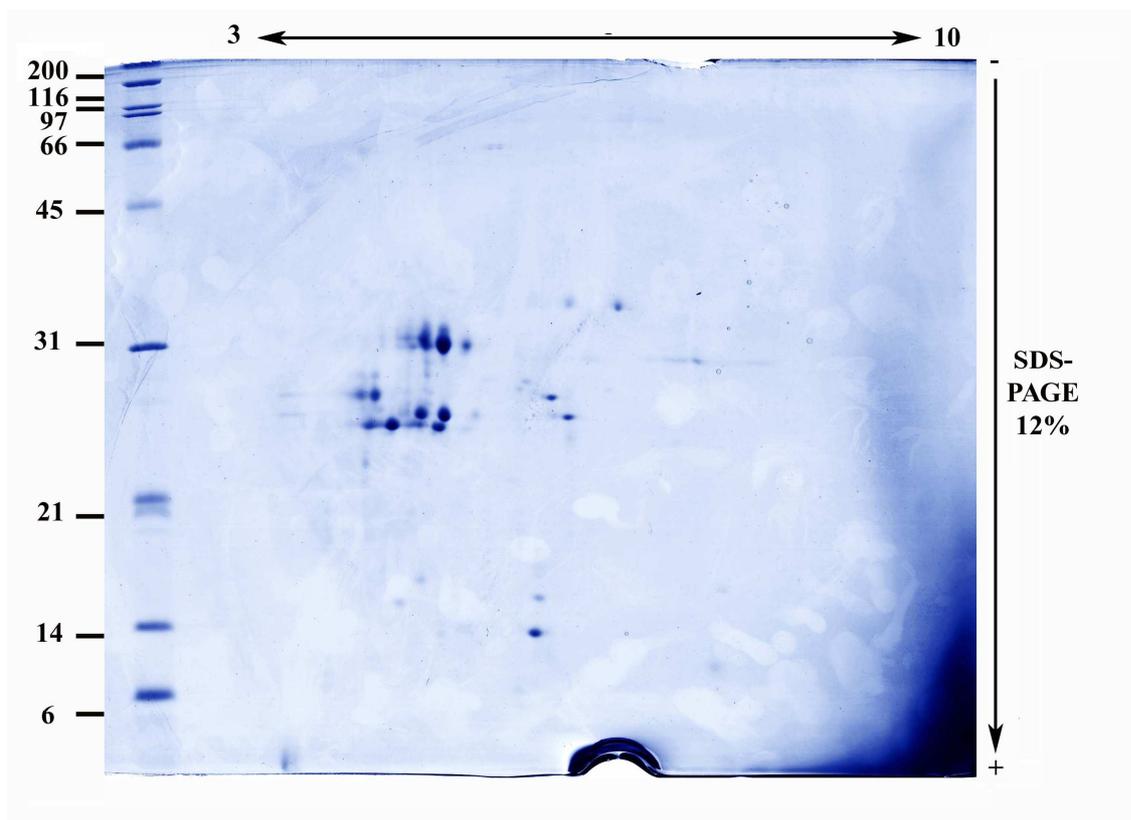


(B)

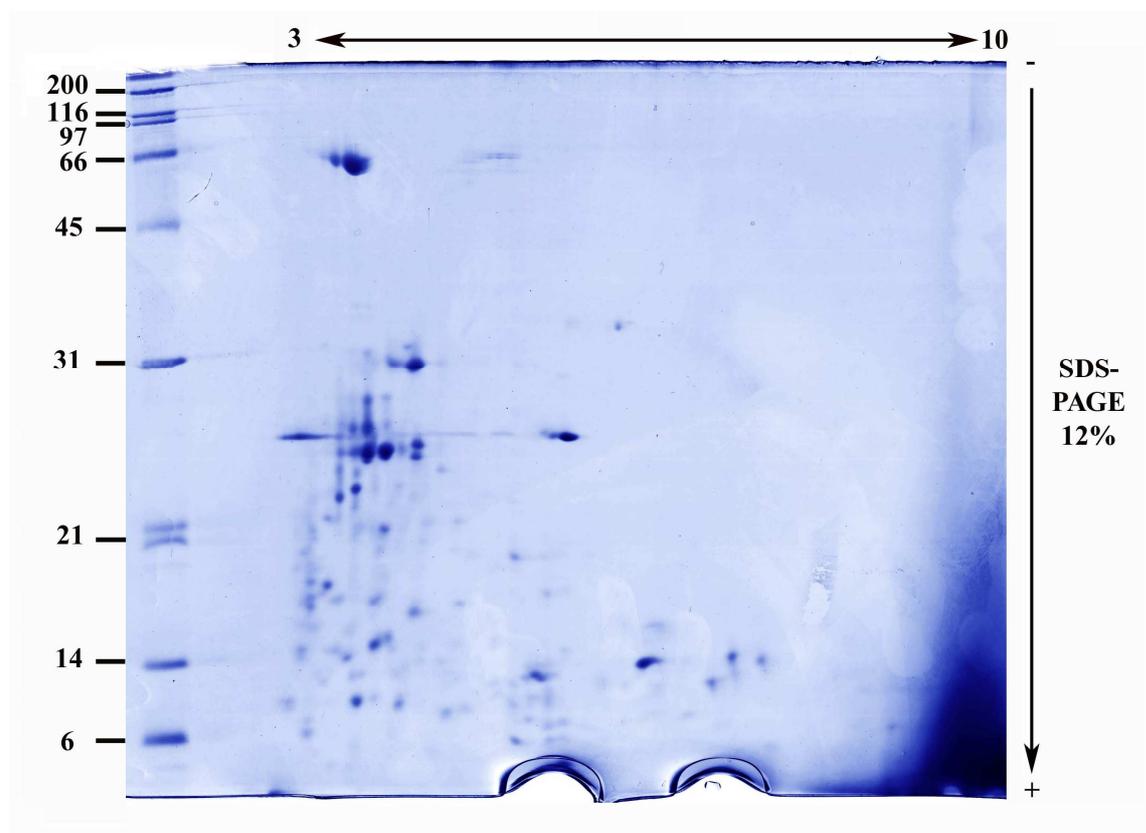


**Figura 5.6** – Elettroforesi 2D pH 3-5.6 e 12% di acrilammide delle proteine di bucce estratte da *Isabella* (A) e *Piedirosso* (B) e colorate al silver stain.

(A)



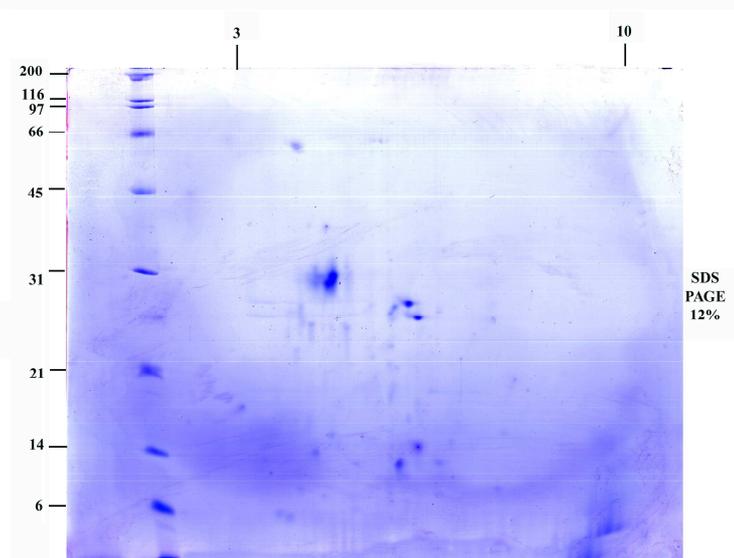
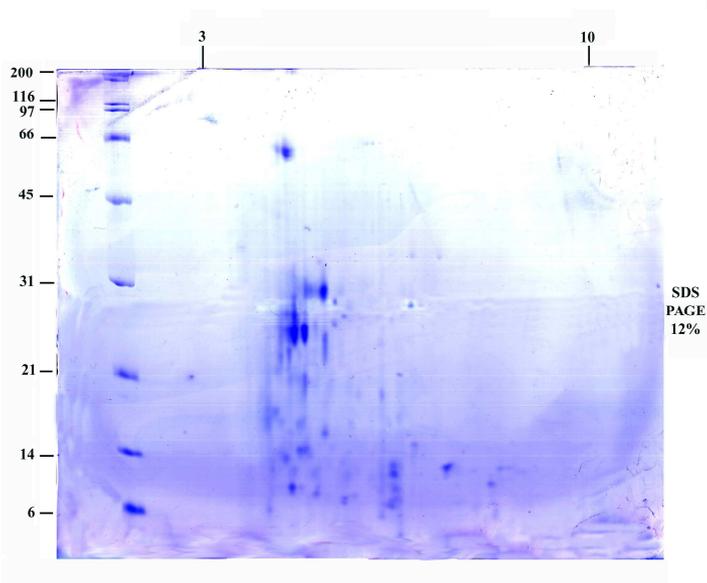
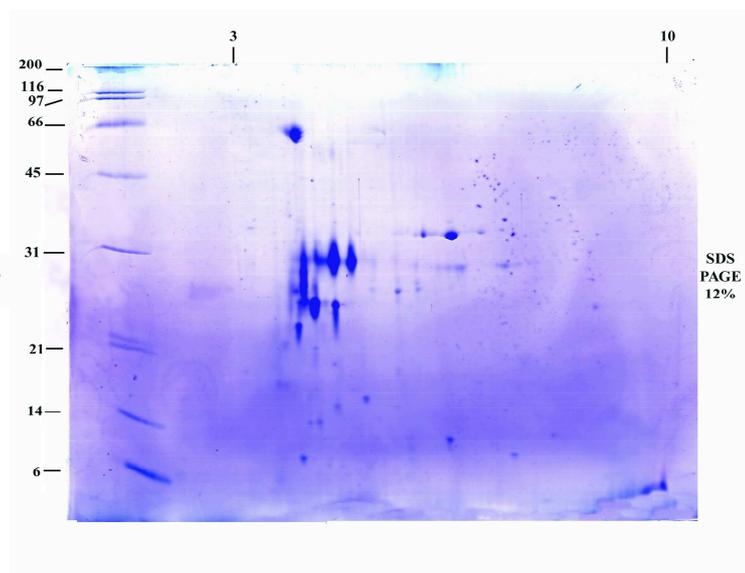
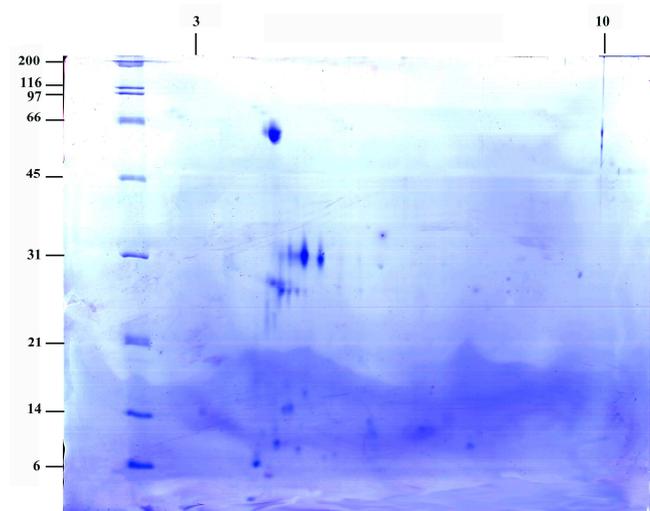
(B)



**Figura 5.7** – Elettroforesi 2D pH 3-10 e 12% di acrilamide delle proteine di bucce estratte da *Isabella* (A) e *Piedirosso* (B) e colorate al Blue silver.

(A)

(B)

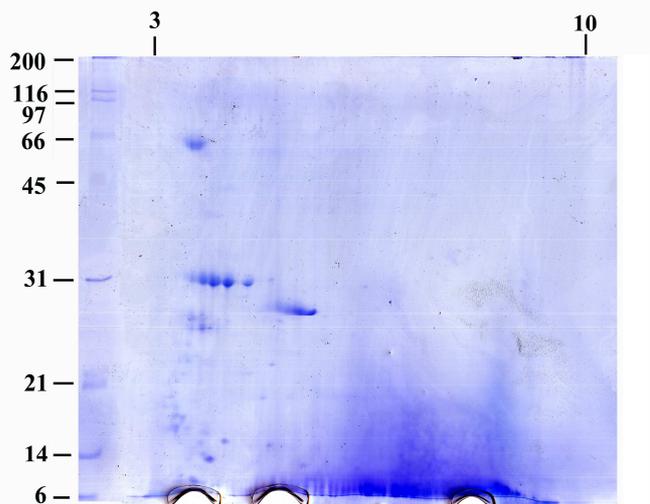


(C)

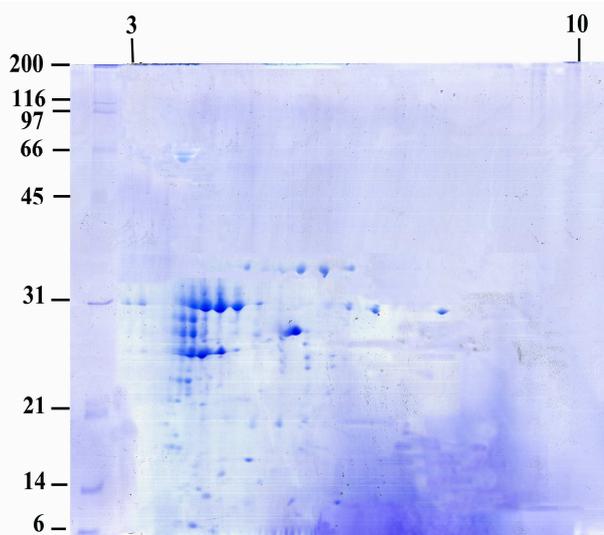
(D)

**Figura 5.8** – Elettroforesi 2D pH 3-10; 12% acrilammide in contemporanea delle proteine di bucce estratte da *Aglianico* (A); *Casavecchia* (B); *Piediroso* (C); *Isabella* (D).

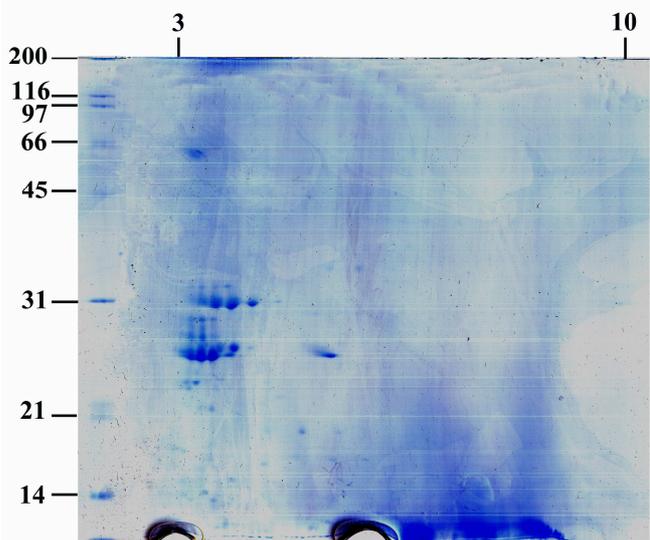
(A)



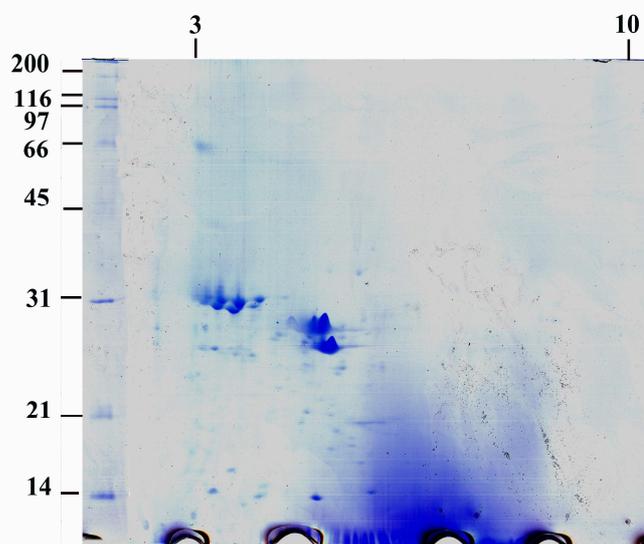
(B)



(C)

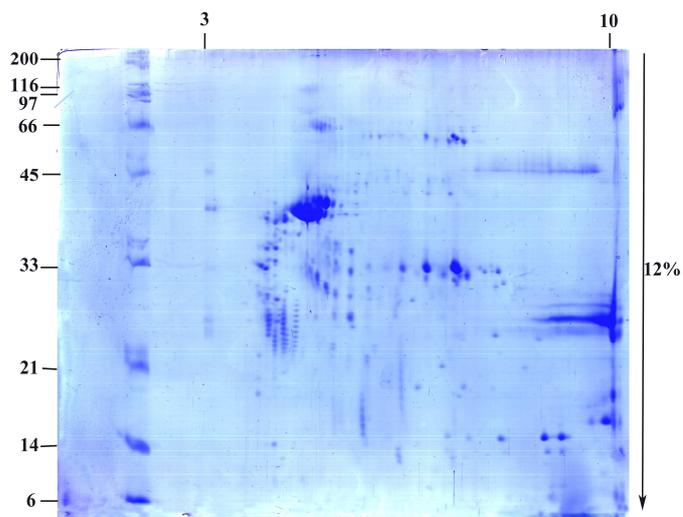


(D)

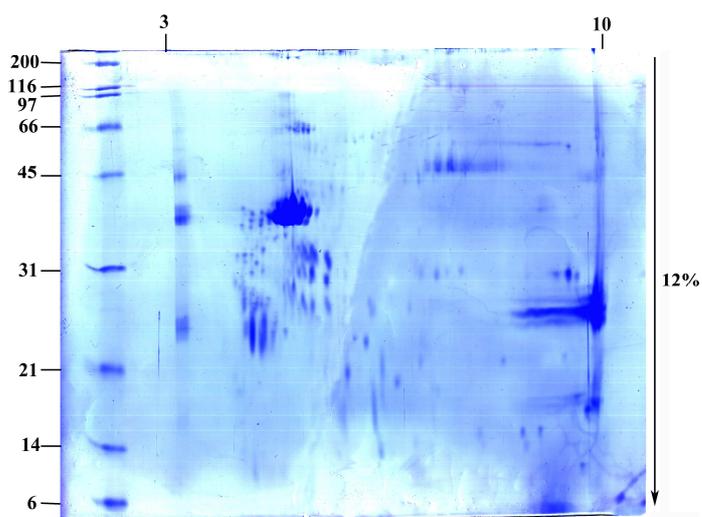


**Figura 5.9** – Elettroforesi 2D pH 3-10; 12% acrilammide in contemporanea delle proteine di bucce ridotte e carbossimetilate di *Aglianico* (A); *Casaveccchia* (B); *Piedirosso* (C); *Isabella* (D).

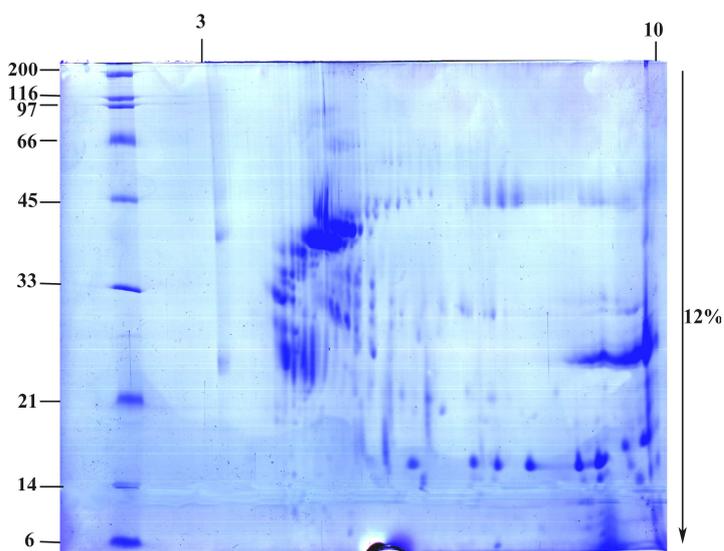
(A)



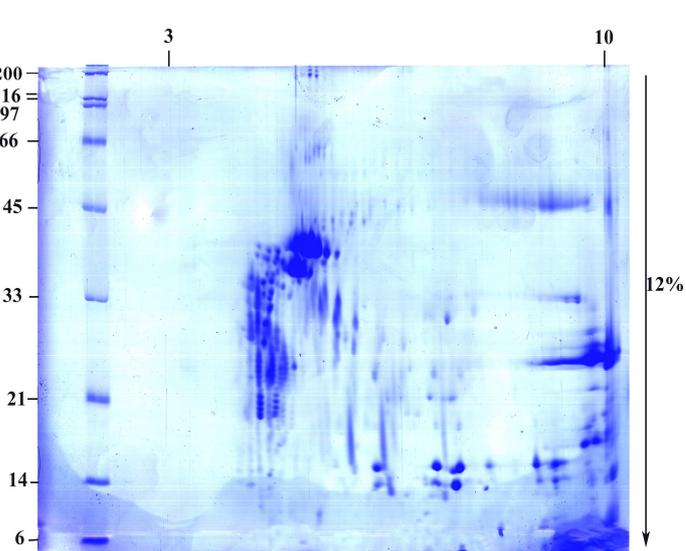
(B)



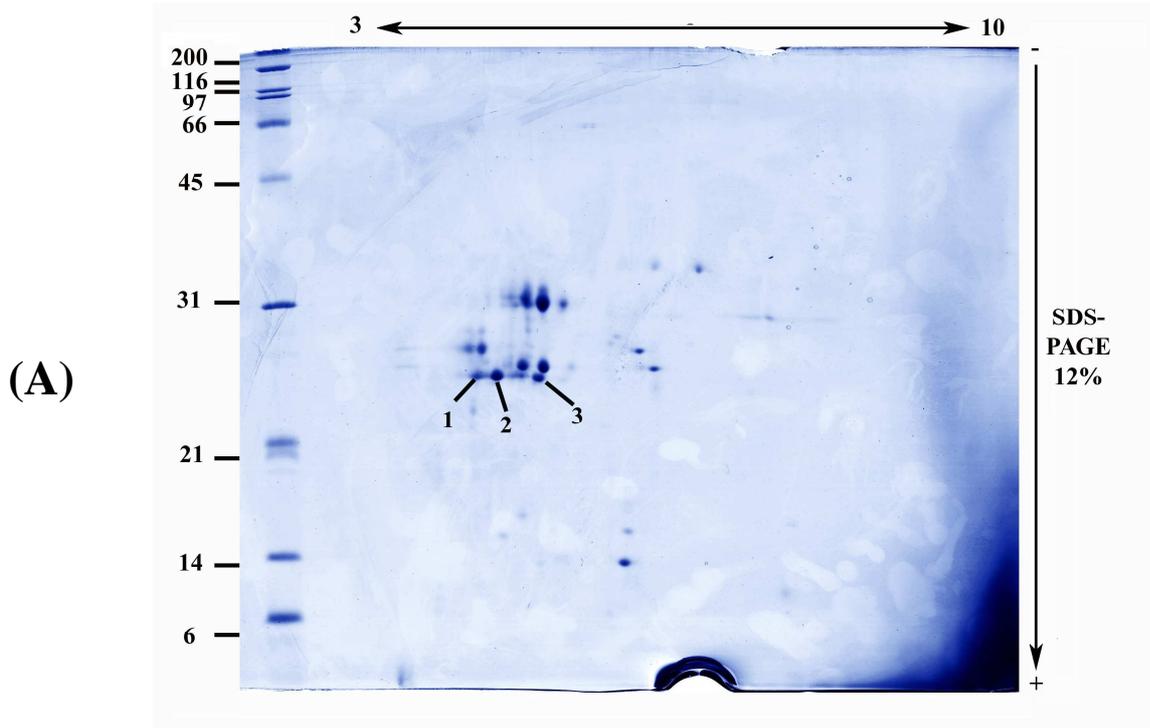
(C)



(D)



**Figura 6.0**– Elettroforesi 2D pH 3-10; 12% acrilammide in contemporanea delle proteine di vinaccioli estratti da *Aglianico* (A); *Casavecchia* (B); *Piedirosso* (C); *Isabella* (D).

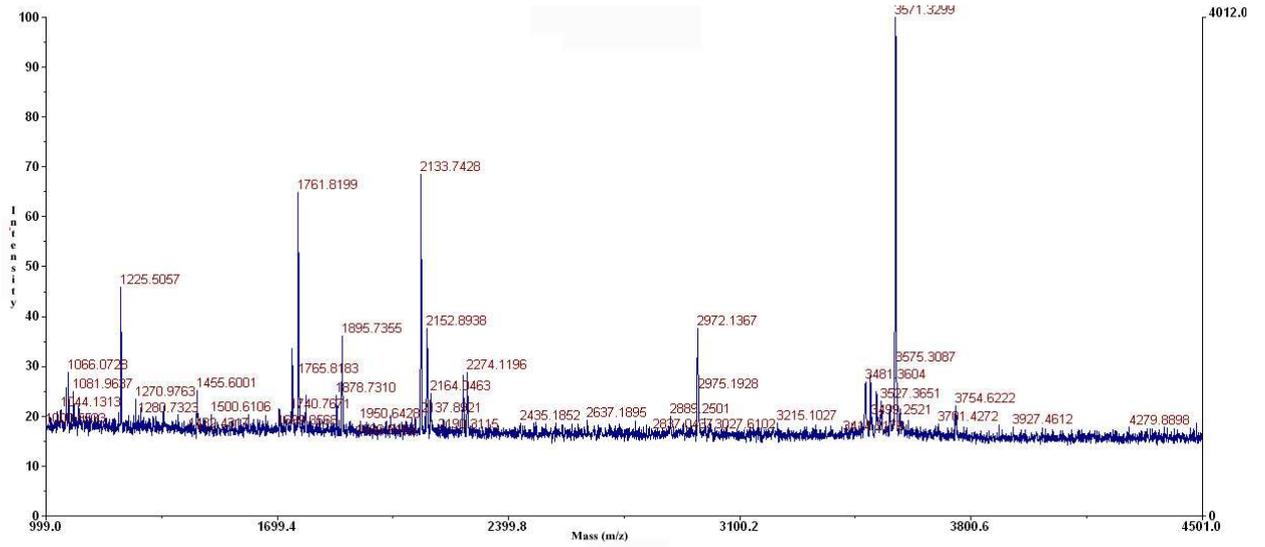


(B)

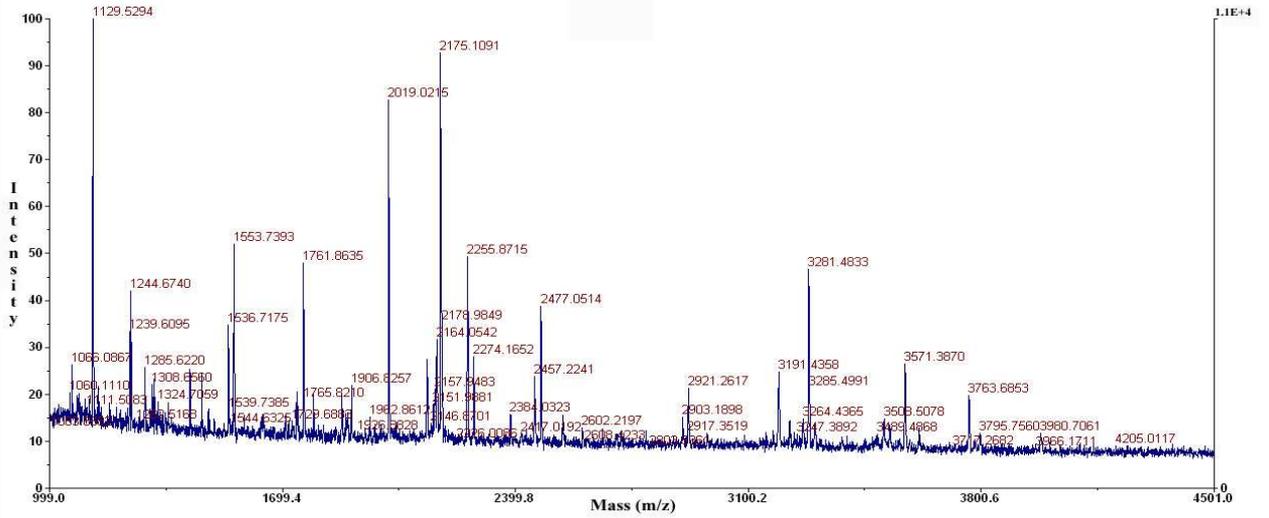
SPOT 1	SPOT 2	SPOT 3
m/z	m/z	m/z
1224,51	1128,5	1060,05
1743,78	1239,61	1238,5
1761,81	1536,71	1271,5
1894,75	1553,74	1742,76
2132,76	1761,86	1761,81
2151,92	2018,02	2132,78
2971,13	2174,12	2151,93
3569,32	2254,9	2475
3478,25	2475,08	3504,44
	2919,35	3569,26
	3188,38	3761,6
	3279,5	4423,16
	3569,32	
	3761,71	

**Figura 6.1** – (A) Elettroforesi 2D pH 3-10; 12% acrilammide delle proteine estratte da bucce di *Isabella*; (B) Masse dei peptidi triptici relativi agli spot 1, 2, 3, misurate al Maldi-tof.

(A)



(B)



(C)

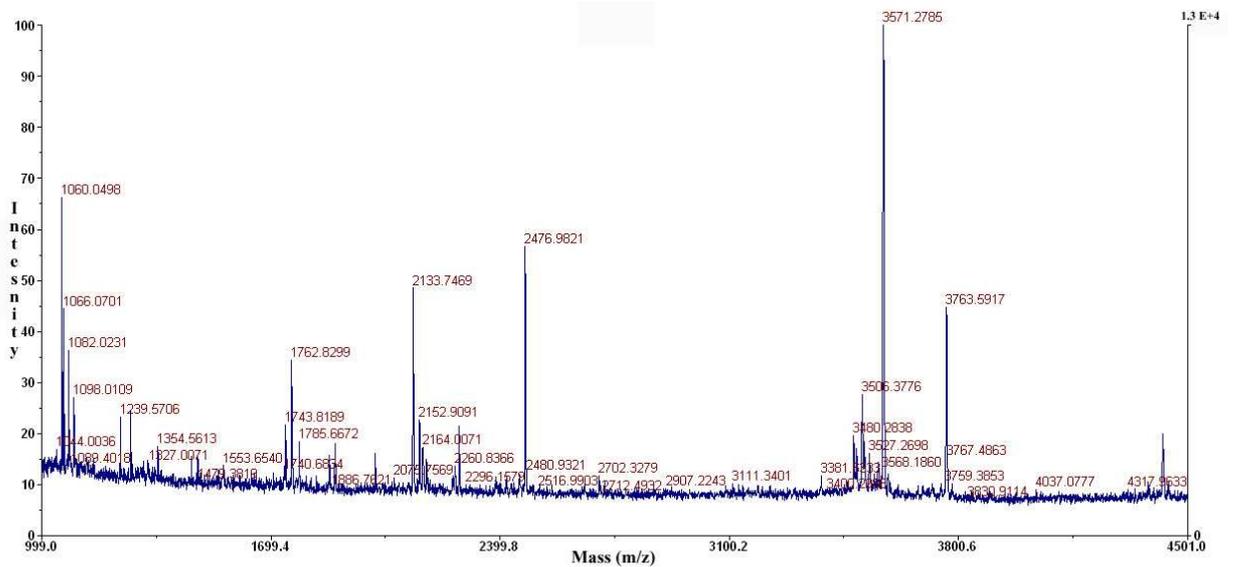
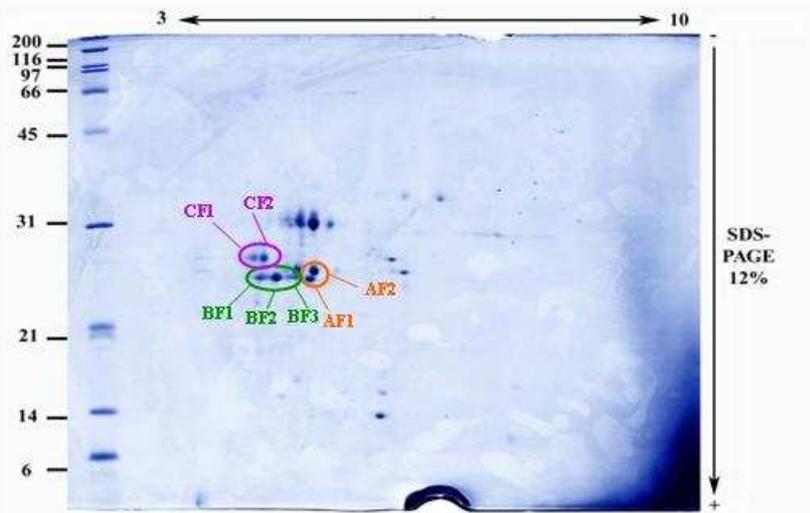
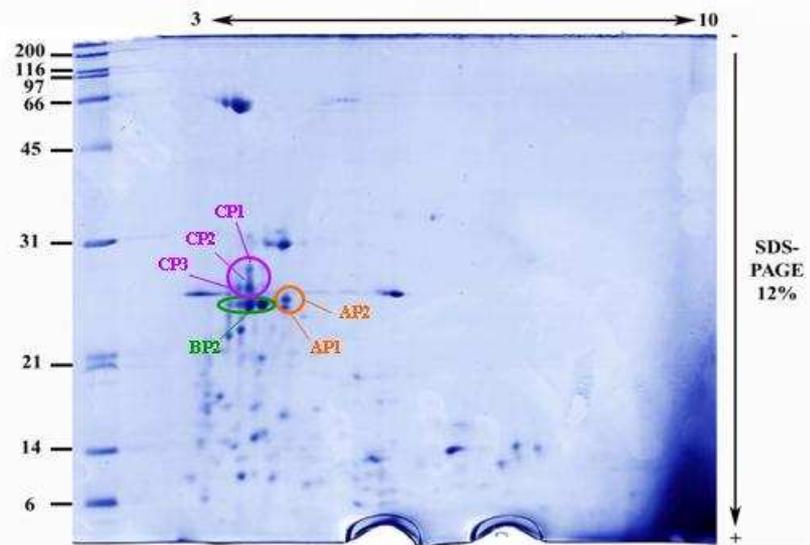


Figura 6.2 - Spettri MALDI-TOF degli spot 1 (A), 2 (B) e 3 (C).

(A)



(B)



(C)

AF1		AF2	AP1		AP2
EsiMass		Esimass	Esimass		Esimass
2016,98		3969,73	2173,1		1420,62
3223,44		2099,91	3307,48		2016,99
3186,37		3222,45	2253,87		2935,34
2173,09		2131,76	4347,18		3186,38
2253,86		3405,23	2946,28		2133,48
2898,23		2242,91	4414,6		3242,17
1535,68		2253,88			4326,12
1127,47		3478,38			2173,1
1010,8		3510,4			3307,49
1453,06		3525,41			2253,87
1038,83		3569,39			2267,89
1349,59		2457,02			2275,85
1420,63		2475,04			2291,76
		2513,97			2676,12
		5314,24			2898,23
					2291,81

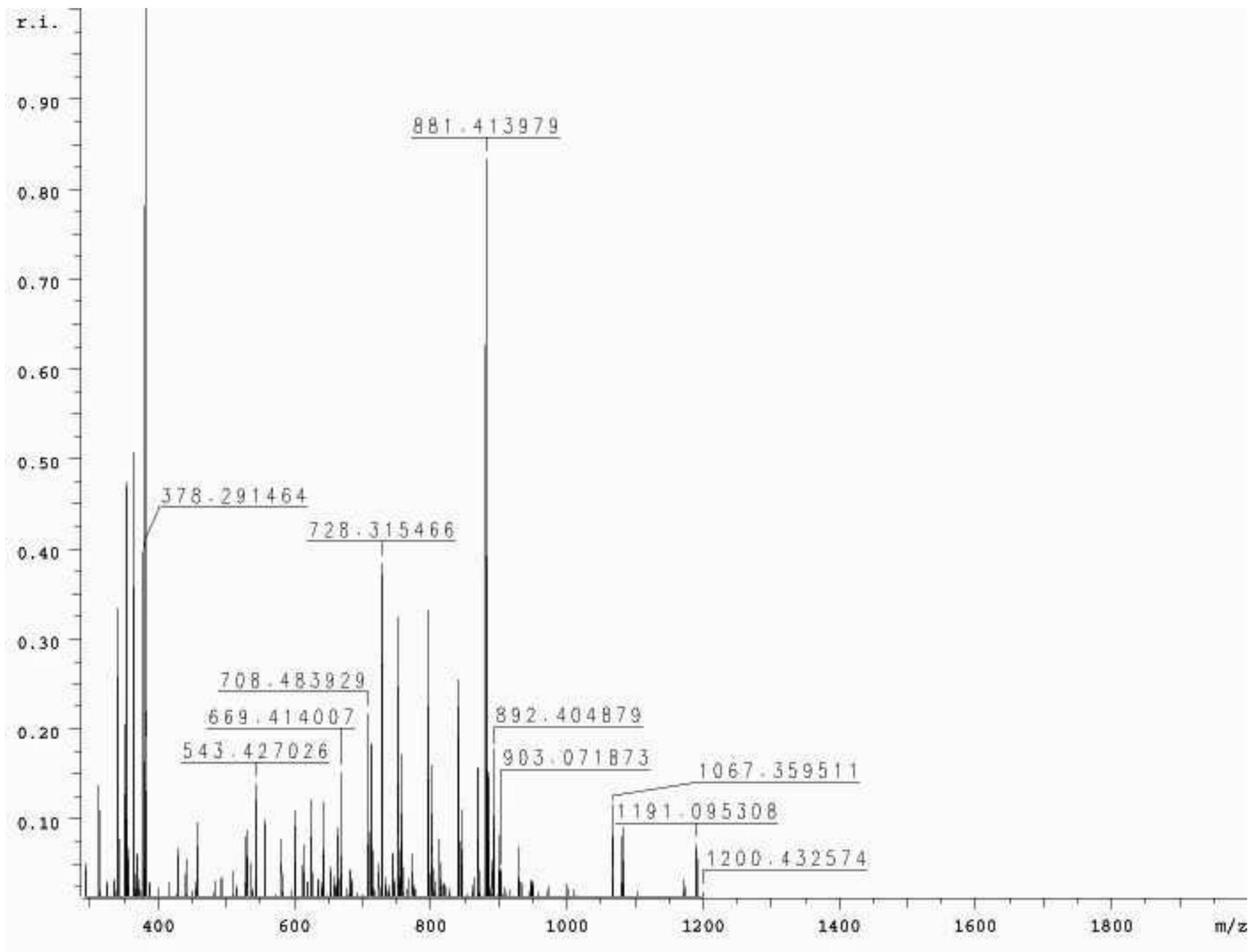
(D)

BF1		BF2	BF3		BP2
Esimass		Esimass	Esimass		Esimass
1760,84		3569,39	1056,8		1056,81
3607,32		1760,84	1084,84		1084,84
1820,77		1074,78	1112,87		1112,87
2131,76		1069,86	1760,84		1782,78
3478,39		1056,81	3608,33		1798,79
3569,39		1028,77	1454,63		1223,53
3569,39		4323,04	1628,69		1283,52
2445,34			2475,03		2169,7
3711,18			2512,97		1454,63
			3607,34		1724,58
					1760,84
					3607,33
					1898,73
					1893,78
					1914,69
					2993,14

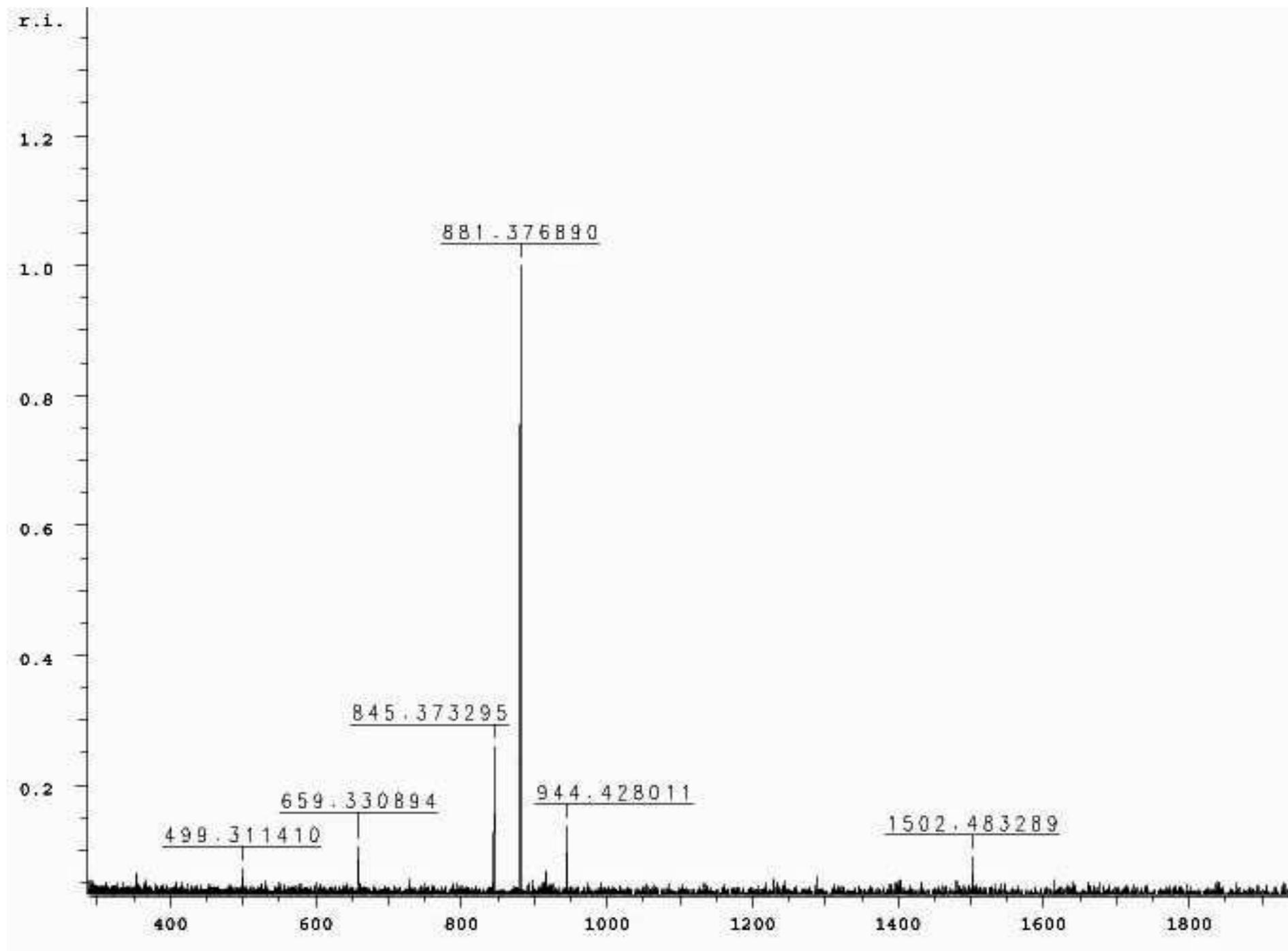
(E)

CF2		CP1	CP2		CP3
Esimass		Esimass	Esimass		Esimass
1284,5		1798,79	1454,62		1932,01
1454,63		1283,52	1628,69		1948
2818,19		1698,87	1681,64		1798,79
2981,25		1760,84	1820,78		
3019,17		1822,66	1914,69		
4219,61		1893,77	2028,89		
3558,42		1948,16	3541,41		
3542,44		3749,33	3777,63		
3777,62		5024,88	2540,98		
2539,96		1454,63	1669,77		
3978,59		2953,22			
2744,04		4986,99			
4090,65		5186,96			
4181,67		3777,63			
2796,23		3558,41			
2959,3					

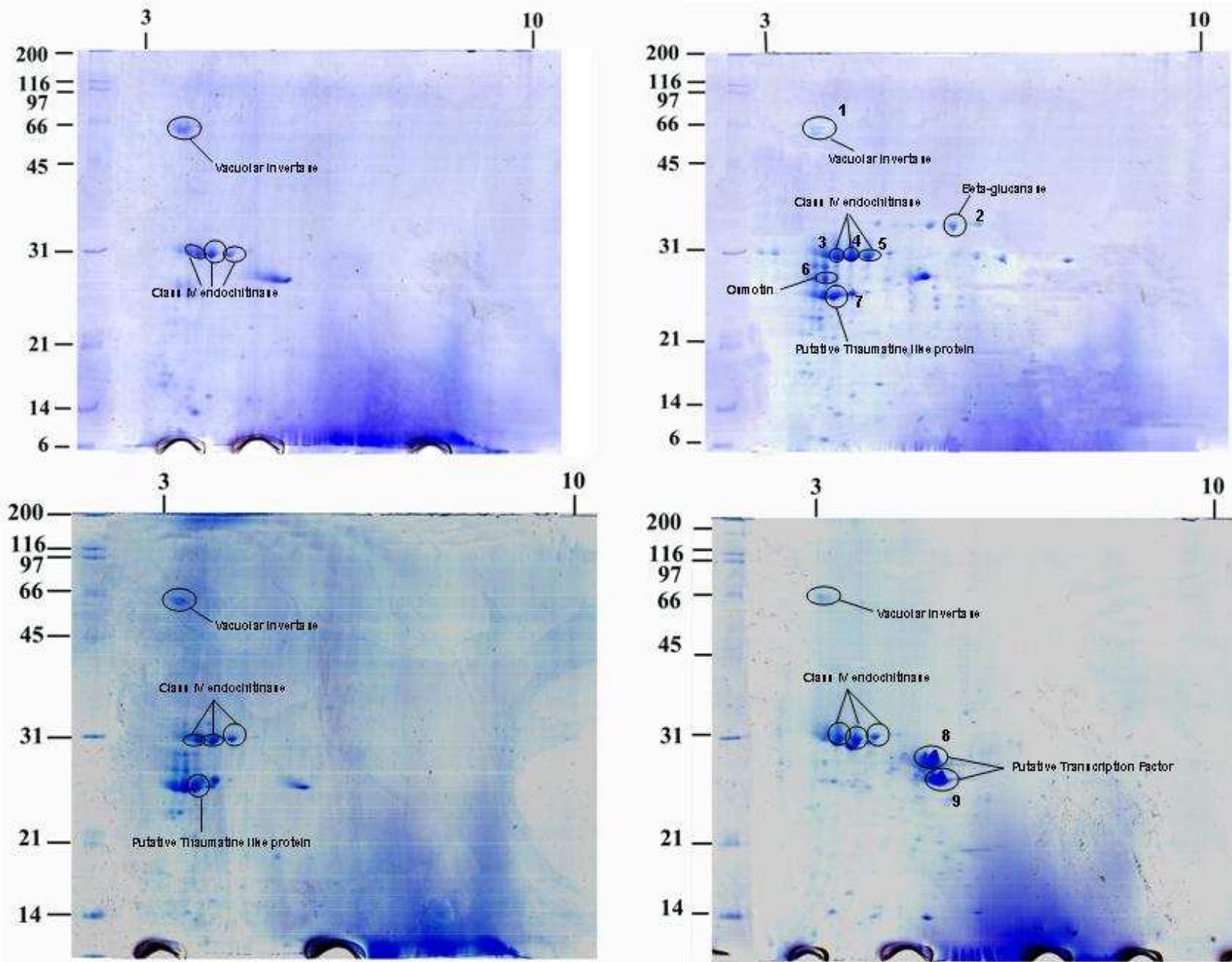
**Figura 6.3** - Elettroforesi 2D pH 3-10; 12% acrilammide delle proteine estratte da bucce di *Isabella* (A) e *Piedirosso* (B). Masse dei peptidi triptici misurate mediante FT-ICR derivanti dagli spot della zona A (C), zona B (D) e zona C (E).



**Figura 6.4** – Spettro FT-ICR MS relativo allo spot BP2 della mappa di *Piedirosso* riportata in figura 5.2



**Figura 6.5** - SORI-CID MS dello ione a doppia carica  $m/z$  881.41 (1762.82 Da) dello spot BP2 digerito con tripsina.



**Figura 6.6** – Elettroforesi 2D pH 3-10; 12% acrilammide in contemporanea delle proteine da buccia di *Aglianico* (A); *Casavecchia* (B); *Piedirosso* (C); *Isabella* (D) con identificazione proteica.

Spot	Proteina (PAN)	Funzione	pI	PM (Da)	Massa Peptidi	Inizio-fine posizione	Score	Sequenza
1	Vacuolar invertase (AAB47171.1)	Metabolismo glucidico	4.60	71546.48	1151,5934 899,4389 1027,5338 1028,5477	317-328 380-386 380-387 1-8	81,1594 64,1026 62,2222 86,6667	(Y)GLD TSAHGPGIK(H) (K)TFYDQVK(K) (K)TFYDQVKK(R) (-)FYNCKVKK(-)
3-4-5	Class IV endochitinase (AAB65777.1)	Difesa-risposta allo stress	5.38	27537.36	1424,6279 1042,5079 1857,0854 2463,2534 1857,963 1858,9476 1867,8528	99-112 152-160 223-240 89-112 222-240 222-240 1-19	60,4938 70,5882 40 53,9007 61,2613 63,964 77,4775	(Y)SGFGNDGSTDANKR(E) (C)VSGQNY YGR(G) (A)INGAVECNGGNTAAVNAR(V) (R)AAFLSALNSYSGFGNDGSTDANKR(E) (R)AINGAVECNGGNTAAVNAR(V) (R)AINGAVECNGGNTAAVNAR(V) (-)GNAVGPMPSCPVTAAVKGR(-)
7	Putative Thaumatin like protein (CAB85636.1)	Difesa-risposta allo stress	4.94	24050.97	1203,573 1145,5789 1283,5201 1454,6282	547-557 21-32 37-48 125-137	46,0317 40,5797 55,0725 37,3333	(R)SSLAVDDVDQR(I) (W)SLNVNAGTTGGR(V) (R)TNCNFDASGNGK(C) (K)TTGGCNPCTVFK(T)
6	Osmotin like protein (CAA71883.1)	Difesa-risposta allo stress	4.56	23874.65	1099,4654 1171,5907 1206,5557 1283,5201 1454,6282 1800,7083	95-103 114-124 184-193 37-48 125-137 178-193	72,549 53,9683 64,9123 60,8696 69,3333 45,1613	(R)CPDAYSYPK(D) (A)DIVGECPAALK(T) (C)NATTYSEFFK(T) (R)TNCNFDASGNGK(C) (K)TTGGCNPCTVFK(T) (C)CNSGSCNATTYSEFFK(T)
2	$\beta$ -glucanase (CAB60154.1)	Difesa-risposta allo stress	6.11	37455.95	1315,6884 1373,6534 2263,054 806,4035 2168,1636	65-75 51-64 43-64 57-62 1-20	68,254 79,0123 39,5349 72,7273 92,3077	(R)TYNSNLIQHVK(G) (W)PSAGGTQTTVDNAR(T) (K)IVMSESGWPSAGGTQTTVDNAR(T) (Y)NQYNIR(R) (-)STALAVVCVLR SYPRHGSPR(-)
8-9	Putative transcription Factor (AAK69513.1)*	Fattore di trascrizione	5.68	16703.01	1743.84 2186.15 1099,19	1-13 72-92 98-106	64,9123 72,5498 53,9657	(-)MEEKHHHH[I/L]FHHK(D) (K)HLEHLGENGVAAGAYALHEK(H) (K)DPEHAHKHK(I)

**Tabella 5.1** – identificazione degli spo proteici mediante nanoLC Q-TOF MS.

\*= spot identificato mediante SELDI-TOF