

Università della Calabria



Dipartimento di Ecologia



Analisi proteomica dell'epicarpo di Limone (Citrus limon [L.] Burm.)

Le qualità biochimiche del limone di Rocca Imperiale



Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale XXII Ciclo (2006-2009)

Supervisore

Prof. Silvia Mazzuca

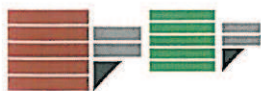
Candidato

Dott. Vittorio Pignataro



*PhD thesis, Doctorate Research Program in Plant Biology
Dept. of Ecology - University of Calabria - Cycle XXII (2006-2009)*

Coordinator Prof. Aldo Musacchio



Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale
XXII Ciclo (2006-2009)
BIO/10

Analisi proteomica dell'epicarpo di Limone
(*Citrus limon* [L.] Burm.)

Le qualità biochimiche del limone di Rocca Imperiale

Coordinatore

Prof. Aldo Musacchio

Supervisore

Prof. Silvia Mazzuca

Candidato

Dott. Vittorio Pignataro

PhD thesis, Doctorate Research Program in Plant Biology
Dept. of Ecology - University of Calabria - Cycle XXII (2006-2009)
Coordinator Prof. Aldo Musacchio

Ai miei nonni



I ricercatori, prima di diventare ricercatori, dovrebbero diventare filosofi. Dovrebbero guardare qual'è il fine dell'essere umano, cos'è che l'umanità dovrebbe creare. I dottori dovrebbero determinare a livello fondamentale da che cos'è che gli esseri umani dipendono per la propria vita.

Nell'applicare le mie teorie all'agricoltura, ho sperimentato vari modi di coltivare i miei raccolti, sempre con l'idea di sviluppare un metodo vicino alla natura. Ho fatto questo eliminando le pratiche agricole non necessarie.

Antes de que los investigadores se conviertan en investigadores, deberían convertirse en filósofos. Deberían considerar cual es la meta humana, qué es lo que la humanidad debe crear. Los médicos deberían primero determinar en su nivel fundamental qué es lo que necesitan los seres humanos para vivir. Aplicando mis teorías a la agricultura, he estado experimentando la forma de hacer crecer mis cultivos de diferentes maneras, siempre con la idea de desarrollar un método cercano a la naturaleza. Esto lo he hecho eliminando prácticas agrícolas innecesarias.

(Masanobu Fukuoka)

<i>Introduzione</i>	<i>pag. 10</i>
<i>Lo stato dell'arte delle biotecnologie proteomiche</i>	
<i>nello studio delle piante</i>	<i>pag. 10</i>
<i>Il sistema di indagine scelto per le attività di ricerca</i>	<i>pag. 16</i>
<i>Capitolo I: Citrus limon (L.) Burm.</i>	<i>pag. 21</i>
1.1 <i>Citrus: un genere antico e complesso</i>	<i>pag. 21</i>
1.2 <i>Generalità agro-economiche di Citrus limon</i>	<i>pag. 25</i>
1.3 <i>Le cultivar di limone in Italia e nel mondo</i>	<i>pag. 28</i>
1.3.1 <i>Le cultivar selezionate e coltivate in Italia</i>	<i>pag. 29</i>
1.3.2 <i>Le cultivar nel resto del mondo</i>	<i>pag. 33</i>
1.4 <i>Lo stato dell'arte della limonicoltura italiana</i>	<i>pag. 34</i>
1.5 <i>Caratteristiche generali del frutto: un frutto aclimaterico</i>	<i>pag. 36</i>
1.6 <i>Le proprietà curative del limone e i suoi principi attivi</i>	<i>pag. 39</i>
1.7 <i>Una pianta di interesse ecologico e paesaggistico</i>	<i>pag. 41</i>
<i>Capitolo II: Studi e tecnologie in proteomica</i>	<i>pag. 44</i>
2.1 <i>La proteomica: una metodologia in continua evoluzione</i>	<i>pag. 44</i>
2.2 <i>L'avanzamento delle tecniche</i>	<i>pag. 45</i>
2.3 <i>Le più moderne applicazioni</i>	<i>pag. 49</i>

<i>Scopo della tesi e collaborazioni instaurate</i>	<i>pag. 58</i>
<i>Capitolo III: Materiali e metodologie</i>	<i>pag. 63</i>
<i>3.1 Modalità di campionamento</i>	<i>pag. 63</i>
<i>3.2 Analisi morfometrica dei frutti</i>	<i>pag. 66</i>
<i>3.3 Analisi chimico-organolettiche</i>	<i>pag. 68</i>
3.3.1 Tecniche di campionamento	<i>pag. 69</i>
<i>3.4 Indagine proteomica</i>	<i>pag. 71</i>
3.4.1 Scelta della cultivar e del protocollo estrattivo	<i>pag. 71</i>
3.4.2 Preparazione del tessuto e rimozione dei composti interferenti	<i>pag. 73</i>
3.4.3 Estrazione delle proteine	<i>pag. 74</i>
3.4.4 Determinazione della concentrazione proteica	<i>pag. 75</i>
3.4.5 Elettroforesi	<i>pag. 77</i>
3.4.6 L'elettroforesi in SDS-PAGE	<i>pag. 81</i>
3.4.7 Isoelettrofocalizzazione (IEF)	<i>pag. 84</i>
3.4.8 Elettroforesi bidimensionale	<i>pag. 87</i>
3.4.9 Analisi d'immagine con software PDQuest e normalizzazione	<i>pag. 90</i>
3.4.10 Preparazione degli spot e digestione in gel con tripsina	<i>pag. 92</i>
3.4.11 Spettrometria di massa mediante LC-MS/MS e MALDI-TOF	<i>pag. 94</i>

3.4.12 Identificazione delle proteine mediante database on-line	<i>pag. 97</i>
<i>3.5 Utilizzo del trattamento ultrasonico</i>	<i>pag. 99</i>
3.5.1 Trattamento con Ultrasound Energy	<i>pag. 99</i>
3.5.2 Protocollo modificato con trattamento ultrasonico	<i>pag. 103</i>
<i>Capitolo IV: Risultati</i>	<i>pag. 108</i>
<i>4.1 Risultati dell'analisi morfometrica dei frutti</i>	<i>pag. 109</i>
<i>4.2 Risultati dell'analisi chimico-organlettica</i>	<i>pag. 119</i>
<i>4.3 Risultati dell'indagine proteomica</i>	<i>pag. 123</i>
4.3.1 L'ettroforesi monodimensionale	<i>pag. 123</i>
4.3.2 L'ettroforesi bidimensionale	<i>pag. 125</i>
4.3.3 Analisi LC-MS e identificazione delle proteine	<i>pag. 127</i>
4.3.4 Estrazione delle proteine con ultrasuoni	<i>pag. 136</i>
4.3.5 Confronto tra mappe 2D ottenute con protocolli TCA/AC e US	<i>pag. 140</i>
4.3.6 Analisi MALDI-TOF e identificazione delle proteine differentemente estratte con i due protocolli estrattivi TCA/AC e US	<i>pag. 147</i>
<i>Discussione</i>	<i>pag. 153</i>
<i>L'indagine proteomica</i>	<i>pag. 155</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>pag. 172</i>
<i>Allegati</i>	<i>pag. 188</i>

INTRODUZIONE



Lo stato dell'arte delle biotecnologie proteomiche nello studio delle piante

Le piante, come tutti gli altri organismi viventi dipendono dalle proteine per svolgere la maggior parte delle loro funzioni vitali. La parola proteina viene dal greco Πρωτεΐνη (prota), che significa: di importanza primaria. Le proteine sono le molecole funzionali che determinano le vie metaboliche e regolatrici in una cellula. La traduzione letterale del termine riflette il ruolo importante svolto dalle proteine in diversi processi cellulari, in quanto presenti come enzimi, recettori, proteine di trasporto, fattori trascrizionali, ormoni, etc. Le proteine sono costituite da uno o più polipeptidi e ciascun polipeptide si compone di lunghe sequenze lineari di 20 unità che si ripetono: gli aminoacidi.

Il vocabolo, più moderno e maggiormente utilizzato, Proteomics, racchiude nel suo significato tutte le analisi su vasta scala delle proteine nei sistemi biologici in un dato momento della loro vita o del loro sviluppo, obiettivi per identificare lo stato più completo possibile delle proteine e per caratterizzare le loro modificazioni qualitative e quantitative in risposta a cambiamenti ambientali, di crescita e differenziamento.

La proteomica è una tecnologia relativamente recente che subisce rapidamente sviluppo su sviluppo, complementata dagli studi genomici e trascrittomici come pure da quelli di altro campo emergente, la metabolomica. Numerosi risultati si sono ottenuti dalle analisi proteomiche sull'organismo umano,

animale e di forme di vita microbiche, il regno delle piante attende ancora un metodo sistematico per l'analisi del proteoma. A tale necessità sta rispondendo, ad esempio, la creazione di una avanzata rete integrata tra i centri di ricerca all'avanguardia ed i migliori ricercatori che si occupano di proteomica vegetale (COST Domain Committee, 2008).

Gli strumenti per l'analisi del proteoma vegetale nelle diverse aree di ricerca sia di base che applicata vengono via via sviluppati ed organizzati, per generare le informazioni fondamentali sulle piante e sui loro metabolismi; la proteomica, inoltre, è applicata allo studio delle risposte ai vincoli ambientali e, più recentemente alla valutazione della qualità dei prodotti alimentari. Questo approccio aumenta l'interesse da parte di un pubblico che conosce e capisce sempre meglio le nuove tecnologie e la loro importanza e che diventa sempre più critico nei confronti di un ulteriore sviluppo dell'industria fine a se stesso (COST Domain Committee, 2008).

Oggi tutto ciò è attuabile grazie agli enormi passi avanti compiuti in campi come la genomica e la bioinformatica che consentono di conoscere ed utilizzare sequenze geniche di nuovi organismi che fino a un decennio fa presentavano grosse difficoltà nel sequenziamento, perché portatori di genomi molto complessi. È di recente introduzione la tecnica del pirosequenziamento, sviluppata e descritta per la prima volta da Mustafa Ronaghi *et al.* (1998) e ad oggi migliorato e implementato per lo studio di trascrittomi anche molto grandi. Questa tecnica si basa sull'utilizzo di una serie di enzimi che producono luce in presenza di ATP quando un nucleotide viene

incorporato nel filamento (ad opera della DNA polimerasi). Dopo l'incorporazione, i nucleotidi non incorporati vengono lavati via ed un nuovo ciclo ricomincia con l'introduzione di nuovi nucleotidi. Per ogni ciclo viene introdotto un unico nucleotide e l'incorporazione di questi nel filamento genera una quantità di luce che è proporzionale al numero di basi incorporate in un'unica aggiunta di nucleotidi (ad esempio, nel caso di una sequenza omopolimerica tipo AAA, TTT, GGG o CCC, la quantità di luce liberata è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati, in questo caso 3. Il lampo di luce viene registrato da un sensore CCD che ne registra l'intensità ed in base a questo può ricostruirne la sequenza (Ronaghi *et al.*, 1998; Ronaghi *et al.*, 1996).

Il *pyrosequencing* dal 1998 in poi è stato migliorato e reso estremamente più rapido in quanto automatizzato nel 2007 ed oggi permette il sequenziamento della catena complementare. È un metodo enzimatico che prevede cinque passaggi fondamentali: 1) La sequenza da analizzare, previa amplificazione con PCR, viene incubata come singola elica. 2) Un solo tipo di dNTP (deossi-nucleotide-tri-fosfato) alla volta viene aggiunto alla reazione. 3) Il PPi (pirofosfato inorganico) così prodotto viene quindi rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD) mediante la produzione di un segnale luminoso registrato in un apposito "pirogramma". 4) L'enzima apirasi degrada in continuazione l'eccesso di dNTP che non è stato incorporato e l'eccesso di ATP prodotto dalla solforilasi. 5) Si aggiungono quindi ciclicamente tutti e 4 i dNTP fino al completamento della sequenza (Nyrén, 2007).

Grazie al pirosequenziamento è stato possibile prima della fine del 2009, conoscere il trascrittoma dell'olivo, così come sono noti i genomi di altre piante di interesse agronomico, quali vite, pomodoro, patata, riso e mais, ovvero la parte espressa dei loro genomi. Nel caso dell'olivo la ricerca si è concentrata sul sequenziamento di geni di due varietà che presentano una alto e l'altra basso contenuto in polifenoli. Sono state individuate decine di migliaia di nuovi geni, molti dei quali controllano la formazione dei trigliceridi, dei polifenoli e delle sostanze aromatiche che sono alla base del "bouquet" dell'olio.

Questa ricerca, oltre a permettere una migliore comprensione delle proprietà organolettiche e peculiari dei prodotti agroalimentari, potranno contribuire a promuovere e difendere le produzioni tipiche italiane e costituisce un passo importante verso la decodifica dell'intero genoma di queste piante (Alagna *et al.*, 2009).

Ancora più recente è la decodifica del genoma di patata, altra specie vegetale di ampissimo interesse agronomico a livello mondiale. L'annuncio è stato dato dal "Potato Genome Sequencing Consortium" (PGSC), un gruppo internazionale di istituzioni scientifiche di 15 Paesi (van Os *et al.*, 2006).

Si tratta di un risultato scientifico di grande rilevanza poiché il genoma della patata è lungo 840 milioni di basi ed è tetraploide, cioè è presente in quattro copie per cellula. Per queste sue caratteristiche il miglioramento genetico tramite incrocio è particolarmente laborioso. Sono stati sequenziati due ceppi diversi di patata,

rappresentativi della diversità genetica di questa pianta. L'assemblaggio della sequenza è stato ottenuto grazie al recente sviluppo di tecniche di sequenziamento del DNA ad elevato parallelismo e di algoritmi informatici sviluppati dal Beijing Genomics Institute (Margis *et al.*, 2008).

Grazie allo sviluppo di queste tecnologie è oggi possibile conoscere il genoma o il trascrittoma di piante meno studiate, ma ugualmente importanti a livello agronomico e salutistico come Citrus, genere diffuso in tutti e cinque i continenti.

Nel 2005 sono stati pubblicati i risultati di un progetto di genomica funzionale al quale ha preso parte l'Istituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (www.ivia.es; Forment *et al.*, 2005; Terol *et al.*, 2008;), che rendono note, tramite una descrizione molecolare, le caratteristiche biologiche ed agronomiche principali degli agrumi. Come parte fondamentale di questo progetto è stata realizzata una collezione di EST di agrumi partendo da 25 biblioteche di cDNA conosciuti relativi ai differenti tessuti, in relazione alle fasi di sviluppo ed alle condizioni di stress (Martinez-Godoy *et al.*, 2008). La "collezione" include complessivamente 22.635 ESTs di alta qualità, raggruppati in 11.836 unigenes putativi, che rappresentano almeno un terzo del numero totale di geni valutato nel genoma di *Citrus* (Forment *et al.*, 2005; Luro *et al.*, 2008).

Ha rappresentato un primo passo per arrivare alla caratterizzazione del trascrittoma completo di *Citrus*, si tratta infatti di 12.672 cloni, rappresentanti 6.875 unigenes presunti o per meglio dire, trascritti unici ed i cDNA ottenuti risultano

attualmente la banca dati genomica maggiormente usata per gli studi sull'espressione dei geni (Talon *and* Gmitter, 2008, Song *et al.*, 2009).

Inoltre altre sequenze ESTs di *Citrus* sono state ottenute dal “Progetto del Millennio (IAC Cordeirópolis)”. Differenti tessuti (foglia, corteccia, frutto, radice e fiore) di differenti specie di agrumi sono state sottoposte a stress biotici e abiotici per essere quindi esaminate a differenti stadi di sviluppo (individui adulti *vs* giovani). Sono state costruite parecchie librerie di cDNA e le sequenze ottenute hanno formato il database di ESTs del genere *Citrus* (CitEST) con quasi 200.000 sequenze (Mehta *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2009).

Grazie a questo vasto progetto è stato possibile descrivere importanti pathways riscontrati in *Citrus*, tra cui: Calcium signaling; Cytokinin signaling; Ethylene signaling; ABA signaling; Sugar signaling; Jasmonic acid signaling; COP9; Kinases and phosphatases; Inositol phosphate (Sugiyama *et al.*, 2007; Terol *et al.*, 2007), che esplicano un mondo complesso quale quello di un genere di pianta millenaria che è arrivata fino ai giorni nostri dopo aver subito innumerevoli incroci, modificazioni, spostamenti e adattamenti.

Risulta fondamentale, al fine di voler comprendere le innumerevoli funzionalità di un sistema vegetale complesso come *Citrus* (Mehta *et al.*, 2007), soffermarsi su uno specifico compartimento di uno specifico organo, quale può essere il pericarpo (flavedo) nel frutto, dopo aver scelto una specie e selezionato una o più varietà tra loro messe a confronto in base ad alcune variabili ambientali che si vogliono

considerare. Tutte le variabili e le condizioni di sviluppo e di crescita sono scelte in funzione del loro interesse agro-fisiologico, del periodo di maturazione, delle caratteristiche pedo-climatiche, delle tecniche di coltivazione e dell'importanza merceologica del prodotto.

Il sistema di indagine scelto per le attività di ricerca

Le attività di ricerca di questa tesi si sono focalizzate su uno specifico tessuto del frutto di *Citrus limon* scelto per la sua funzione di interfaccia tra l'interno dell'esperidio e l'ambiente circostante. Il flavedo infatti costituisce la barriera che si interpone a protezione del frutto e che subisce per primo ed in forma diretta tutte le avversità e gli attacchi che provengono dall'esterno, che possono essere di origine naturale come le variazioni fisico-meteorologiche oppure determinate volontariamente dall'uomo con le pratiche colturali.

Tramite l'indagine di tipo proteomico è stato condotto uno studio biomolecolare per conoscere le condizioni di risposta o di adattamento di questo tessuto chiave nella fisiologia di una pianta complessa e multigenica come *Citrus limon* e di conseguenza, anche più in generale, l'eventuale risposta ed adattamento nelle altre specie dello stesso genere. Risulta essere un esempio di approccio unico sul limone, frutto finora poco studiato dal punto di vista proteomico, quindi ancora più stimolante ai fini della ricerca.

Obiettivo prioritario del lavoro è stato ottenere un quadro il più completo

possibile delle proteine presenti nel flevedo e coinvolte nelle dinamiche fisiologiche del sistema frutto. A tale scopo è stato messo a punto un protocollo estrattivo delle proteine totali dal tessuto, che come è noto è ricco di prodotti secondari quali: acidi grassi, pigmenti, pectine e lipidi, in particolare oli essenziali di cui le “bucce” degli agrumi sono ricche e che però interferiscono con l'estrazione proteica (Pignataro *et al.*, 2009).

Parallelamente sono state effettuate anche analisi di tipo morfo-anatomico e biochimico per conoscere lo stato di qualità del frutto e rilevare così le eventuali corrispondenze tra i risultati di queste indagini con i dati ottenuti dall'analisi proteomica. Il riscontro più interessante si è verificato tra il numero più consistente di sincizi ghiandolari costituiti dalle ghiandole dell'olio essenziale, anch'esse di grandezza maggiore in una specifica varietà e la percentuale di limonene misurata in gas cromatografia e spettrometria di massa (GC-MS), risultata più alta nella stessa varietà (Pignataro, 2008).

Alla luce di tali riscontri è proprio l'indagine proteomica lo strumento più adatto ad avvalorare la tesi della corrispondenza tra le caratteristiche isto-chimiche e quelle bio-molecolari del frutto con la missione specifica di individuare gli enzimi chiave implicati nella sintesi dei monoterpeni, come la limonene sintasi o la monoterpene sintasi che regolano la produzione del limonene, del β -pinene e del γ -terpinene. Altre molecole presenti nel frutto di limone come le xantofille e i carotenoidi svolgono un ruolo altrettanto importante se inserite in maniera sistematica nell'alimentazione

umana. Infatti, oltre a conferire al pericarpo maturo il tipico colore giallo, questi pigmenti hanno un ruolo ancora più importante per salute dell'uomo, in quanto ottimi antiossidanti, preservando l'organismo dall'attacco dei radicali liberi. Naturalmente anche la produzione di queste molecole è regolata da enzimi specifici presenti nel flavedo da poter individuare ed analizzare nei patterns proteici ottenuti.

Per contro, queste molecole non proteiche interferiscono severamente con l'estrazione delle proteine e rendono "il flavedo" un tessuto con ambiente eterogeneo e quindi difficile da trattare con un protocollo di estrazione proteica standard. Da cui la necessità di mettere a punto un protocollo multi-steps, specifico, che purifichi le proteine e allontani le sostanze interferenti. Esternamente sono presenti, infatti, cellule organizzate in sincizi ghiandolari che determinano un ambiente idrofobico. Via via che si passa agli strati più profondi del tessuto l'ambiente diventa idrofilico con "l'albedo". Questo è in contiguità col flavedo ed è ricco in pectine che a loro volta inficiano l'estrazione delle proteine per via del loro stretto legame con la componente cellulosica delle cellule.

L'importanza dello studio proteomico emerge quando da questo si possono ricavare informazioni utili che riguardano la risposta del frutto agli stimoli da stress biotico o abiotico, provenienti dall'ambiente esterno.

Il ruolo che il flavedo svolge nell'esperidio è di proteggerlo dagli attacchi esterni di parassiti o patogeni di natura fungina o batterica; contrastare l'impatto con le basse temperature invernali, che coincidono col periodo della sua maturazione,

grazie alla produzione e all'accumulo delle sostanze lipofile quali gli oli essenziali, che inoltre costituiscono una barriera organica nei confronti delle molecole minerali o di sintesi utilizzate durante i trattamenti agronomici con effetto anticrittogamico.

Il quadro completo delle proteine totali del tessuto può fornirci le informazioni utili per conoscere lo stato fisiologico e bio-molecolare del flavedo ed in parte anche delle condizioni generali del frutto, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo.

L'individuazione di determinate proteine o enzimi può tradursi, in termini molecolari, nello stato di salute, quindi di attività metabolica, di stress o in cui un organismo versa in un dato stadio di maturazione o sviluppo oppure in base alle sollecitazioni derivate dall'impiego di specifiche pratiche di coltivazione.

Inoltre gli eventi di stress a seguito di sollecitazioni ambientali, quali ad esempio il repentino abbassamento delle temperature o la carenza idrica possono indurre la pianta a reagire con un sistema di difesa costitutivo ed elicitato generalmente, riscontrato a livello proteico con l'espressione e l'aumento di proteine quali ad esempio le Heat Shock Proteins (HSP) a diverso peso molecolare e dalle diverse funzioni e modello dello stimolo.

Questo studio si propone di indagare appunto, nelle complesse reazioni stimulate dai diversi stress biotici e abiotici a cui le piante sono sottoposte focalizzando l'attenzione a livello delle proteine come *biomarker*.

CAPITOLO I



Citrus limon (L.) Burm.

Capitolo I: *Citrus limom (L.) Burm.*

1.1 *Citrus: un genere antico e complesso*

Gli agrumi sono conosciuti e coltivati da millenni in tutto il mondo per il loro alto valore curativo, mistico e religioso, ma soprattutto per la loro notevole capacità di adattamento ad un'ampia fascia climatica e per la versatilità di impiego che li vede protagonisti nel consumo fresco e trasformato ma anche in settori *non-food* come la cosmetica o la profumeria che ne fa aumentare il loro già notevole valore economico.

Citrus però è un genere di pianta tra le più difficili da migliorare con i metodi tradizionali di allevamento. Attualmente, l'insorgere di nuove malattie (es. malsecco, tristezza) sta mettendo a serio rischio intere regioni coltivate ad agrumi minacciando di limitare la disponibilità di prodotto per il futuro. Mentre le tecnologie avanzano velocemente in campo genomico e proteomico, i "vettori", cioè gli organismi portatori delle malattie si adattano e mutano rapidamente sollecitando a lavorare a nuove sfide biotecnologiche per difendere il sistema pianta e le industrie di trasformazione di tutto il mondo.

Oggi, gli sviluppi nella ricerca in campo genomico su *Citrus* ci danno molte informazioni e ci descrivono diverse molecole e i processi in cui esse sono coinvolte: *linkage mapping*, indicatori biochimici in funzione delle metodologie di coltivazione, le sequenze di molti geni trascritti grazie a progetti di EST che hanno visto ampie collaborazioni internazionali tra i ricercatori, le mappe fisiche, grazie a recenti progetti internazionali per il sequenziamento del genoma di *Citrus*. Questi traguardi ci permettono di svolgere in maniera più attendibile e sicura un'analisi funzionale.

Malgrado le sfide per continuare ad indagare sulle funzionalità ancora nascoste degli agrumi è evidente un progresso sostanziale. I ricercatori di *Citrus* si sono coordinati in collaborazioni internazionali che forniscono ottimismo circa i risvolti futuri ed i contributi a vantaggio delle industrie agrumicole ad ogni latitudine ed alla popolazione umana che può contare su una disponibilità dei raccolti a venire, nonché un miglioramento nelle promozioni, sia estetico che qualitativo dei frutti (Talon *and* Gmitter, 2008).

Gli agrumi e alcuni rappresentanti dei generi a loro filogeneticamente più affini sono in parte compatibili sessualmente a vari livelli; le specie e le varietà di *Citrus* per la maggior parte sono diploidi, se ne conoscono alcuni come triploidi, mentre esistono forme tetraploidi occasionali ($2n = 2x = 18$) e possiedono genomi verosimilmente piccoli (per esempio, il genoma di arancio dolce presenterebbe intorno a 367 Mb, circa tre volte quello di *Arabidopsis* (Arumuganathan *and* Earle, 1991). Come tale, la specie dovrebbe essere ideale negli studi relativi alla ricerca genomica, sviluppati con metodologie come la mappatura genica e fisica, il riordino del genoma completo e gli studi di genomica funzionale che puntano a chiarire la complessità di quei caratteri che hanno un ruolo chiave.

Alcune varietà di *Citrus* subiscono l'attacco di malattie molto dannose, come il cancro che si sviluppa sui frutti e sulle foglie che presentano lesioni dovute al freddo, che diventano presto bersaglio del batterio Gram negativo *Xanthomonas axonopodis*. Si è scoperto che tale problema è favorito dall'assenza di determinate caratteristiche geniche importanti all'interno di alcune specie, presenti invece in altre di generi affini, in particolare quei caratteri riconducibili alla tolleranza e resistenza al

freddo come nel caso della varietà kumquat (gen. *Fortunella*) o ancora, in *Poncirus trifoliata*, dove esistono caratteri multipli come la tolleranza alla malattia e la resistenza agli stress (comprese le gelate, l'attacco della *Phytophthora*, vettore del virus della tristezza negli agrumi (CTV), o del nematode *Tylenchulus semipenetrans*).

Molti dei progetti sulle mappe geniche ed alcune delle mappe fisiche hanno evidenziato questi caratteri su degli ibridi intergenici ottenuti tra *P. trifoliata* incrociata con il genere *Citrus* (Talon and Gmitter, 2008).

Il quadro genomico del genere *Citrus*, grazie ai dati raccolti dai recenti progetti, appare così strutturato: dal lavoro di Shimada *et al.* (2005) che ha realizzato un microarray cDNA per monitorare l'espressione dell'mRNA di 2.213 geni durante lo sviluppo del frutto. Da allora ad oggi sono state sviluppate parecchie piattaforme di microarray del DNA degli agrumi.

Il consorzio spagnolo SCGC (*Spanish Citrus Genomic Consortium*) di genomica degli agrumi ha sviluppato una prima generazione di cDNA microarray che contiene 12.672 sonde che corrispondono a 6.875 geni presunti dei 22.000 EST presenti nella collezione (Forment *et al.*, 2005).

Successivamente è stato rilasciato dal consorzio spagnolo un nuovo microarray di seconda generazione contenente 12.000 geni. Poco tempo dopo ne è stata realizzata una versione con maggiore affidabilità, composta da 24.000 cDNA rispetto alla precedente che ne conteneva 20.000, basata su quasi 90.000 sequenze di alta qualità generate da 52 differenti biblioteche di cDNA (Marques *et al.*, 2009).

Le conoscenze finora acquisite aprono nuovi ventagli di possibilità che ci permetterebbero di ottenere degli ibridi più resistenti e tolleranti agli stress e alle

malattie, scegliendo tra i caratteri più lontani, che le piante di agrumi sembrano aver perso, ma che ritroviamo conservati nel patrimonio genetico di piante affini più antiche e dallo scarso valore alimentare ed economico e, proprio per questo ben conservate e resistenti. La collocazione tassonomica e le conoscenze biochimiche di *Citrus limon*, fino ad arrivare a livello di specie sono riportate nelle Tab.1.1, -2 e -3.

Tabella 1.1

Limone		
Cellular organisms	Eukaryota	Viridiplantae
Streptophyta	Streptophytina	Embryophyta
Tracheophyta	Euphyllophyta	Spermatophyta
Magnoliophyta	eudicotyledons	Core eudicotyledons
rosids	Eurosids II	Sapindales
Rutaceae	<i>Citrus</i>	<i>C. limon</i> [L.] Burm.

Fonte NCBI (Tab.1 e Tab.2)

Tabelle 1.1. e 1.2. *Classificazione del genere Citrus fino alla specie Citrus limon. (Tab. 1.1). Quadro dei risultati biochimici e bioinformatici ottenuti allo stato attuale su limone. (Tab. 1.2).*

Tabella 1.2	
Database name	Direct links
Nucleotide	123
Nucleotide EST	1505
Protein	74
Popset	21
GEO Datasets	1
UniSTS	11
PubMed Central	56
Taxonomy	1

Tabella 1.3

Classificazione scientifica

Regno: [Plantae](#)

Divisione: [Magnoliophyta](#)

Classe: [Magnoliopsida](#)

Ordine: [Sapindales](#)

Famiglia: [Rutaceae](#)

Genere: [Citrus](#)

Specie: *C. × limon*

Nomenclatura binomiale

Citrus × limon

(L.) Burm.f.

Fonte wikipedia (Tab.1.3 e Fig.1.1)

Tabella 1.3 *Classificazione tassonomica del limone.*



Figura 1.1. Rappresentazione delle parti distintive della pianta di limone. Il frutto (esperidio) intero ed in sezione, i semi, le foglie, il fiore intero e le sue componenti.

1.2 Generalità agro-economiche di *Citrus limon*

È una pianta originaria dell'Asia sud-orientale, introdotta nel bacino del Mediterraneo dagli Arabi intorno all'anno 1000. Secondo alcuni studiosi l'albero del limone è un ibrido naturale tra il cedro (*Citrus medica*) ed il lime (*Citrus aurantifolia*) [Allegato 1].

L'albero del limone ha un'altezza variabile da 3 a 6 metri ed è un sempreverde molto ramificato, dall'aspetto ornamentale, corteccia grigia e foglie brillanti, rossastre da giovani e delle tonalità verdi in età matura, spesso ellittiche e prive di stipole. Durante l'attività vegetativa, le foglie possono essere esaminate per verificare la presenza di eventuali carenze nutrizionali o stress vegetativi della pianta con un esame fogliare.

Il limone è una specie rifiorente, in condizioni climatiche adatte si ha vegetazione quasi continua con produzione di frutti tutto l'anno. La fioritura più importante però è quella primaverile (aprile-maggio) che consente la maturazione da ottobre fino ad aprile dei frutti detti "el prodott" o "limone d'inverno". La fioritura da giugno ad agosto porta alla produzione da aprile a maggio del limone "bianchetto".

La fioritura da aprile ad ottobre porta alla produzione dei "verdelli" che si raccolgono da giugno ad ottobre dell'anno successivo.

Il frutto ha una forma ovoidale con umbone all'apice, la buccia giallo lucida ed una polpa racchiusa in otto/dieci spicchi (o logge), dal gusto molto acido.

Esistono diverse tipologie di esperidio:

- limone a frutto globoso

- limone piriforme
- limone senza umbone
- limone a polpa sanguigna
- limone dolce
- limone a foglie strette

La pianta del limone è molto sensibile al freddo e si defoglia completamente a temperature intorno ai $-4/5^{\circ}\text{C}$. Se la temperatura si abbassa oltre questi livelli, si rischia anche il danneggiamento della corteccia. Fiori e frutti resistono fino a -2°C . Le piante sono molto sensibili anche al vento. D'altra parte l'albero del limone non richiede elevate temperature perché i frutti raggiungano la piena maturazione. In periodi di forte siccità è necessaria un'irrigazione costante per non compromettere negativamente la pezzatura e la qualità dei frutti, tuttavia l'albero cresce bene anche in terreni poveri, sebbene il pH ottimale sia tra 5,5 e 6,5. Le gelate primaverili sono molto dannose soprattutto perché causano aborti fiorali con un inevitabile calo della produzione annuale di frutti.

Sicuramente il clima e le temperature determinano la sopravvivenza dei limoneti, ma ne influenzano anche la produzione, infatti, nel mondo si individuano facilmente le zone che presentano le caratteristiche pedoclimatiche più adatte alla limonicoltura.

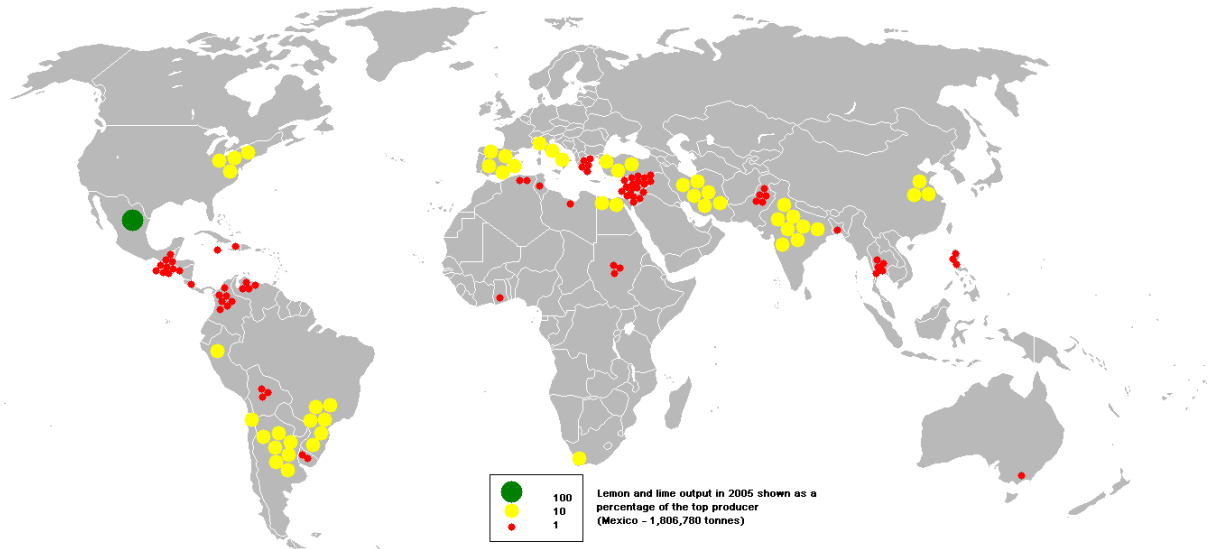


Figura 1.2. Mappa dei principali paesi produttori-esportatori

Nella figura 1.2 sono rappresentate in verde le aree a più alta percentuale di produzione, come il Messico, in quanto ad esportazione. La percentuale diminuisce man mano nelle aree segnate in giallo ed in rosso.

<i>Tabella 1.4</i>					
Paese	India	Messico	Argentina	Brasile	Spagna
<i>Tonnellate</i>	<i>2,060,000</i>	<i>1,880,000</i>	<i>1,260,000</i>	<i>1,060,000</i>	<i>880</i>
Paese	Cina	U.S.A.	Turchia	Iran	Italia
<i>Tonnellate</i>	<i>745,1</i>	<i>722</i>	<i>706,65</i>	<i>615</i>	<i>546,58</i>
Per un totale mondiale di produzione pari a 13,032,388 Tonnellate annue.					

Tabella 1.4. I dati si riferiscono solo all'anno 2007. Fonte: Dati stimati dalla FAO (Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic And Social Department: The Statistical

Devisio).

Nella tab. 1.4 si può osservare come l'India sia uno dei migliori produttori con il ~16% della produzione mondiale, seguita da Messico (~14.5%), Argentina (~10%), Brasile (~8%) e Spagna (~7%).

L'Italia occupa invece gli ultimi posti se si fa riferimento soltanto alla produzione di tonnellate totali. Il discorso cambia se si calcola la produzione relativa, per esempio in base alla superficie coltivabile; in questo caso, l'Italia risulterebbe un produttore apprezzabile in campo limonicolo, anche grazie ad una migliore qualità del prodotto, dovuta alle condizioni pedoclimatiche favorevoli, perché influenzate dall'effetto mitigatore del Mar Mediterraneo. La produzione in territorio italiano è così distribuita (90% Sicilia e il restante 10% tra Calabria e Campania).

1.3 Le cultivar di limone in Italia e nel mondo

Prima di passare in rassegna alcune delle diverse cultivar nazionali, fermiamoci sulla definizione di cultivar: la parola nasce dalla contrazione inglese *cultivated variety*, termine coniato nel 1952, durante il XII Congresso Internazionale di Orticoltura, per designare la tassonomia delle varietà di piante coltivate e distinguerle così dalla classificazione delle piante coltivate allo stato spontaneo.

Alcune delle cultivar italiane della specie *C. limon* (limone) ritenute più meritevoli di diffusione sono il Femminello comune, alcune delle sue selezioni clonali (Femminello comune apireno, Femminello incappucciato, Femminello siracusano, Femminello a Zagara bianca) e l'Interdonato (cultivar locale), che sono annoverate tra le più conosciute ed utilizzate per i loro pregi.

1.3.1 *Le cultivar selezionate e coltivate in Italia*

Femminello comune (o Femminello ovale o "Ruvittaru")

È la cultivar più diffusa in Italia (circa il 70%) e comunque la varietà più rappresentativa della Sicilia. La pianta ha un vigore medio ed è quasi completamente priva di spine. Le foglie sono dette "di camelia" ed il frutto, oblungo e di media pezzatura, produce un succo abbondante, chiaro e molto aromatico. Adatto alla forzatura, il femminello comune ha una tolleranza media al Malsecco e da una produzione costante ed abbondante. Attualmente viene coltivato soprattutto in Sicilia (Catania, Siracusa, Palermo, Messina) ed in Calabria (Rocca Imperiale, Piana di Sibari e Reggio Calabria). Di origine sconosciuta ma coltivata già da tempi remoti in Sicilia, questa cultivar ha dato origine, attraverso mutazioni gemmarie, a numerose cultivar locali e selezioni clonali (Santa Teresa, a Zagara bianca, Incappucciato, Sfusato di Favazzina in Calabria, Quattrocchi, Scandurra) con tolleranza al Malsecco e con caratteristiche morfologiche e bio-agronomiche più o meno diverse.

Il Femminello comune è una cultivar altamente rifiorente con elevate capacità di allegagione, di cui si possono elencare ben cinque fioriture annuali, a cui corrispondono diverse denominazioni di fruttificazione.

La più importante, almeno per il valore qualitativo, è la prima fioritura, la quale produce frutti che maturano da ottobre a marzo. Sono i cosiddetti limoni invernali caratterizzati da un epicarpo più o meno rugoso, elevata acidità ed un numero variabile di semi. I frutti più precoci di questa prima fioritura, quelli che maturano tra settembre e ottobre, sono detti Primofiore e sono molto quotati sul mercato. Abbiamo poi frutti detti "maiolini", "biancucci" o "bianchetti", caratterizzati da un epicarpo poco

rugoso, un colore giallo pallido, pochi semi ed una minore acidità. Molto spesso fruttificano a grappolo e la maturazione avviene tra aprile e maggio. I famosi “verdelli” giungono invece a maturazione nell'estate dell'anno seguente e si piazzano sul mercato con ottimi prezzi. I verdelli, che solitamente si formano a grappolo, hanno un epicarpo più liscio, un'acidità bassa e quasi nessun seme (tecnicamente si dice che i semi sono abortiti). Ci sono poi i cosiddetti “bastardi” che maturano dopo circa un anno e si caratterizzano soprattutto per l'epicarpo liscio e il colore giallo intenso. Vanno infine ricordati i “marzani”, raccolti solitamente insieme ai limoni invernali. Non sono mai numerosi, hanno una forma più o meno rotondeggiante, epicarpo rugoso, umbone largo e schiacciato, un certo numero di semi ed un'acidità elevata.

Femminello Zagara bianca (o Fior d'arancio)

Di probabile derivazione (per maturazione vegetativa) del “Femminello comune”, questa pregiata cultivar, ben tollerante al Malsecco, ha una fruttificazione costante e un'alta produttività: riesce a produrre mediamente il 18% di bianchetti, il 36% di verdelli e il 46% di limoni, questi ultimi due con buona qualificazione commerciale.

Femminello Siracusano (o Femminello masculuni)

Di probabile derivazione (per mutazione gemmaria) del “Femminello comune”, questo tipo di limone si caratterizza per essere una pianta di grande vigore, con un rapido accrescimento e una messa a frutto anticipata rispetto agli altri limoni mediterranei. Ha una certa rifiorescenza spontanea e riesce a produrre mediamente

l'85% di limoni (per la maggior precocità del primofiore), il 4% di bianchetti e l'11% di verdelli. Di grande qualità e dunque molto apprezzata dal mercato anche per l'alta produttività e il precoce accrescimento dei frutti, questa cultivar presenta comunque dei difetti come la mal tolleranza al Malsecco.

Femminello apireno Continella

Individuata e diffusa dall'agricoltore Saverio Continella di Acireale, di cui porta il nome, questa cultivar non è molto diffusa. Rispetto al Femminello comune ha il pregio di non avere semi (apirenia), ma per contro presenta una buccia eccessivamente spessa, la pianta è spinosa e i frutti sono piccoli. Produzione costante, buona resa in succo e acidità.

Femminello Dosaco

Rinvenuto e selezionato da Saverio Continella. Apprezzato per la ricca produzione di verdelli a basso contenuto di semi e alta resa in succo. Di recente introduzione (come il Femminello Continella) è ancora presto per dare giudizi, ma in generale si ritiene che possa meritare di essere coltivata su vasta scala.

Femminello Santa Teresa

Varietà apprezzata soprattutto per i verdelli. È resistente al Malsecco più di altre selezioni clonali di "Femminello", ma non raggiunge i valori del "Monachello". Rinvenuta a Santa Teresa Riva (Me), questa cultivar di limone non ha ancora trovato una grande diffusione per la scarsa produttività e la qualità non eccellente del frutto.

Femminello Scandurra

Mutazione vegetativa trovata nel catanese (Acireale), caratterizzata da fruttificazione costante, accrescimento medio del frutto, maturazione media commerciale entro ottobre, ma, purtroppo, bassa produttività.

Femminello Lunario

Questa cultivar dalla fioritura quasicontinua durante tutto l'anno e poca ricettività al Malsecco, ha una diffusione molto limitata per la scarsa produttività e un minor contenuto di acido citrico e oli essenziali rispetto al Femminello comune. La sua coltivazione può essere tuttavia interessante laddove disulti difficile ottenere i verdelli con le tecniche di forzatura. Per la sua capacità di produrre fiori e frutti durante tutto l'anno, lo si trova frequentemente in orti e giardini ed è senz'altro il limone più coltivato come pianta ornamentale da vaso.

Sfusato Amalfitano (o Femminello sfusato)

Il frutto si presenta praticamente privo di semi e con una forma allungata. Sensibile ai venti ed alle infezioni da Malsecco, ha una fruttificazione costante ed una produttività media. La buccia ricca di oli essenziali è spessa e rugosa.

Interdonato

È un probabile ibrido per cedro di origine sconosciuta diffuso nel versante jonico messinese. Ha una buona resistenza al Malsecco. La pianta è poco rifiorante, non risponde molto alle tecniche di forzatura ed è in generale poco produttiva. Tuttavia la

sua maturazione precoce consente una buona produzione di limone Primofiore (settembre-ottobre), molto richiesto dal mercato. Bassa la produzione invernale. Il frutto, allungato e con umbone conico, è di pezzatura piuttosto grande, ma il succo non è abbondante.

Monachello

È la cultivar italiana che in assoluto resiste meglio al Malsecco, ma le piante sono più lente nella messa a frutto e poco produttive. In certi ambienti non è molto rifiorante ed è per questo che è necessario ricorrere alle tecniche di forzatura per ottenere una certa produzione. Talvolta viene innestato sull'arancio amaro con risultati non molto longevi. Solo le recenti selezioni clonali della stessa cultivar riescono ad attenuare i suoi noti difetti.

1.3.2 Le cultivar nel resto del mondo

Eureka (U.S.A.)

È la varietà più diffusa in America ed è presente anche in Spagna. Apprezzata per i frutti ricchi di succo e senza semi (apireni), questa varietà ha il difetto di non sopportare troppo il freddo.

Lisbon (U.S.A. Florida)

Varietà molto coltivata in Florida. Rispetto alla cultivar Eureka è più spinosa e sopporta molto meglio il freddo.

Villafranca (Florida, Spagna)

Selezione clonale della varietà Eureka. Coltivata soprattutto in Florida, è anche una delle varietà più diffuse in Spagna. È una pianta vigorosa e altamente produttiva che da frutti medio-grandi con molti semi e ricchi di succo acido e aromatico.

Mesero (Spagna)

Presente in Spagna, ma meno diffusa della varietà Berna, questo limone da frutti apprezzati per la ricchezza di succo (piuttosto acido) e oli essenziali, ma anche di semi (9-10).

Altre cultivar internazionali:

- Berna o Verna (Spagna)
- Gallego
- Genoa (Argentina)
- Karystini (Grecia)

1.4 Lo stato dell'arte della limonicoltura italiana

La limonicoltura (nell'ambito dell'agrumicoltura italiana) ha avuto un ruolo importante sia per le superfici investite, che per la produzione destinata all'estero.

L'introduzione e quindi la presenza devastante del fungo Deuteromicete *Phoma tracheiphila*, agente causale del Malsecco, ha però fortemente condizionato la coltura del limone (in Italia ed in particolare in Sicilia), determinando un progressivo calo produttivo e un decadimento qualitativo del frutto. Ciò ha comportato una

continua riconversione delle tradizionali cultivar pregiate “Femminello – vari tipi”, molto suscettibili al Malsecco, a favore di altre più tolleranti “Monachello” e “Interdonato”, ma di minor pregio sia per quantità che per qualità prodotta.

Il lavoro di ricerca dell'I.S.A. (Istituto Sperimentale di Agrumicoltura) di Acireale, specialmente in quest'ultimo decennio, è stato rivolto alla selezione ed al brevetto di cultivar che associassero alla tolleranza al “malsecco” ottime caratteristiche qualitative e produttive e l'apirenia.

La cultivar che attualmente risponde meglio alle necessità della coltivazione ed alle esigenze del mercato è un clone nucellare di Femminello denominato “Siracusano 2KR”, che non presenta spinescenza, i frutti di ottima pezzatura presentano semi, la produttività è elevata e la pianta non ha una notevole tolleranza al Malsecco. Questo clone ha la peculiarità di ingrossare precocemente il frutto tanto da poter iniziare la raccolta nelle zone più vocate i primi di ottobre.

La cultivar “Adamo V.C.R.” anch'essa del gruppo Femminello, abbastanza rifiorante con media tolleranza al Malsecco, produce frutti apireni con buona produzione dal punto di vista quantitativo e qualitativo.

L'ibrido triploide “Lemox” costituito e brevettato dall'I.S.A. di Acireale dimostra di essere altamente tollerante al Malsecco, inoltre, il rapido accrescimento del frutto apireno lo rende molto interessante per la raccolta, da settembre, periodo dell'anno in cui si ha la minore offerta di limone nei mercati europei; la pianta presenta notevole spinescenza per cui si sconsiglia nelle zone ventilate.

In Calabria si può individuare un'area geografica dove la proliferazione e la produzione delle piante e dei frutti del limone godono di condizioni ideali: il comune di

Rocca Imperiale.

Il territorio di Rocca Imperiale, se pur di estensione limitata, risulta importante per la coltivazione del limone, oltre che per condizioni pedoclimatiche favorevoli, anche perché abbastanza indenne dal problema Malsecco.

La tutela di questo importante prodotto è affidata al Consorzio di Tutela Limone di Rocca Imperiale, che, al fine di valorizzare le caratteristiche qualitative (organolettiche) dei limoni prodotti nel territorio comunale, in collaborazione con tecnici specializzati e ricercatori nel settore, ha avviato un progetto che vedrà questo agrume fregiarsi del Marchio di Qualità I.G.P. (*Identificazione Geografica Protetta*), secondo quanto previsto dal Reg. CEE 2081/92. La prima parte del lavoro è stata realizzata con il contributo della Regione Calabria, grazie alle misure 4.7 e 4.8 del P.O.R. CALABRIA 2000/2006.

I risultati finora ottenuti sono stati presentati in diversi appuntamenti nazionali ed internazionali del settore della ricerca inerenti la botanica e le biotecnologie applicate ai frutti [Allegato 2].

Il Consorzio di Tutela e Valorizzazione del Limone di Rocca Imperiale, nonché l'Assessorato Regionale all'Agricoltura, Dipartimento Agricoltura e Forestazione, hanno ritenuto di enorme valore il lavoro finora svolto, pubblicandone i risultati in un volume divulgativo ed in una relazione conclusiva che ne attestasse i risultati (Pignataro, 2008).

1.5 Caratteristiche generali del frutto: un frutto aclimaterico

L'entità della respirazione di un frutto è molto elevata nello stadio iniziale del suo

sviluppo, quando l'intensa produzione di nuove cellule per la formazione di tutte le parti del frutto (divisione cellulare) richiede molta energia e si assesta poi su valori più bassi quando vi è solo un accrescimento delle dimensioni delle cellule (distensione cellulare) già formate. In alcuni tipi di frutti, detti aclimaterici o non climaterici, come nel caso degli agrumi in genere, la respirazione diminuisce lentamente fino alla senescenza ed alla morte del frutto stesso; in altri tipi di frutti, detti climaterici, in prossimità della maturazione si assiste ad un rialzo di attività respiratoria, accompagnata dalla produzione di etilene, che funge da ormone stimolante la maturazione stessa, ed in genere, in questi tipi di frutti la maturazione avviene, da questo momento in poi, molto velocemente. Da un punto di vista pratico la differenza fra le due categorie riveste molta importanza, perché devono essere considerati in base alle loro attività metabolica, sia per il tipo di maturazione che per la produzione e sensibilità all'etilene (Katz *et al.*, 2004).

L'agrume è una bacca cenocarpica pluricarpellare (formata generalmente da dieci carpelli), detta Esperidio. Per quanto riguarda la fisiologia del frutto del limone va detto in generale che l'epicarpo o flavedo (la buccia coriacea che delimita i frutti esternamente) è di spessore consistente e presenta colorazioni che vanno dal verde, fino a prima della maturazione virando al giallo, a maturazione completata ed è ricco di ghiandole contenenti gli oli essenziali. Il mesocarpo o albedo (strato intermedio) è saldato all'epicarpo ed è bianco, di consistenza spugnosa. L'endocarpo o polpa (parte interna), ripropone la struttura dell'ovario pluricarpellare ed è suddiviso in 8-10 logge o spicchi per mezzo del sottile tessuto del mesocarpo. All'interno degli spicchi ci sono cellule e vescicole ripiene di una soluzione a base di acqua, zuccheri e acidi.

Ogni loggia contiene da 4 a 8 ovuli, che possono originare altrettanti semi. Questi ultimi sono biancastri, ovoidali e contengono embrioni.

A seconda della varietà o cultivar della pianta, i frutti del limone possono avere caratteristiche più o meno diverse rispetto a dimensioni, colore, spessore e rugosità della buccia, succosità e grado di acidità della polpa, presenza o assenza di semi. Se consideriamo il peso fresco di questi comparti tissutali, la buccia rappresenta il 40%, la polpa il 57-58%, mentre i semi solo il 2-3%.

Al di là del consumo del frutto fresco per uso alimentare e culinario, il limone può essere utilizzato in vari modi. La polpa viene utilizzata per estrarre il succo di limone, che ha molteplici utilizzi in ambito alimentare, chimico (acido citrico), farmaceutico, ecc. La scorza o buccia viene utilizzata per estrarre l'olio essenziale e le pectine. Inoltre i semi possono essere utilizzati per produrre l'olio.

Dal punto di vista biochimico il flavedo è composto da materiale cellulosico, miscele di oli essenziali, tra cui terpeni, sesquiterpeni alifatici e derivati ossigenati, terpeni e sesquiterpeni biciclici, composti alifatici non terpenici, idrocarburi aromatici, esteri contenenti azoto.

Mentre i costituenti del residuo non volatile dell'olio essenziale sono prevalentemente cere paraffiniche, steroidi e triterpenoidi, acidi grassi, cumarine, psoraleni e flavoni. Troviamo ancora componenti accessori quali pigmenti (carotenoidi, clorofille, flavonoidi), principi amari (limonina), enzimi (ossido riduttori, proteolitici, acetil-esterasi, fosfatasi, enzimi pectici).

L'albedo risulta anch'esso costituito principalmente da materiale cellulosico oltre che da sostanze pectiche come, pectina, protopectina, acido pectico, acidi pectinici. I

componenti accessori, anche in questo comparto sono principi amari (limonina) enzimi (ossido riduttori, proteolitici, acetil-esterasi, fosfatasi, enzimi pectici). La struttura della polpa risulta costituita da materiale cellulosico, mentre il succo contiene carboidrati (mono e disaccaridi), acidi organici (acido citrico e malico), costituenti azotati (proteine, peptidi, amminoacidi), costituenti inorganici (ceneri), vitamine (vitamina C), lipidi aromi volatili (alcol etilico, acetone, acetaldeide, acido formico), pigmenti (carotenoidi, clorofille, flavonoidi). I semi sono costituiti da materiale cellulosico con presenza di proteine grezze ed oli.

100 g di polpa di limone							
contengono:							
kcal	kJoule	acqua	lipidi	potassio	calcio	magnesio	vitamina C
35-56	151-235	84-90 g	0,6 g	149 mg	11 mg	28 mg	51 mg

Tabella 1.5. *Contenuto energetico ed in grassi, minerali e vitamine di 100 g di peso fresco di polpa di limone.*

1.6 Le proprietà curative del limone e i suoi principi attivi

Gli antichi autori romani lo ricordano come prezioso alimento e medicamento per le sue notevoli qualità; i marinai lo apprezzavano per le proprietà antiscorbutiche e lo utilizzavano in grandi quantità a bordo delle navi. Tramite i viaggi per mare il frutto fu introdotto nei paesi dell'Europa, scambiandolo con merci pregiate e addirittura con oro.

Oggi è ampiamente impiegato in campo alimentare, cosmetico, farmaceutico e come aromatizzante.

La scorza, aromatica e antisettica, contiene un olio essenziale ad alta percentuale di limonene, presente nelle ghiandole oleifere dell'epicarpo (flavedo) di colore giallo; la parte bianca interna (albedo) è costituita per lo più da sostanze cellulosiche e pectiche; la polpa, da cui si estrae il succo, ha un'alta concentrazione in vitamine C, B (B1-B2-B3) e PP.

Il frutto di limone è utilizzato in ogni sua parte, in svariati modi e con diverse finalità. Gli antichi dotti in medicina proponevano la "cura di limoni" per combattere reumatismi e artrite e consigliavano il limone per guarire ferite, influenze e tutte le infezioni, per contrastare la gastrite, prevenire l'ulcera e aiutare la digestione. Efficace nelle bronchiti acute e croniche e in varie affezioni dell'apparato urogenitale e della cavità orale, nonché della pelle, in particolare nelle efelidi, macchie bruno scure e negli eritemi solari. In forti quantità è utile per la gotta e il reumatismo. È un ottimo schiarente, astringente, detergente e purificante dell'organismo. Il succo del limone, inoltre, è ricco di acido citrico. È un efficace digestivo, soprattutto se diluito in acqua calda o un disinfettante, in quanto aiuta a prevenire il formarsi di batteri. È indicato per abbassare la pressione arteriosa; è un calmante e tonificante del sistema nervoso.

Questi ultimi effetti sono dati in particolar modo dalle foglie, calmanti e antispasmodiche, consigliate a chi soffre di insonnia, nervosismo, palpitazioni, mal di testa o asma. Sono inoltre sudorifere, indicate perciò in caso di febbre, e vermifughe cioè in grado di espellere i vermi parassiti dell'intestino.

Anche la corteccia, come le foglie è sudorifera e vermifuga.

Il flavedo esercita un'azione tonificante sull'apparato digerente e si raccomanda

a chi soffre di inappetenza e di difficoltà digestive.

Il succo di limone contiene vitamine B1, B2 e C (50 mg ogni 100g di succo), sali minerali (specialmente di potassio), oligoelementi, zuccheri, mucillagini, acidi organici (citrico, malico, acetico e formico) e flavonoidi (esperidina). Le proprietà che gli si attribuiscono sono molte, ma ne ricorderemo solo alcune. Il Limone, infatti, è un ottimo antiscorbutico, un tonificante ed alcalinizzante ad azione depurativa. Può avere effetto dissolvente per i calcoli renali ed è inoltre un capillaroprotettore con azione venotica, antisettica. L'impiego più diffuso, però, è in campo cosmetico.

1.7 Una pianta di interesse ecologico e paesaggistico

Il limone, della famiglia delle *Rutacee*, è una pianta arborea orientale, sempreverde, con rami spinosi e foglie ampie. I frutti presentano diverse forme ed emanano un odore intensamente aromatico.

Vive in zone temperato-calde, non sopporta gli sbalzi di temperatura e le gelate. Volendo spaziare sulla storia e l'importanza di questa pianta ormai diventata rappresentativa dell'ambiente mediterraneo, dove ha trovato le condizioni ideali al suo adattamento, non possono essere dimenticate le specie e le varietà ornamentali, forse più delicate, ma di estrema rappresentatività estetica. Queste loro caratteristiche rendono gli agrumi una coltivazione di notevole importanza economica e di conseguenza richiamano interessi su scala mondiale. L'Italia è e lo è stata ancor di più in passato uno tra i leaders mondiale del settore tant'è vero che la produzione agrumicola caratterizza il paesaggio di vasti comprensori all'interno dei quali è un'importante fonte di reddito con profonde radici nel territorio. I radicali cambiamenti

che hanno investito il settore obbligano ad un costante aggiornamento delle conoscenze per poter rispondere adeguatamente all'attuale evoluzione dello scenario che ha visto altre regioni del mondo sottrarre ai nostri produttori consistenti fette di mercato.

Le nuove proposte di studio e di ricerca in agrumicoltura suggerite dai continui avanzamenti nelle conoscenze agro-bio-tecnologiche da parte dei ricercatori e presenti anche in questo lavoro, rispondono alle svariate necessità del comparto produttivo e dell'industria di trasformazione con l'obiettivo di trasferire ai tecnici, ai produttori ma anche ai consumatori, le conoscenze necessarie ad una razionalizzazione nell'avanzamento innovativo del processo produttivo, nel rispetto di quelle che sono le priorità contingenti: una riduzione degli sprechi, un uso razionalizzato delle risorse idriche, una progressiva eliminazione di pesticidi e sostanze chimiche di sintesi per le concimazioni e la difesa, per giungere a sostituirle con molecole di origine naturale.



CAPITOLO II: STUDI E TECNOLOGIE IN PROTEOMICA

Capitolo II: Studi e tecnologie in proteomica

2.1 La proteomica: una metodologia in continua evoluzione

Lo sviluppo tecnologico, applicato alla pubblicazione dell'intero genoma umano su una banca dati di pubblico dominio, così come la disponibilità di interi genomi di altri organismi, ha dato inizio ad una nuova era nella ricerca scientifica (*www.lsw.n.it*).

La Proteomica, che è lo studio del proteoma inteso come intero complesso di proteine espresse da un genoma, è una nuovissima scienza che contribuisce alla conoscenza delle proteine e del loro funzionamento. Studiare l'espressione e la funzione delle proteine e dei meccanismi fisio-patologici in cui sono coinvolte aiuta, tra le altre cose, a comprendere quali sono i meccanismi alla base dell'insorgenza delle malattie e a identificare le alterazioni proteiche (*www.itpa.it*).

Il termine proteomica, coniato nel 1996 copre molte delle analisi funzionali del prodotto di un gene, inclusa l'identificazione o localizzazione su larga scala di proteine e delle loro interazioni. Ma per comprendere l'evoluzione della proteomica, non la si può prescindere dai progressi compiuti nel campo della genomica. La genomica studia come il DNA di una cellula, sottoposta a determinati stimoli, possa esprimere i suoi geni in un contesto globale, non singolo. Quindi uno stimolo induce il DNA cellulare a rispondere ad un dato fattore esterno la cui espressione finale è la produzione delle proteine che risponderanno a questa nuova condizione (*Proteomics from wikipedia.org*).

La totalità degli stimoli non induce un solo gene ad esprimersi, ma una serie di geni correlati a cascata a seconda dello stimolo apportato. La genomica studia le funzioni del DNA in maniera completa e complessa. L'ordine della sequenza con cui il DNA risponde a questi stimoli è DNA - mRNA - proteine. Quindi la proteomica interviene nell'ultimo stadio, quando bisogna determinare quali, quante ed in che tempi le proteine si esprimono in relazione ad un determinato stimolo, ed è complementare alla genomica in quanto si focalizza sul prodotto del gene (*PRIDE, PRoteomics Identifications DatabasE*).

L'mRNA espresso dal DNA si traduce in proteine. Ma queste proteine, a volte, non sono subito espresse dal mRNA, ma si esprimono in maniera diversa ed a tempi diversi. Non c'è una stretta linearità tra un gene e la sua proteina complementare, o ancora più in larga scala, tra il genoma e l'intero "proteoma" di una cellula (www.proteomicworld.org).

La proteomica sta apportando un enorme contributo nella comprensione della funzione ed espressione di un gene, così come le informazioni relative all'espressione dell'mRNA e delle proteine potrà portare alla conoscenza del complicato meccanismo del "gene network" (www.cprmap.com).

2.2 L'avanzamento delle tecniche

I passi in avanti compiuti nella progettazione di strumenti all'avanguardia e di metodologie sempre più innovative hanno alimentato la ricerca biologica facendola

passare dalla semplice analisi biomolecolare di singole proteine allo studio di miscele proteiche complesse. La proteomica si è trasformata velocemente in una componente essenziale della ricerca biologica. Accoppiata agli sviluppi della bioinformatica consente di descrivere i sistemi biologici ed avrà indubbiamente un ruolo importante nella comprensione dei fenotipi sia delle cellule normali che malate o danneggiate (www.proteomescience.de).

Inizialmente la proteomica si è focalizzata sulla creazione di strumenti per l'indagine delle proteina usando l'elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide. Il campo da allora si è esteso fino ad arrivare a comprendere non solo l'espressione della proteina che prende in esame, ma anche l'analisi delle modificazioni post-traduzionali e le interazioni proteina-proteina.

Si può avere informazione quantitativa e/o qualitativa dell'espressione di una proteina, sia mediante gels bidimensionali oppure attraverso analisi diretta in spettrometria di massa che è stata migliorata per aumentare la sensibilità, la specificità e fornire risultati ad alto-rendimento. Inoltre, sono a disposizione diverse piattaforme bioinformatiche per interpretare i risultati dell'espressione di una proteina; si può disporre di un vasto network grazie ai collegamenti tra le varie risorse interconnesse a più livelli (www.proteomicworld.org).

Lo studio sulle interazioni proteina-proteina è stato portato avanti tramite lo sviluppo dei microarrays delle proteine. Analoghi ai microarrays del DNA, questi biochips sono riprodotti con gli anticorpi o le proteine e iniettati con una miscela di un

complesso proteico. L'intensità e/o l'identità risultanti dalle interazioni proteina-proteina possono essere rilevate tramite analisi delle immagini in fluorescenza o tramite spettrometria di massa. Altri metodi di identificazione di una proteina possono essere usati al posto dei microarrays, come il sistema detto a due ibridi (two-hybrid system) o l'isolamento di singole proteine da complessi di proteine, mediante cromatografia di affinità o altre tecniche di separazione (www.hupo2005.com).

L'elettroforesi bidimensionale, anche se utilizzata già dal 1970, rimane ancora una tecnica di eccellenza, che si basa sulla separazione delle proteine mediante un campo elettrico. Si può eseguire in differenti metodi: l'elettroforesi nativa (in cui la proteina rimane nella sua forma e funzionalità originale), l'elettroforesi in SDS, in cui le proteine si separano in base al peso molecolare dei loro monomeri subendo un'azione denaturante.

L'elettroforesi bidimensionale (2-D) prevede la corsa di un estratto cellulare in 1-D tramite isoelettrofocusing, corsa su gel denaturante. Quindi le proteine sono separate in base al loro punto isoelettrico ed al loro peso molecolare. Alla fine del processo elettroforetico 2-D si ottiene una mappatura totale delle proteine presenti in un estratto cellulare.

Si possono condurre studi proteomici anche attraverso elettroforesi bidimensionale differenziale (DIGE, Difference Gel Electrophoresis). Questa tecnologia è particolarmente adatta per analizzare in miscele proteiche complesse, oltre alle differenze qualitative, le variazioni quantitative. L'elettroforesi DIGE

prevede, dopo avere proceduto alla marcatura delle proteine con specifici fluorocromi (Cy2, Cy3 e Cy5), l'unione di più campioni e la risoluzione della miscela proteica ottenuta in un'unica corsa elettroforetica. La possibilità di utilizzare uno standard interno (una miscela di tutte le preparazioni) e l'elevata linearità di risposta dei fluorocromi ora disponibili permette una più corretta normalizzazione dei risultati delle diverse analisi.

Oltre le tecniche citate se ne possono utilizzare delle altre, come l'elettroforesi capillare o il sequenziatore di aminoacidi, che portano entrambe al medesimo scopo: riconoscere una proteina e la sua struttura primaria.

Una volta ottenuta una mappatura completa delle molecole di matrice proteica, come avviene nel metodo 2D-PAGE, bisogna eluire dal gel i singoli punti in cui queste si sono concentrate secondo il loro punto isoelettrico (IE) ed il loro peso molecolare (MW) per passare ad analizzarle.

Questa ultima fase sperimentale è quella che prevede, dopo parziale digestione enzimatica, l'analisi dei campioni in spettrometria di massa (LC-ESI-MS/MS). Mediante l'elaborazione dei dati ottenuti e le successive ricerche nelle banche dati si procede infine all'identificazione dei peptidi.

Grazie alla tecnica della spettrometria di massa, che fino a qualche tempo fa era relegata alla chimica stretta, accoppiata alla bioinformatica, che negli ultimi anni ha subito un notevole progresso tecnologico, è oggi possibile fare delle analisi indispensabili per lo studio proteomico (Cavaliere *et al.*, 2007).

La combinazione sequenziale di tutte queste metodologie ci consente di conoscere esattamente o comunque con buona attendibilità qual'è l'identità delle proteine presenti nel sistema che si sta analizzando, anche se si lavora su di un singolo frammento, su una subunità o su un singolo peptide.

Sovrapponendo il risultato dell'analisi di un estratto cellulare di controllo, con quello di un campione trattato con una determinata sostanza o derivato da un campione biologico che ha subito un'alterazione o è stato sottoposto ad un tipo di stress ambientale, si possono rilevare gli eventuali cambiamenti in termini di quantità e qualità delle proteine presenti prima e dopo il trattamento stesso (Müller *and* Steinhart, 2007).

2.3 Le più moderne applicazioni

I dati prodotti dai progetti di sequenziamento del genoma di diverse specie, costituiscono la base per lo studio delle moderne applicazioni industriali derivate dalla proteomica e dalla genomica. La complessità delle informazioni, la considerevole mole di dati disponibili, il loro continuo aggiornamento, la difficoltà d'utilizzo di molti programmi d'analisi, rende di fatto difficoltoso l'uso quotidiano di questi strumenti conoscitivi, diventati ormai indispensabili in molte realtà ospedaliere, educative e produttive. Gli strumenti biotecnologici avanzati si stanno rivelando sempre più indispensabili per il trattamento dei dati nell'ambito della biologia molecolare e della medicina (Gauci *et al.*, 2009).

In questo paragrafo verranno citate alcune recentissime applicazioni della proteomica a vari livelli, scelte tra gli esempi metodologici più significativi e rappresentativi nel campo della ricerca in biologia molecolare.

Proteomica comparativa

La proteomica quantitativa basata sulla spettrometria di massa è sempre più applicata nel dominio vegetale per caratterizzare proteine rispetto ad abbondanza, localizzazione cellulare, modifiche post-traduzionali e interazioni con altre proteine (Oelieklous *et al.* 2009). In numerosi laboratori di spettrometria di massa adibiti allo studio delle proteine si stanno sviluppando nuovi metodi di analisi di dati MS(/MS) ottenuti in esperimenti di proteomica quantitativa vegetale tramite tecniche 'label-free' (Zhu *et al.*, 2010).

Con la tecnica di rilevazione label-free, le molecole in oggetto di studio non vengono "targate" o alterate, ma vengono rilevate nella loro forma naturale, senza che il processo interferisca con la funzione della biomolecola. Questo genere di tecnica è relativamente semplice ed economico da attuare e permette misurazioni quantitative delle interazioni molecolari. In aggiunta, la tecnica di label-free detection consente di misurare il cambiamento di indice di rifrazione, indotto dalle interazioni molecolari, che dipende dalla concentrazione del campione o dalla densità superficiale piuttosto che dalla massa totale dello stesso.

Spettrometria comparativa e softwares

Nell'ambito della proteomica comparativa su larga scala, l'analisi quantitativa dei dati MS/MS generati prevede un foglio di lavoro comprensivo di detezione dei picchi, confronto/allineamento degli stessi, normalizzazione, identificazione dei peptidi, detezione dei peptidi differenziali e analisi statistiche. Per l'applicazione di questa tecnica sono al momento disponibili numerosi softwares di metodi computazionali (Wong *et al.*, 2008).

Proteomica quantitativa tramite spettrometria comparativa LC-MS

Le moderne analisi in LC-MS associate alla bioinformatica consentono la rivelazione di differenze quantitative nella composizione proteica tra due o più campioni. Le concentrazioni peptidiche sono quantificate tramite un confronto dell'intensità dei picchi su corse multiple ottenute in *MS mode* con appositi softwares (ritenzione, confronto e allineamento dei picchi).

Un'interessante *review* sulla proteomica quantitativa e la spettrometria comparativa LC-MS, nonché sulle procedure analitiche di acquisizione ed elaborazione dei dati è quella di *America e Cordewener* apparsa su *Proteomics* del 2008 (America *and* Cordewener, 2008). Il metodo proposto da i due ricercatori risulta interessante in quanto, per confrontare i dati completi relativi alle intensità dei picchi multipli ottenuti in LC-MS si utilizza un software dedicato per la loro rilevazione, corrispondenza ed allineamento. L'esattezza nella determinazione quantitativa

dell'abbondanza del peptide fornisce un livello impressionante in termini di particolarità ed attendibilità dei dati.

Proteomica degli alimenti

Di fondamentale importanza è l'impiego della proteomica nel settore agroalimentare, nonché il suo rapporto con la scienza dell'alimentazione in quanto permette di individuare e caratterizzare marcatori molecolari da utilizzare come parametri di qualità, salubrità e tipicità degli alimenti (Carbonaro, 2003).

La gran parte degli studi nutrizionali si è finora focalizzata sul contenuto proteico totale degli alimenti, nell'ottica di un loro successivo inserimento nella dieta. Oggi invece, vari studi, condotti sia per il regno animale (Laganà *et al.*, 2003) che per quello vegetale, evidenziano che i territori, in virtù delle proprie diversità, possono contribuire alla diversificazione nutrizionale ed extranutrizionale degli alimenti; in tale contesto, il prodotto tradizionale tipizzato assume un ruolo fondamentale per la sostenibilità salutistica ed ecologica, sia per l'uomo che per l'ambiente, nonché per il territorio stesso, con riflessi positivi anche sulla sostenibilità economica.

La proteomica si rivela dunque insostituibile per caratterizzare le specificità alimentari di un determinato territorio. È, infatti, possibile ottenere vere e proprie impronte (*fingerprinting*) di mappe bidimensionali polipeptidiche dei prodotti in ambito locale, che vengono registrate come immagini in banche dati. Tali immagini possono essere utilizzate, nelle analisi di tracciabilità, come termini di confronto per la verifica

della presenza di alcuni parametri di tipicità e di salubrità nel prodotto in esame.

Nell'ambito della «Proteomica degli Alimenti», si effettuano analisi quantitative di proteine presenti in matrici naturali vegetali (frutta, cereali, ortaggi), per mezzo di metodiche spettrofotometriche validate, quali il *saggio di Bradford* e quello di Lowry che utilizzano come standard preferenziale la BSA (Bovine Serum Albumin), così come le già citate Proteomica quantitativa, comparativa, nonché la spettrometria di massa con gli annessi softwares.

Le tecniche di proteomica, tradizionali ed innovative, permettono di identificare anche isoforme proteiche che si hanno per effetto promotore da parte di agenti chimici potenzialmente dannosi (anticrittogamici) sulle coltivazioni. Le principali applicazioni nel settore agro-alimentare consistono nell'individuazione e nell'identificazione delle proteine normalmente presenti in un alimento di origine vegetale e di quelle proteine la cui sintesi scaturisce da un evento estraneo, che può assumere effetto di *stress* o di *optimum* (Wishart, 2008).

Tali marcatori biochimici, unitamente agli altri parametri tradizionali (fisici, chimico-fisici, microbiologici, fisiologici e chimici) consentono, oltre a quanto detto prima, di ottimizzare i processi di conservazione, di caratterizzare le frazioni proteiche, prima e dopo la trasformazione, e anche di caratterizzare la componente enzimatica e le sue modalità di espressione nonché i marcatori molecolari originati dalla proteolisi delle frazioni proteiche coinvolte nella maturazione dei prodotti agroalimentari (Han *and* Wang, 2007).

La proteomica contribuisce anche allo studio dell'eterogeneità delle proteine e costituisce un valido strumento per la rintracciabilità di filiera intesa come la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione.

Attualmente nel consumatore è sempre più diffusa la convinzione che l'alimento debba anche rispondere a determinati requisiti di sicurezza e contenere proprietà extranutrizionali.

Si è pertanto sempre più orientati verso la ricerca negli alimenti di componenti che, pur presenti in piccole quantità, giocano un ruolo fondamentale nell'assicurare una migliore qualità del prodotto e una sua maggiore durata e che sono in grado di esercitare un effetto preventivo nei confronti di malattie degenerative e croniche (gli antiossidanti).

Anche in questa direzione la proteomica può fornire un contributo di primaria importanza alla medicina, alla farmacologia e alla scienza in genere.

Analisi delle proteine negli alimenti come allergeni

All'interno della filiera agroalimentare non va trascurata l'azione di quelle sostanze che risultino nocive anche solo per alcuni gruppi di consumatori particolarmente sensibili (gli allergeni). Le allergie alimentari, infatti, rappresentano un problema sociale di grande rilevanza e di sempre maggiore diffusione. E' noto come siano causate da proteine naturalmente presenti negli alimenti, in grado di

provocare in soggetti sensibili reazioni immunitarie (Hourihane *et al.*, 1996; Hourihane *et al.*, 1997; Ewan, 1996). Il 90% delle allergie alimentari è ascrivibile a otto alimenti: latte vaccino, uova, soia, grano, arachidi, frutta secca con guscio, pesce e crostacei (Sicherer *et al.*, 2000; Hefle *et al.*, 1996). Tutti i cibi allergenici sono potenzialmente in grado di causare anafilassi, ma alcuni in particolare possono causare reazioni ben più gravi.

In questo contesto assume rilevanza nella produzione industriale, anche per le conseguenze tecnologiche ed economiche, la presenza "nascosta" di allergeni in molti prodotti commerciali, spesso destinati all'infanzia. D'altra parte non sono definite precise soglie di reattività; pertanto, l'individuazione e la definizione delle concentrazioni delle proteine allergeniche nei prodotti assume un ruolo chiave per la sicurezza alimentare.

I metodi più utilizzati per rilevare la presenza di allergeni in prodotti alimentari e nei processi di produzione sono quelli basati su saggi immunoenzimatici (ELISA), essi però non rappresentano un fondamentale strumento di screening, perché non forniscono informazioni quantitative sul contenuto del singolo allergene nel prodotto. D'altra parte, la tracciabilità delle proteine allergeniche nella filiera di produzione richiede metodi analitici affidabili, selettivi ed adeguatamente sensibili.

Le tecnologie proteomiche, corredate di spettrometria di massa rappresentano un affidabile strumento per l'individuazione e lo studio delle molecole allergeniche. Un interessante lavoro è stato di recente effettuato (Wigand *et al.*, 2009) su alcuni

vini rossi, rosé e bianchi. Gli autori, dopo arricchimento proteico con dialisi, liofilizzazione, SDS-PAGE, digestione in gel di bande 1DE e spettrometria di massa, hanno identificato come potenziali allergeni 12 proteine delle uva e 6 proteine di lievito, che normalmente influenzano la stabilità del vino.

Oggi, un laboratorio sperimentale attrezzato con le tecnologie di proteomica e spettrometria di massa adeguate, offre la possibilità di effettuare un'indagine mirata all'analisi di proteine degli alimenti ed alla ricerca ed identificazione di potenziali allergeni noti.

SCOPO DELLA TESI



E COLLABORAZIONI INSTAURATE

Scopo della tesi e collaborazioni instaurate

Scopo del presente lavoro di ricerca è la caratterizzazione, dal punto di vista morfologico, biomolecolare e biochimico, del frutto di *Citrus limon* [L.] Burm., var. Femminello, presente nel territorio di Rocca Imperiale.

Con il patrocinio del Consorzio per la Tutela e la Valorizzazione del Limone di Rocca Imperiale e dell'Assessorato all'Agricoltura della Regione Calabria l'attività della ricerca è stata tesa a fornire utili elementi per la certificazione di qualità ai fini dell'ottenimento del marchio I.G.P. Limone di Rocca Imperiale.

Le indagini effettuate nel corso di Dottorato hanno riguardato, in una fase preliminare, lo studio fenologico e morfometrico dei frutti di diverse cultivar, provenienti da distinti microambienti pedoclimatici ed ottenute con differenti sistemi di coltivazione. Le analisi morfo-anatomiche e morfometriche sono state realizzate mediante l'uso del software Open Source "ImageJ" (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), al fine di confrontare la qualità strutturale e conformazionale dei tessuti del frutto tra le cultivar esaminate.

Nella seconda fase, l'attenzione è stata rivolta principalmente all'epicarpo, tessuto che offre protezione al frutto e il cui utilizzo in gastronomia, farmacologia e cosmesi offre interessanti risvolti in campo applicativo; tali studi sono stati effettuati tramite analisi biomolecolari "whole tissue" con la finalità di individuare costituenti

caratteristici del distretto tissutale.

Come approccio integrato a quello biochimico è stato scelto quello proteomico, che dà utili informazioni sulla componente proteico-enzimatica, caratterizzante il tessuto.

Nei tessuti differenziati, quale il flavedo maturo (c.a. 6 mesi dalla fioritura), i metaboliti secondari rappresentano una componente rilevante nel tessuto, conferendo al frutto le qualità organolettiche tipiche del limone, ma d'altro canto, abbassano significativamente la resa proteica in quanto sono notoriamente agenti interferenti nell'estrazione e purificazione delle frazioni proteiche. In questo contesto, le eventuali variazioni nel contenuto proteico possono essere messe in relazione allo stadio di sviluppo della pianta e alle condizioni di adattamento agli stress. L'analisi condotta per la realizzazione di questo studio si è avvalsa di tecnologie oggi in voga per le indagini di tipo proteomico che comprendono la 2D-PAGE, la Spettrometria di Massa, con particolare applicazione sia del MALDI-TOF-MS che dell'LC-MS/MS e la Bioinformatica.

A questo proposito è stato sviluppato nel corso del primo anno di dottorato un protocollo multi-steps per l'estrazione delle proteine totali dall'epicarpo che, per le sue componenti caratteristiche (abbondante contenuto di carotenoidi, clorofille, flavonoidi e acidi grassi), ha richiesto l'allontanamento delle sostanze interferenti prima dell'estrazione e purificazione delle proteine. I risultati ottenuti tramite mappe polipeptidiche bidimensionali indicano un'elevata purezza del campione proteico e un significativo numero di classi polipeptidiche (ca 200), che hanno permesso di

proseguire l'indagine tramite Spettrometria di Massa e l'individuazione di numerose proteine.

Parallelamente sono state condotte analisi chimico-organolettiche, eseguite attraverso Gas-cromatografia e Spettroscopia di Massa. Tale approccio è servito a valutare le peculiarità e le quantità dei principali Terpeni (Pineni e Limonene) presenti nell'epicarpo dei frutti provenienti da Rocca Imperiale e da altre regioni d'Italia particolarmente vocate alla limonicoltura, quali la Sicilia e la Campania.

Nel corso del secondo anno è stata effettuata l'identificazione tramite LC-MS/MS e ricerca in database on-line di 60 proteine del flavedo, ottenute tramite separazione in 2D-PAGE. Parallelamente è stata effettuata l'analisi qualitativa d'immagine delle differenti repliche dei 2D-PAGE, grazie all'utilizzo dei software Quantity-One e PD-Quest (Bio-Rad). Ciò ha permesso di confrontare la riproducibilità nonché l'attendibilità dei risultati ottenuti, mettendo a confronto i pesi molecolari ed i punti isoelettrici degli spots visibili nei gel 2-DE con i dati analoghi ottenuti dalle analisi molto più attendibili della Spettrometria di Massa.

Durante il terzo anno si è portata a termine l'analisi con Spettrometria di Massa degli spot ottenuti, in collaborazione con l'I.S.B. (Ion Source & Biotechnologies) di Milano. Tale collaborazione ha consentito di acquisire ulteriori conoscenze riguardo alle metodologie utilizzate nella ricerca delle proteine in Database on-line, con un particolare riferimento alle tecnologie Open Source e databases Open Access, che consentirebbero un rapido avanzamento nelle ricerche, se queste fossero appunto “aperte” ed accessibili.

Gran parte dell'attività di ricerca del terzo anno di dottorato è stata svolta presso il BIOSCOPE group dell'Università di Vigo, in Spagna, sotto la supervisione del Dr. José Luis Capelo Martínez, esperto nel trattamento di matrici organiche con l'applicazione di Ultrasuoni nonché nell'analisi degli spot proteici in Spettrometria di Massa, tramite MALDI-TOF (Capelo 2008).

Il trattamento ad ultrasuoni consente di ottenere una migliore estrazione e separazione delle proteine rispetto al metodo senza sonicazione, in quanto l'energia delle onde ultrasoniche contribuisce a rompere i compartimenti cellulari aumentando la capacità estrattiva anche nelle parti di tessuto poco esposte all'effetto di dissoluzione chimica.

Le fasi di preparazione degli spot ottenuti dopo la sonicazione in gel bidimensionali di poliacrilammide, nonché la loro analisi in Spettrometria di Massa (MALDI-TOF) sono state svolte in collaborazione con l'Universidade Nova de Lisboa presso la FCT (Faculdade de Ciências e Tecnologia).

CAPITOLO III: MATERIALI E METODOLOGIE



Capitolo III: *Materiali e metodologie*

Nel capitolo terzo vengono descritte le metodologie appositamente scelte per le tre fasi di studio, quella morfo-anatomica, quella chimico-organolettica ed infine quella proteomica. Quest'ultima consiste a sua volta di ulteriori fasi, tra cui, a) il *trattamento del campione* per l'estrazione delle proteine che è stato effettuato con due differenti protocolli: uno che prevede sostanzialmente la precipitazione della matrice proteica in Acido Tricloroacetico ed Acetone che di seguito chiameremo (TCA/AC) ed un altro la cui peculiarità consiste nell'utilizzo dell'energia ultrasonica che per abbreviazione chiameremo (US); b) la *separazione delle proteine* in SDS-PAGE attraverso elettroforesi mono e bidimensionale; c) l'*analisi dei polipeptidi* con spettrometria di massa (MS); d) l'*identificazione delle proteine* per similarità nei database bioinformatici on-line.

La descrizione preliminare riguarda il campione biologico preso in esame, la sua provenienza, le caratteristiche pedoclimatiche, le cultivar e le modalità di coltivazione ed infine il tessuto scelto per le analisi bio-molecolari.

3.1 Modalità di campionamento

In collaborazione con il Consorzio di Rocca Imperiale sono state individuate, nel territorio comunale, cinque diverse aree di coltivazione del limone, dove vi sono condizioni ideali per la produzione: Colfari (40°6'58.08"N - 16°35'30.14"E), Corvisiero

(40°6'41.96"N, - 16°35'22.83"E), Difesa (40°6'48.50"N - 16°36'46.45"E), Cesine (40°7'16.86"N - 16°35'40.97"E) e San Giovanni (40°6'44.75"N - 16°36'43.60"E). Tutte aventi caratteristiche differenti, anche se minime, ma significative, per la caratterizzazione del prodotto (fig.3.1).

La località Corvisiero occupa una piccola collina che permette alle piante di godere di una buona insolazione lungo tutto l'arco dell'anno e del giorno, così come per la località Cesine. La località Colfari, invece, si estende lungo il corso del fiume Canna: gode, da un lato della presenza di humus, mentre dall'altro risente dell'incanalamento delle correnti d'aria. Le località Difesa e San Giovanni sono molto prossime al mar Jonio e quindi pianeggianti, inoltre, la vicinanza delle colline presenti ad ovest le protegge dai venti occidentali. Le pratiche colturali si differenziano nelle zone citate, a seconda dell'azienda che le conduce.

La cultivar scelta per l'indagine è il Femminello comune, presente in tutte e cinque le aree di produzione, dove sono localizzate le quattro aziende del consorzio, Di Leo (1), Di Leo (2), Latricchia ed Acinapura, che hanno fornito i materiali per le analisi. Ognuna delle quattro aziende segue un regime di produzione differente. Sono tre in tutto i metodi di coltivazione praticati e presi in esame per questo studio: Biologico, Convenzionale e Misto.

I frutti sono stati raccolti nei tre periodi di maturazione migliori per la commercializzazione: Novembre (~180 DAF), Dicembre (~210 DAF), Gennaio (~240 DAF).

Località	Metodo	Azienda
• Corvisiero	Biologico	Az. Di Leo (1)
• Colfari	Convenzionale	Az. Di Leo (2)
• Cesine	Misto	Az. Di Leo (2)
• Difesa	Convenzionale	Az. Latricchia
• S. Giovanni	Biologico	Az. Acinapura

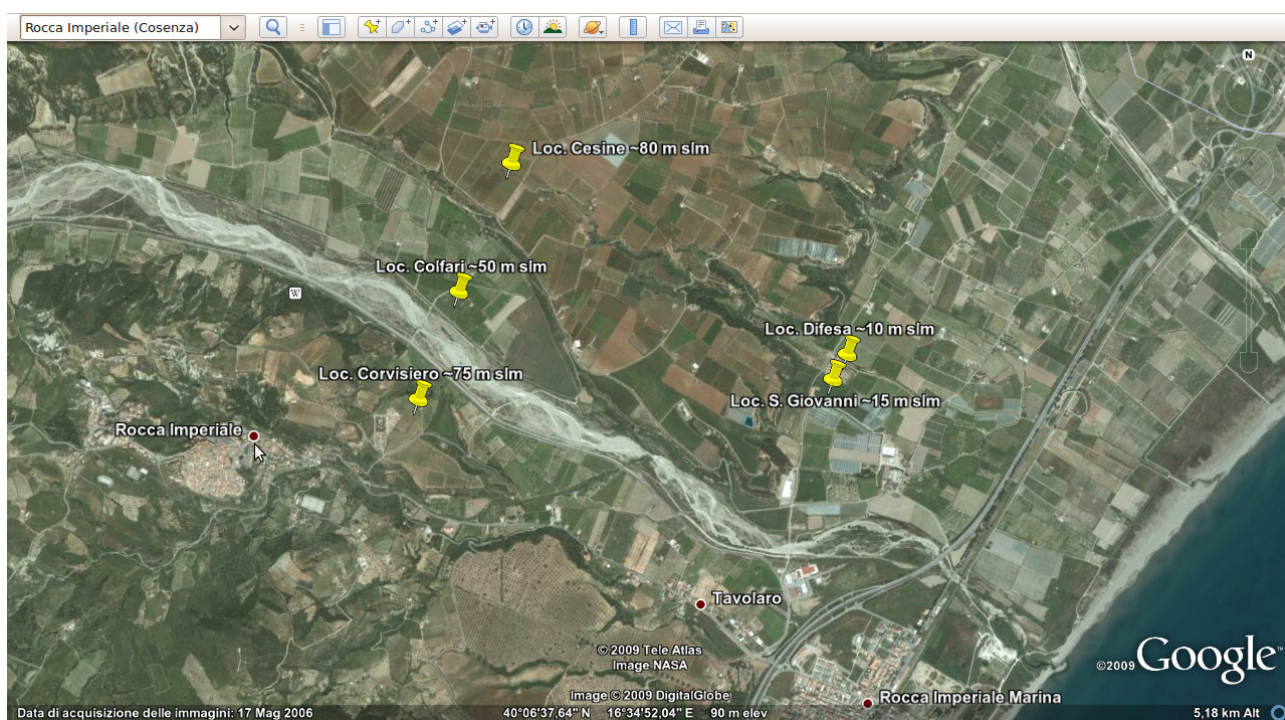


Figura 3.1. Il territorio di Rocca Imperiale visto dal satellite con le località dei limoneti scelti per i campionamenti del lavoro di tesi.

Il materiale biologico utilizzato per lo studio proviene dal flavedo che a maturazione assume il colore giallo tipico del limone (fig. 3.2).

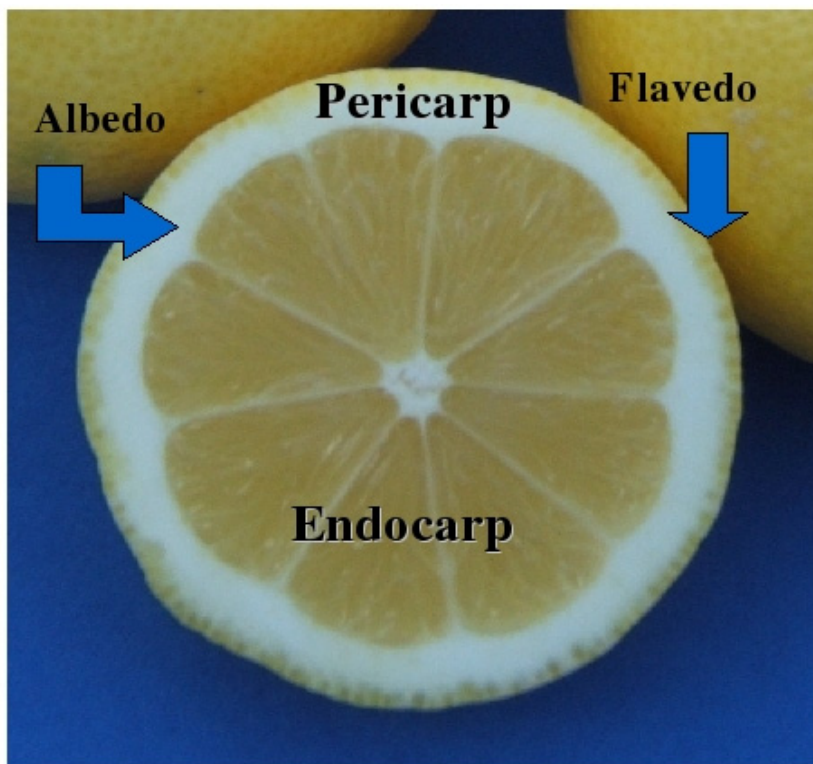


Figura 3.2. Schema di rappresentazione delle parti, componenti il frutto di limone, in una sezione trasversale.

3.2 Analisi morfometrica dei frutti

Le analisi sono state volte ad individuare una possibile correlazione tra le caratteristiche pedoclimatiche, le tecniche di coltivazione ed i tratti morfo-anatomici del tessuto nei campioni presi in esame.

Dopo la raccolta dei frutti dalle località prescelte, si è passati alla pesatura di ogni singolo frutto in numero di venti per ogni campionamento, tenendo presenti le tecniche di coltivazione. La metodologia di raccolta è stata identica per ogni frutto ed è avvenuta nello stesso pomeriggio dei diversi periodi, individuati insieme all'esperto agronomo del Consorzio.

Ogni frutto è stato pesato e fotografato intero e, successivamente, sezionato e fotografato in sezione trasversale. Le due sezioni sono state spremute in modo da misurarne la quantità di succo. Da questi primi risultati, relativi al peso e al succo, si è potuta calcolare la resa in succo (RS), con la seguente formula:

$$RS = \text{Succo in ml} / \text{Peso in grammi}$$

Le misure dei frutti, fissate su immagine digitale, sono state eseguite al computer con il software “ImageJ”, facile ed affidabile (Fig. 3.3).

Ciò ha permesso di confrontare le misure di lunghezza, circonferenza, diametro, circolarità dei frutti, spessore dell'albedo rispetto al flavedo e alla polpa, numero di sincizi ghiandolari che formano il flavedo, importanti per la produzione dell'olio essenziale.

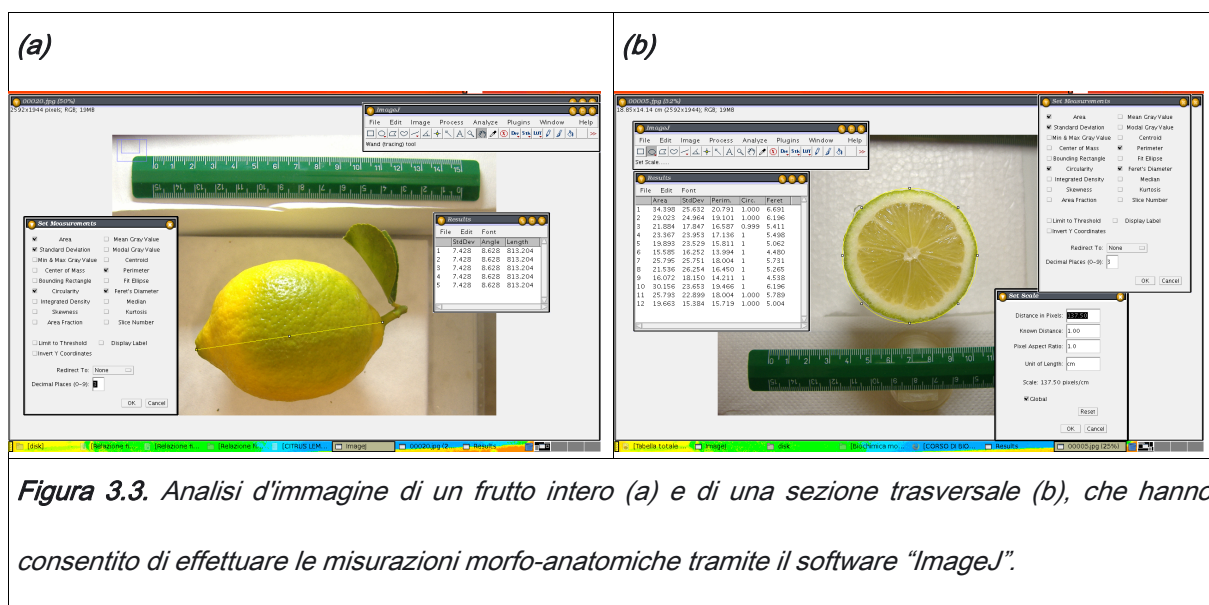


Figura 3.3. Analisi d'immagine di un frutto intero (a) e di una sezione trasversale (b), che hanno consentito di effettuare le misurazioni morfo-anatomiche tramite il software “ImageJ”.

3.3 Analisi chimico-organolettiche

L'analisi chimica delle componenti volatili rappresenta uno strumento estremamente efficace e raffinato, non solo perché consente di individuare le componenti "nobili" che conferiscono alla pianta o all'alimento l'aroma tipico, ma, soprattutto, perché offre la possibilità di seguirne la tracciabilità, rilevando specifici marcatori che descrivono il prodotto stesso lungo tutto il percorso della filiera produttiva, dalla raccolta fino all'utilizzatore finale e, quindi, consentono di verificarne e migliorarne la qualità.

Lo studio dei composti volatili di un alimento ha l'obiettivo di fornirne la caratterizzazione del profilo aromatico, permettendo in tal modo di individuare i composti più importanti che definiscono le qualità organolettiche del prodotto.

Un composto volatile, per contribuire significativamente all'aroma di un alimento, deve essere presente ad una concentrazione maggiore del proprio valore di soglia. Tale valore è definito come la quantità minima di sostanza in grado di suscitare la percezione.

Le componenti principali degli alimenti (proteine, amminoacidi, carboidrati, lipidi e acidi grassi) subiscono processi degradativi in seguito a processi di conservazione (ad esempio la stagionatura) o a causa di trattamenti tecnologici (ad esempio la cottura). In un prodotto che viene consumato fresco, come il limone, le buone caratteristiche delle componenti molecolari conferiscono valore aggiunto a livello organolettico, amplificandone la qualità.

La determinazione delle sostanze volatili negli alimenti riveste un ruolo di notevole importanza: tali sostanze sono infatti responsabili dell'odore del prodotto, che può rientrare nei canoni di normalità ed accettabilità ed essere addirittura una caratteristica peculiare del prodotto, come il Limonene (1-methyl-4-prop-1-en-2-yl-cyclohexene) per il limone, la cui via biosintetica è nota e studiata da tempo (Fig. 3.4).

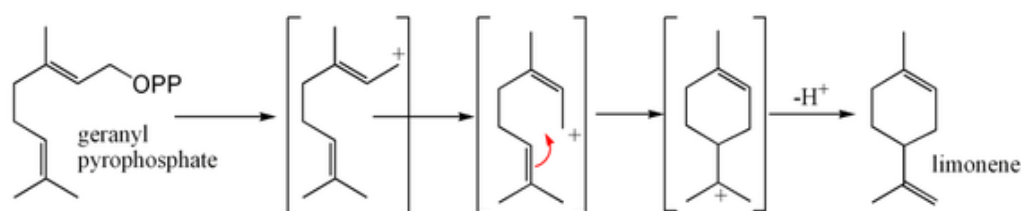


Figura 3.4. Schema della biosintesi del limonene.

Risulta quindi importante identificare e quantificare i composti normalmente presenti nella frazione volatile di prodotti alimentari, allo scopo di caratterizzarne il profilo aromatico e di studiarne le variazioni in funzione della provenienza geografica, della tecnica colturale o della tecnologia di produzione, della conservazione o dell'interazione con il materiale da imballaggio.

3.3.1 Tecniche di campionamento

I composti volatili possono essere estratti mediante diverse tecniche di campionamento :

- “spazio di testa” statico e dinamico

- “purge and trap”
- microestrazione in fase solida

Molto utilizzata è la tecnica dello spazio di testa dinamico, in cui il campione (solido o in soluzione acquosa) è contenuto in una beuta chiusa riscaldata a una temperatura tale da favorire il passaggio dei composti in fase vapore, senza provocarne la degradazione (Fig.3.5).

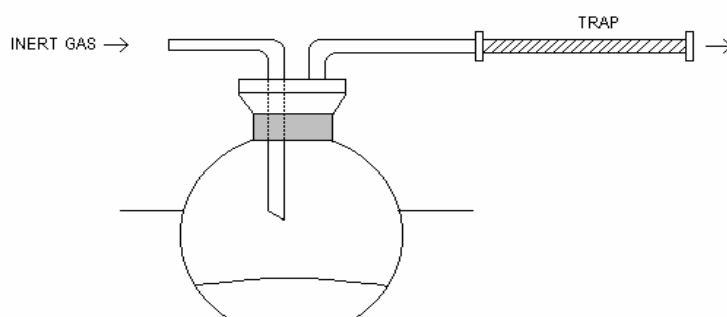


Figura 3.5. Estrazione mediante tecnica dello spazio di testa dinamico.

I composti volatili passati in fase vapore sono estratti mediante un gas inerte e puro (He o N₂) e quindi convogliati su una trappola di materiale adsorbente, in grado di trattenerli e concentrarli.

Le sostanze sono poi desorbite per via termica, utilizzando un sistema costituito da un termodesorbitore-concentratore collegato ad un gascromatografo.

3.4 Indagine proteomica

3.4.1 Scelta della cultivar e del protocollo estrattivo

Per eseguire lo studio proteomico sul limone di Rocca Imperiale è stata scelta una cultivar che più di tutte rappresenta il territorio di Rocca Imperiale, sia perché la maggiormente coltivata sia per i suoi caratteri qualitativi: il “Femminello Comune”, che tra i produttori locali viene comunemente detto “Nostrano”, che noi qui di seguito chiameremo anche “Limone di Rocca Imperiale” (Fig. 3.6).



Figura 3.6. I limoni di Rocca Imperiale (var. Femminello Comune). Sulla pianta (a); nelle fasi di post raccolta (b); durante i lavori di selezione (c); un frutto selezionato per le analisi; limoni con il marchio.

L'identificazione di marcatori a livello di proteina, ha reso necessaria la messa a punto di un protocollo di estrazione per la separazione mono- e bidimensionale delle proteine totali dai tessuti, basato essenzialmente sulla precipitazione delle proteine in ambiente acido e su una successiva purificazione in fenolo e buffer di estrazione. Il protocollo è stato selezionato in base ai criteri esistenti in bibliografia ed è il risultato di numerose modifiche, scaturite dalle prove sperimentali fatte in laboratorio.

Questo perché la separazione elettroforetica delle proteine dai tessuti vegetali è spesso inficiata da una quantità di contaminanti endogeni non proteici, che influiscono negativamente sulla qualità e sulla quantità delle entità proteiche estratte.

Tra quelli presenti nel frutto di limone hanno un'importanza rilevante le pectine, che costituiscono quasi il 10% del mesocarpo ed inficiano il prelievo di flavedo. Il processo chimico che consente di eliminarle è l'idrolisi acida, grazie alla quale si arriva alla purificazione della frazione proteica.

Su tali basi si è deciso di adottare, apportando alcune modifiche, il metodo estrattivo proposto da Wang (Wang *et al.*, 2006) , applicato a diversi frutti e basato sulla rimozione dei composti interferenti, prima di passare all'elettroforesi come metodologia d'indagine proteomica. Sono state sperimentate e messe a punto diverse metodiche di estrazione e purificazione per sviluppare un protocollo che consentisse di ottenere dei buoni risultati, sia in termini di separazione che di visualizzazione delle proteine su gel bidimensionale (Allegato 4).

3.4.2 Preparazione del tessuto e rimozione dei composti interferenti

Il flavedo (~ 1g per gel) viene frantumato con l'aiuto di pestello e mortaio, in presenza di azoto liquido e sabbia di quarzo; l'azoto liquido mantiene i tessuti a temperature molto basse e allo stesso tempo, rendendoli più duri così da facilitarne la frantumazione, mentre la sabbia di quarzo (silicon dioxide) contribuisce alla sua disgregazione fisica. Il tessuto così polverizzato viene posto in tubi da centrifuga da 2ml e processato seguendo il protocollo riportato nell'allegato 4.

Le prime due fasi di lavaggio vedono una sospensione in TCA (20% acido tricloroacetico in acqua) che effettua una idrolisi acida che consente di spezzare i legami delle pectine legate alla cellulosa per poi eliminarle nel sovrantante. Il passaggio successivo è costituito da 2 due lavaggi in 20%TCA, questa volta in acetone. La maggior parte dei solventi organici miscibili in acqua (come acetone, metanolo ed etanolo) è in grado di precipitare le proteine dalle loro soluzioni acquose.

L'azione precipitante dei solventi organici è attribuita al fatto che la loro presenza nelle soluzioni abbassa la costante dielettrica del solvente e sposta le molecole d'acqua legate alle proteine. Dato che le forze di attrazione elettrostatica sono inversamente proporzionali alla costante dielettrica del mezzo, in presenza di solventi organici, le proteine ed altri soluti formano degli aggregati che precipitano.

Dopo ogni lavaggio l'omogenato viene centrifugato a 13000 rpm per tre minuti a

4°C; dopo la centrifugazione si elimina il sovrantante e il pellet viene lavato due volte con 80% acetone, passando al vortex e centrifugando di volta in volta. I lavaggi in acetone vengono effettuati, oltre che per rimuovere le tracce di TCA anche perché, essendo l'acetone un solvente disidratante, facilita la precipitazione delle proteine. Il pellet ottenuto alla fine di questi passaggi viene lasciato ad asciugare a temperatura ambiente, in modo che l'acetone possa evaporare, ed usato per l'estrazione proteica oppure conservato a -80°C.

3.4.3 Estrazione delle proteine

Il protocollo estrattivo per la separazione mono e bidimensionale delle proteine totali si basa essenzialmente sulla precipitazione proteica in ambiente acido (20% TCA acquoso) e sulla successiva purificazione in fase fenolica. Circa 0.1 g di tessuto, ottenuto seguendo la metodica di estrazione precedentemente descritta (allegato 1), vengono risospesi in 0.8 ml di fenolo e 0.8 ml di buffer SDS (30% saccarosio, 2% SDS, Tris HCl 0.1 M pH 8.5% β-mercaptoetanolo), quindi si centrifuga a 13000 rpm per cinque minuti.

Il fenolo scioglie le proteine (incluse quelle di membrana) e i lipidi lasciando le sostanze idrosolubili (carboidrati, acidi nucleici, ecc.) nella fase acquosa; le proteine saranno purificate e concentrate nelle successive precipitazioni con ammonio acetato in metanolo. Il fenolo, inoltre, minimizza la degradazione delle proteine, dovuta all'attività proteolitica endogena, che spesso insorge durante la preparazione

dei campioni. L'SDS è, invece, un eccellente agente detergente; inoltre, tale buffer contiene saccarosio che lo rende più pesante del fenolo. La fase fenolica, ottenuta dalla centrifugazione, viene pipettata in nuovi tubi e le proteine vengono successivamente precipitate con ammonio acetato freddo in metanolo; quindi si centrifuga ancora a 13000 rpm per cinque minuti e si effettua un lavaggio in ammonio acetato 0.1 M in metanolo ed uno in 100% metanolo ed in fine altri due lavaggi con 80% acetone freddo, centrifugando di volta in volta. Il pellet ottenuto è asciugato a RT e disciolto nell'opportuno buffer. (Allegato 3)

3.4.4 Determinazione della concentrazione proteica

La determinazione della concentrazione delle proteine è effettuata ricorrendo al dosaggio colorimetrico con il reattivo di Bradford (Bradford, 1977), che coinvolge il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con le proteine.

Infatti, tale metodo si basa sul dato che, in determinate condizioni, i gruppi acidi e basici delle proteine interagiscono con gli ioni Cu^{2+} , che sono stati dissociati dal colorante, formando dei composti di colore blu.

L'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica. Il legame del colorante con le proteine causa uno shift del picco di assorbimento da 465 nm (forma rossa) a 595 nm (forma blu). Questo perché il Coomassie Brilliant Blue G-250 esiste in due differenti forme: rossa e blu. La forma rossa è convertita in quella blu dal legame del colorante con le proteine. Questo

legame è un processo molto rapido (circa due minuti) ed il complesso proteina-colorante resta stabile nella soluzione per un'ora.

Il reattivo di Bradford è costituito da: Coomassie Brilliant Blue G-250 (0.01%), alcol etilico (4.7%), acido fosforico (8.5%). Il dosaggio è stato eseguito mettendo in una provetta 500 µl di H₂O distillata, e 500 µl di reattivo di Bradford e 1 µl dell'estratto proteico. Dopo cinque minuti di reazione al buio ed a temperatura ambiente è stato misurato allo spettrofotometro (U-3410 Spectrophotometer, Hitachi) l'assorbimento di ogni campione alla lunghezza d'onda di 595 nm. Il contenuto proteico di una determinata soluzione può essere valutato in diversi modi, alcuni dei quali necessitano di uno standard di riferimento. Lo standard di uso più comune è costituito dall'albumina di siero bovino (BSA).

Per individuare l'intervallo di linearità tra densità ottica e concentrazione, abbiamo riferito i valori di assorbimento di ogni campione incognito, ad una retta di taratura costruita, nelle medesime condizioni sperimentali, sulla base dei valori di assorbimento a 595 nm delle soluzioni di BSA a concentrazione nota (1, 2, 3, 4 mg/ml). L'analisi spettrofotometrica sfrutta la proporzionalità tra assorbanza e concentrazione secondo la legge di Lambert-Beer (Harris, 1991):

$$A = \epsilon I c$$

In questa equazione, I è la lunghezza del cammino ottico (in centimetri), c la concentrazione della specie che assorbe la luce (in moli per litro) ed ϵ è il coefficiente di estinzione molare (in unità di litro per moli-centimetro).

Riportando in grafico l'assorbanza (A) in funzione della concentrazione mg/ml si ottiene la retta di calibrazione (figura 3.7). Dai valori di assorbanza degli standard si calcola il coefficiente di proporzionalità in modo da poter ricavare la concentrazione proteica presente negli estratti.

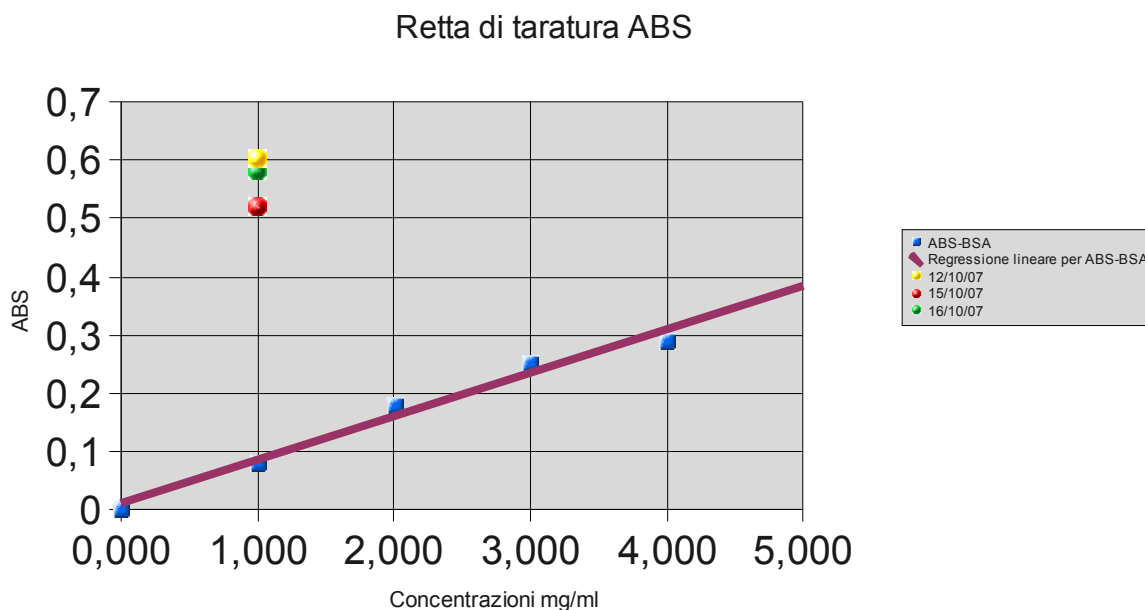


Figura 3.7 Un esempio di retta di taratura per misurare le concentrazioni proteiche presenti in tre campioni analizzati, (giallo 0,6 mg/ml; verde 0,58 mg/ml; rosso 0,52 mg/ml), per unità di volume caricate.

3.4.5 Elettroforesi

L'elettroforesi è un metodo di separazione basato sulla diversa velocità di migrazione di particelle elettricamente cariche attraverso una soluzione sotto l'influenza di un campo elettrico applicato.

Molte molecole di interesse biologico, come gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili e quindi ad ogni valore di

pH sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche, sia come cationi (+) che come anioni (-). Sotto l'influenza di un campo elettrico, queste molecole cariche, migrano verso il catodo o l'anodo, a seconda che posseggano una carica negativa o positiva. Anche composti tipicamente non ionici, come i carboidrati, possono assumere una carica se trasformati chimicamente. Il fenomeno della migrazione è, quindi, legato a numerosi fattori dipendenti oltre che dalla natura del mezzo e dal campo elettrico applicato, anche dalla massa, dimensione, carica e forma delle varie particelle, ossia dalla loro mobilità elettroforetica. Perciò, la mobilità elettroforetica di una particella, cioè la sua attitudine a muoversi in un determinato mezzo, è semplicemente una funzione del rapporto fra carica e raggio della particella e, quindi, varia da una particella ad un'altra. Su questa proprietà si basa essenzialmente il principio di separazione elettroforetica; infatti, applicando un campo elettrico ad una miscela ionica si avrà la migrazione delle varie specie, con velocità diversa a seconda delle rispettive mobilità, e, dopo un certo tempo, le varie particelle avranno percorso tratti diversi di soluzione, risultando in questo modo separate.

Questa tecnica è difficilmente applicabile alla separazione di particelle di piccole dimensioni, in quanto queste giungerebbero agli elettrodi in un tempo estremamente breve; al contrario, risulta un mezzo di separazione eccellente per macromolecole ed in particolare per le proteine.

I fattori che influenzano una separazione elettroforetica sono di due tipi: quelli

dovuti alla caratteristica degli ioni e quelli legati alle proprietà del sistema nel quale ha luogo la migrazione (tampone). Il tampone ha la funzione di rendere possibile il passaggio della corrente e di mantenere il pH costante durante il processo elettroforetico; essendo la carica, assunta da alcune specie ioniche, diversa a seconda del pH della soluzione, una variazione del pH produce una variazione nella carica dello ione e, di conseguenza, una variazione della sua mobilità.

La velocità di migrazione è direttamente proporzionale alla carica netta del campione e diminuisce all'aumentare del peso molecolare, questo perché aumentano le forze frizionali ed elettrostatiche. L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta fondamentalmente da due parti: un alimentatore, che fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi, ed una cella elettroforetica, costituita dagli elettrodi (collegati ai rispettivi poli dell'alimentatore), dallo scomparto per il tampone, da un sostegno per il supporto elettroforetico e da un coperchio trasparente di materiale isolante.

Per l'elettroforesi possono essere utilizzati supporti di varia natura, quali carta per piccole molecole (aminoacidi, nucleotidi), amido per la separazione di isoenzimi, poliacrilammide per proteine e oligonucleotidi (DNA fino a 500 bp) ed, infine, agarosio per proteine molto grandi ed acidi nucleici (DNA da 500 bp a 1 M bp). Sebbene come supporto vengano utilizzati materiali relativamente inerti, essi possono presentare effetti di adsorbimento, di elettro-osmosi e di filtrazione molecolare, che modificano la velocità di migrazione dei componenti. Quindi, la

scelta del supporto da usare dipende, oltre che dal tipo di sostanza da separare, anche e soprattutto dal grado di risoluzione che si vuole ottenere; nel nostro caso, visto che ci siamo occupati della separazione proteica, è stato scelto come supporto il gel di poliacrilammide. I gel di poliacrilammide vengono preparati facendo copolimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N, N'-metilenbisacrilammide.

La struttura della bis-acrilammide è costituita essenzialmente da due molecole di acrilammide legate da un gruppo metile. La bis-acrilammide viene utilizzata come agente in grado di formare legami crociati (cross-linking agent). I monomeri di acrilammide polimerizzano nel senso testa-coda e occasionalmente si legano ad una molecola di bis-acrilammide. Ciò fa sì che nella catena venga introdotto un secondo sito per l'estensione della catena. In questo modo si forma una matrice con dei legami crociati a struttura ben definita.

Il processo di polimerizzazione dell'acrilammide è un tipico esempio di catalisi radicalica e inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato e della base N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero (cioè una molecola con un elettrone spaiato).

Se rappresentiamo il radicale libero con R (il punto rappresenta l'elettrone spaiato) e il monomero di acrilammide con M, possiamo schematizzare la polimerizzazione.

In questo modo si formano lunghe catene di acrilammide, tenute insieme da legami crociati derivanti dall'inserzione occasionale, all'interno della catena di molecole, di bis-acrilammide. Dal momento che l'ossigeno rimuove i radicali liberi dalla soluzione, tutte le soluzioni per la preparazione del gel vengono degassate prima dell'utilizzo. I gel di acrilammide vengono definiti in base alla percentuale totale di acrilammide presente, e le dimensioni dei pori del gel sono in relazione alle concentrazioni di acrilammide e bis-acrilammide. Pertanto, gel a percentuale bassa (ad esempio, 3%) possiedono pori di grosse dimensioni e sono utilizzati nell'elettroforesi di proteine dove la migrazione delle molecole deve avvenire senza l'effetto delle forze frizionali. Gel di acrilammide a bassa percentuale sono usati anche per i gel di impaccamento (stacking gel) nella SDS-PAGE e per separare DNA. Gel con una percentuale compresa tra il 10% e il 20% di acrilammide vengono utilizzati in tecniche quali la SDS-PAGE, dove le dimensioni più piccole dei pori del gel introducono un effetto di filtrazione, che contribuisce a separare le proteine in base alla loro dimensione.

3.4.6 L'elettroforesi in SDS-PAGE

E' uno dei metodi di più largo impiego per l'analisi qualitativa di miscele di proteine, ed è particolarmente utile per valutare la purezza dei campioni durante purificazione. L'SDS-PAGE è basata sulla separazione delle proteine in funzione delle loro dimensioni e si avvale dell'utilizzo di un detergente anionico, il sodio dodecilsolfato ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$).

I campioni da separare in SDS-PAGE vengono dapprima bolliti per tre minuti in un tampone (sample buffer) contenente SDS e β -mercaptoetanololo. Il β -mercaptoetanololo riduce i ponti disolfuro, eventualmente presenti nelle proteine, e destabilizza la struttura terziaria, mentre l'SDS legandosi fortemente alle proteine, ne provoca la denaturazione

L'SDS legato conferisce una carica netta negativa alla proteina, mascherando la carica intrinseca della proteina stessa. I complessi proteina-SDS sottoposti ad elettroforesi si muoveranno verso l'anodo e, per le proprietà di setaccio del gel, la loro mobilità dipenderà di conseguenza esclusivamente dal peso molecolare. Il sample buffer contiene anche un colorante tracciante ionizzabile (blu di bromofenolo), che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Sono presenti, inoltre, saccarosio o glicerolo, che hanno la funzione di rendere più densa la soluzione del campione. Ciò permette di stratificare senza problemi il campione sul fondo del pozzetto.

Questo tipo di elettroforesi, messa a punto da Laemmli nel 1970 (Laemmli, 1970), permette di determinare il peso molecolare di proteine ignote confrontando la mobilità delle proteine dei campioni con quella di marker proteici a peso molecolare noto. Tale tecnica permette anche una stima approssimata della quantità di proteina caricata su gel attraverso l'intensità di colore delle singole bande.

Una versione dell'SDS-PAGE particolarmente utilizzata è rappresentata da un sistema di tipo discontinuo. Infatti, la risoluzione delle bande proteiche viene

incrementata se si applicano i campioni su un breve tratto di gel a concentrazione più bassa di acrilammide (stacking gel), costituito da una matrice a pori larghi, posto sopra il gel principale a concentrazione più alta di acrilammide, detto gel di risoluzione (resolving gel), nel quale ha luogo la separazione delle singole proteine. Lo stacking gel, avendo pori molto larghi (6% acrilammide), rende possibile la libera migrazione delle proteine e le concentra in una sottile banda, prima che esse vengano risolte durante la migrazione nel gel di separazione, che ha una trama molecolare più fitta (12.5% acrilammide).

La corsa è eseguita sotto voltaggio costante (200 V) per circa tre ore e termina quando il blu di bromofenolo raggiunge il fondo del gel, perché come abbiamo detto precedentemente, essendo una molecola molto piccola, non subisce alcun effetto frizionale per cui rappresenta il fronte di migrazione.

Terminata la corsa il gel viene rimosso dalle due lastre di vetro e messo a colorare sotto agitazione in una soluzione colorante (Coomassie Brilliant Blue), costituita da 0.25 g di Coomassie, 90 ml di metanolo/acqua distillata e 10 ml di acido acetico per circa tre ore. I coloranti a base di Coomassie sono i più utilizzati a causa della semplicità d'uso, dell'elevata affinità per le proteine, dell'elevato coefficiente di estinzione e per la loro compatibilità con altre tecniche analitiche come il sequenziamento di Edman e la spettrometria di massa.

L'SDS-PAGE spesso viene utilizzata dopo ogni singolo passaggio di un protocollo di purificazione per verificare la purezza del campione. Infatti, in questo

tipo di elettroforesi a una proteina pura corrisponde una singola banda.

Proteine multimeriche, costituite, quindi, da diverse subunità produrranno, invece, più bande, ognuna corrispondente ad una singola subunità. Inoltre, dal momento che per questa tecnica sono sufficienti quantità molto piccole di proteina (1-10 μg), solo una piccola frazione del materiale viene utilizzata per verificare la purezza e determinare la massa molecolare relativa della proteina purificata, utilizzando una singola separazione elettroforetica.

3.4.7 Isoelettrofocalizzazione (IEF)

Questa tecnica permette di separare le molecole, in funzione del loro diverso punto isoelettrico, per cui risulta ideale per la separazione di molecole anfotere, come ad esempio le proteine. Il sistema per IEF più utilizzato è quello che utilizza gel orizzontali montati su piastre di vetro o foglietti di materiale plastico.

La separazione avviene applicando una differenza di potenziale alle estremità di un gel. Il gel, contiene un gradiente di pH, formato introducendo al suo interno delle molecole chiamate anfolti, le quali sono costituite da miscele complesse di acidi poliammino-policarbossilici sintetici.

Vengono utilizzati abitualmente gel a bassa percentuale di poliacrilammide (4% circa) per evitare effetti di setaccio molecolare, ma si possono utilizzare anche gel di agarosio, soprattutto nei casi in cui si studiano proteine con massa molto alta, per le quali anche gel di poliacrilammide a bassa concentrazione possono dare un effetto

setaccio.

Per la preparazione di un gel per IEF gli anfoliti, opportunamente scelti per coprire l'intervallo di pH desiderato, vengono miscelati insieme alla riboflavina nella soluzione di acrilammide. Successivamente la miscela viene versata su una lastra di vetro, sui bordi della quale sono presenti due sottili spaziatori, e su questa viene applicata la seconda lastra di vetro per formare il "gel cassette". Il gel viene fatto polimerizzare con un processo chiamato fotopolimerizzazione, illuminando, cioè, la soluzione con una luce intensa.

La fotodecomposizione della riboflavina genera un radicale libero, che è l'iniziatore della reazione di polimerizzazione. Una volta formato il gel, il vetro superiore viene rimosso lasciando il gel incollato alla prima lastra di vetro. Due elettrodi a stoppino, costituiti da sottili strisce di carta da filtro inumidita (l'anodo è imbevuto di una soluzione di acido fosforico, mentre il catodo di una soluzione di soda) sono poste lungo i due lati maggiori del gel, quindi, viene applicata una differenza di potenziale che determina, mediante la migrazione degli anfoliti, la formazione di un gradiente di pH tra catodo e anodo. Dopo aver tolto la corrente, i campioni, vengono applicati, appoggiando sopra il gel, pezzetti di carta da filtro imbevuta della soluzione del campione. Viene quindi applicata una differenza di potenziale per circa trenta minuti, per permettere ai campioni di migrare all'interno del gel, ed infine, vengono rimossi i pezzetti di carta da filtro.

A seconda della posizione del gradiente nel quale i campioni sono stati caricati,

le proteine che si trovano ad un pH inferiore al loro punto isoelettrico saranno cariche positivamente e, quindi, inizieranno a migrare verso il catodo, mentre le proteine che vengono applicate sul gel a valori di pH superiori al loro punto isoelettrico, saranno cariche negativamente e, di conseguenza, migreranno verso l'anodo. Il pH del gel, tuttavia tende a salire man mano che le proteine si spostano all'interno del gradiente, e contemporaneamente, la carica positiva della proteina tende a diminuire, mentre la carica negativa tende a salire, fino a che queste raggiungeranno quella zona del gel dove il loro valore di pH è uguale al loro punto isoelettrico. A questo valore di pH, la proteina assume lo stato di zwitterione (ione dipolare), cioè senza carica netta, e quindi si arresta. Dopo la focalizzazione dei campioni, il gel deve essere colorato per la rilevazione delle proteine. Tuttavia, questa operazione non può essere eseguita subito dopo la corsa, poiché verrebbero colorati anche gli anfiliti e, quindi, si otterrebbe un gel completamente blu, pertanto, il gel deve essere lavato con una soluzione di fissazione (ad esempio, TCA al 10%), che fa precipitare le proteine nel gel, fissandole, e lava via gli anfiliti. Successivamente, il gel viene colorato con Coomassie Brilliant Blue e quindi decolorato.

Il pI, di una particolare proteina, viene solitamente determinato, facendo correre sul gel una miscela di proteine con pI noto. Dopo la colorazione, si misura la distanza di migrazione di ogni banda da un elettrodo e la si pone in grafico in corrispondenza del valore di pI (il valore del pH in quel punto del gel). Utilizzando questa retta di calibrazione è possibile determinare il pI di una proteina direttamente dalla sua

distanza di migrazione.

L'isoelettrofocalizzazione, è, dunque, una tecnica analitica molto sensibile, ed è particolarmente utile per studiare le eventuali microeterogeneità di una proteina. Ad esempio, una proteina, può apparire come una singola banda in un gel contenente SDS, mentre può dare tre bande in IEF. Ciò può accadere, quando la proteina esiste in tre forme fosforilate, in quanto la presenza di uno o due gruppi fosfato, non produce una differenza significativa nella massa molecolare relativa (determinata attraverso SDS-PAGE), mentre la differenza di carica può essere determinata in IEF.

3.4.8 Elettroforesi bidimensionale

L'elettroforesi bidimensionale è una tecnica basata sull'accoppiamento di due metodi elettroforetici monodimensionali, che presentano un alto potere di risoluzione: a) l'isoelettrofocalizzazione (IEF) nella quale le proteine sono separate in base alla loro carica (pI), e b) l'elettroforesi in un gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) nella quale la separazione avviene in base alle dimensioni delle proteine. L'elettroforesi bidimensionale è la tecnica più utilizzata nell'analisi del proteoma perché permette di separare in una sola operazione l'intero contenuto di estratti di cellule sulla base dei punti isoelettrici (IE=pH) e del peso molecolare (PM) (figura 3.8).

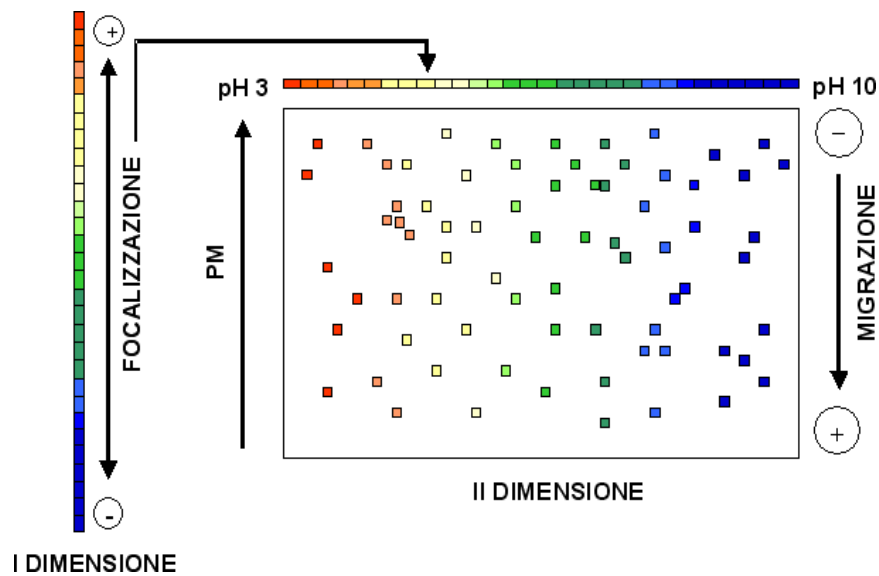


Figura 3.8. Schema della separazione delle proteine nel gel bidimensionale, in cui vengono separate prima in base al punto isoelettrico e poi in base al loro peso molecolare. Il risultato è una mappa di spot che possono essere ulteriormente separati, identificati e caratterizzati.

Per l'elettroforesi bidimensionale i campioni proteici vengono diluiti con 250 μ l di tampone di reidratazione, costituito da 7 M urea (per solubilizzare e denaturare le proteine), 4% CHAPS (per solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica), 2 M tiourea (in aggiunta all'urea migliora la solubilizzazione soprattutto delle proteine di membrana), 65 mM DTT (per rompere i ponti disolfuro). Infine, si aggiungono 0.5% di IPG buffer di pH uguale a quello della strip (per migliorare la solubilizzazione e separazione del campione) e 0.5% di soluzione di blu di bromofenolo (per visualizzare il fronte di migrazione). Il campione così preparato viene distribuito nell'holder su cui successivamente viene posizionata la strip (7-13cm NL pH 3-10 o 18cm NL pH 3-11) facendo attenzione a non formare bolle. Infine, prima di essere posizionata sull'IPG-phor (Bio-Rad) l'IPG viene ricoperta con

olio minerale, che isola dal contatto con l'aria, limitando così il flusso elettroendoosmotico generato dall'anidride carbonica, l'evaporazione dei componenti volatili della soluzione di idratazione e la successiva cristallizzazione dell'urea.

A questo punto l'unità di focalizzazione va programmata tenendo conto del tipo, del numero di IPG e della quantità di campione caricato. Terminata la corsa (circa 26 ore), le strip vengono equilibrate prima di essere trasferite nel gel di poliacrilamide della seconda dimensione. Ogni strip va trasferita nella camera di riequilibrio contenente un volume, tale da coprire completamente la strip.

Questa fase ha una durata massima di trenta minuti; infatti, una durata inferiore ai venti minuti non assicura un buon trasferimento delle proteine dalla prima alla seconda dimensione, mentre una durata superiore può determinare la perdita di materiale proteico per diffusione nella stessa. La soluzione utilizzata per l'equilibratura contiene urea, SDS, glicerolo e Tris-HCl pH 8.8. L'urea e il glicerolo riducono l'effetto elettroendoosmotico ed aumentano la solubilità delle proteine, il Tris mantiene il pH della strip ad un livello appropriato per la corsa della seconda dimensione e l'SDS complessa le molecole proteiche rendendone uniforme la carica, consentendone la separazione in funzione della massa molecolare.

Le strip vengono quindi sottoposte a riduzione e alchilazione utilizzando due soluzioni di equilibratura, contenenti la prima 2% DTT, che preserva lo stato ridotto di denaturazione delle proteine analchilate, e la seconda, 2.5% iodoacetamide, che alchila i gruppi tiolici delle proteine preservando la riossidazione durante

l'elettroforesi.

Entrambi questi passaggi vengono effettuati a RT mantenendo le strip in continua agitazione. Dopo la fase di riequilibrio le strisce di IPG vengono poste sulla sommità del gel di acrilammide e sigillate con una soluzione di agarosio allo 0.5% disciolto a caldo nel tampone di elettroforesi.

La corsa è eseguita a corrente costante (45 mA/gel). Dopo l'elettroforesi, le proteine sono visualizzate con Coomassie Brilliant Blue. Con questo metodo è possibile normalmente risolvere da 1000 a 2000 proteine diverse presenti in un estratto cellulare.

3.4.9 Analisi d'immagine con software PDQuest e normalizzazione

Le immagini dei gels bidimensionali (almeno 3 per ogni campione), acquisite tramite un densitometro (GS-700 e GS-800, Bio-Rad), vengono analizzate con il software PDQuest (Bio-Rad). Questo complesso e sofisticato software offre una valida analisi comparativa e consente l'osservazione simultanea di più gels. L'intensità di ogni singolo spot presente sui gel viene confrontata all'interno di ogni singolo campione analizzato (differenti trattamenti, differenti provenienze) usando un'appropriata analisi statistica.

In una prima fase di studio vengono presi in esame i gel ottenuti dallo stesso campione, con le medesime condizioni di corsa, le cui immagini vengono sovrapposte e fuse in un'unica immagine che rappresenta il Master gel nel quale

sono presenti gli spot comuni a tutti e tre i gel. Solo le proteine che presentano gli stessi punti isoelettrici e gli stessi pesi molecolari vengono raffigurate nel Master gel, escludendo tutti gli spot differenti. Ciò permette di avere il quadro completo dei peptidi maggiormente rappresentativi di quel campione, escludendo gli spot che possono essere generati da una contaminazione nell'esecuzione e preservando gli spot che ad occhio nudo potrebbero sembrare dei falsi positivi, solo perché poco evidenti.

I gel ottenuti nelle medesime condizioni sperimentali, appartenenti ai differenti campioni sono invece attentamente studiati nelle loro differenze. In questa seconda fase vengono individuati ed isolati, grazie ad un'attenta analisi d'immagine, gli spot differenzialmente espressi selezionati per l'identificazione. A tale scopo le macchie vengono tagliate e digerite sul gel con tripsina dopo un'attenta preparazione che prevede differenti fasi di sospensione.

Quando si confrontano dei gel, ci sono spesso una serie di variazioni che non sono riconducibili ad una vera differenza di espressione proteica ma ad esempio a una leggera differenza nella quantità del materiale caricato tra i diversi gel o differenze nell'intensità della colorazione tra un gel e l'altro. Si ritiene dunque necessaria una normalizzazione dei gel che si vogliono confrontare. Esistono differenti metodi di normalizzazione tra cui scegliere a seconda del caso; ad esempio è possibile normalizzare per una fattore scelto dall'operatore, nel caso in cui si confrontino gel in cui sono caricate quantità di proteine differenti e note. Un sistema

di normalizzazione è ad esempio il “total quantity in valid spot”, per cui la quantità grezza di ogni singolo spot è divisa per la quantità totale di tutti gli spot del gel.

3.4.10 Preparazione degli spot e digestione in gel con tripsina

La digestione in gel è la pratica più correntemente usata: dopo l'excisione degli spot, la proteina intrappolata nel gel subisce opportuni lavaggi e trattamenti seguiti dalla digestione. Nel corso di questa tesi è stato utilizzato un protocollo che si distingue per la sua rapidità e semplificazione nella procedura.

I singoli spot proteici sono stati tagliati dal gel con un bisturi e preparati per la digestione enzimatica. I frammenti dei gel sono stati posti in tubi da 0.5 ml e lavati con acqua bidistillata sterile. A seguito l'acqua è stata rimossa e sono stati aggiunti 100 µl di 1:1 ACN/AmBic (Aceto nitrile/Bicarbonato di Ammonio) in ogni tubo con successiva sonicazione di 5 minuti, in vasca ultrasonica, per effettuare la decolorazione degli spots dal Coomassie Brilliant Blue, che potrebbe interferire con l'analisi spettrometrica; un secondo passaggio ha previsto l'immersione degli spots in 100µl di 100% ACN e ulteriore trattamento in vasca ultrasonica per 5 minuti, per la disidratazione del gel. Altri due passaggi successivi consistono di una sospensione in ditiotreitolo (DTT) sciolto in 40 µl di AmBic 25mM, con azione riducente e di una risospensione in iodoacetammide (IAM) disciolta in 30 µl di AmBic 25mM, per alchilare i titoli precedentemente ridotti; entrambi prevedono un passaggio nella vasca ad ultrasuoni per 5 minuti che ne favorisce l'azione. Gli ultimi due lavaggi

avvengono in 100µl di 1:1 ACN/AmBic e 100µl di 100% ACN, sempre con sonicazione di 5 minuti.

A questo punto si può effettuare la digestione triptica che allo stato attuale è quella che dà i migliori risultati nella preparazione del campione proteico in vista dell'analisi in MS.

La tripsina è, in genere, la proteasi più utilizzata in quanto presenta caratteristiche competitive rispetto ad altre proteasi:

- genera una limitata quantità di prodotti di autolisi;
- produce peptidi in un range di massa che è tipicamente tra 500 e 3000 Da ovvero compatibile con la spettrometria di massa (MALDI ed ESI);
- la sua massa molecolare (~24 kDa) ne facilita la penetrazione nel gel e quindi la digestione;
- mantiene l'attività in differenti solventi e agenti denaturanti (esempio in presenza di urea o SDS);
- ha un'alta specificità di taglio, infatti taglia la molecola proteica a livello dell'arginina e della lisina.

La tripsina viene disciolta in Acido Trifluoroacetico (TFA) ad una concentrazione di 0,1 µg/µl, aliquotata e disidratata con centrifuga *Speedvac*. Per ogni aliquota da 1 µg di tripsina secca, vengono aggiunti 60 µl di 12.5mM AmBic/10%ACN. Ad ogni spot si aggiungono 15 µl di questa soluzione e, per favorirne l'azione si effettua un trattamento in sonoreattore per 2 minuti e immediatamente dopo viene bloccata con

20µl di Acido Formico. Si preleva questa soluzione nella quale è ormai estratta una buona percentuale proteica, e si risospende lo spot rimasto nel tubo in 25 µl di ACN 50%/TFA 0,1% che, dopo un altro trattamento in sonoreattore, che vengono aggiunti alla soluzione proteica precedentemente ottenuta ed incubata a 4-5°C. I campioni sono pronti ora per l'analisi in spettrometria di massa. Ne viene prelevata un'aliquota (0.5-1 µl) alla quale si aggiunge un egual volume di matrice (acido-α-ciano-4-idrossinamico); 1µl di questa nuova soluzione viene posto, con estrema attenzione, sui pozzetti della piastra del MALDI-TOF. La miscela è stata fatta evaporare in un mini-box per consentire la formazione dei cristalli di matrice e permettere al campione proteico di rimanere intrappolato sul sito della piastra. I peptidi estratti sono quindi pronti per essere sottoposti all'analisi.

3.4.11 Spettrometria di massa mediante LC-MS/MS e MALDI-TOF

Le possibilità di risolvere problemi analitici sono molteplici: la spettrometria di massa è uno dei sistemi più sensibili ed allo stesso tempo più selettivo. L'analisi mediante spettrometria di massa, per questa tesi, è stata effettuata in due differenti laboratori. La prima parte dei peptidi ottenuti è stata analizzata nei laboratori di ISB (Ion Source & Biotechnologies) di Milano, tramite la tecnologia LC-MS/MS, mentre la seconda parte del lavoro è stata eseguita presso il BIOSCOPE group, nella sede della FCT (Facultade de Ciencias e Tecnologia), Universidade Nova de Lisboa, utilizzando uno spettrometro MALDI-TOF del tipo *Voyager* (Applied Biosystem).

La LC-MS/MS è una tecnica altamente specifica che permette di identificare e quantificare con estrema sicurezza composti presenti in tracce (peptidi delle proteine, pesticidi, ormoni, metaboliti di farmaci) in matrici complesse. Questa tecnica, consiste nella digestione di una proteina seguita dalla separazione LC in microflusso dei frammenti peptidici. Mano a mano che ciascun peptide è eluito, è automaticamente selezionato e frammentato mediante collisione con atomi di un gas inerte (Collision Induced Dissociation, CID).

La spettrometria di massa (MS/MS) è denominata tandem e viene così chiamata perché si basa sull'impiego di due analizzatori in sequenza (MS1 e MS2) e produce la frammentazione dei peptidi per ottenere le informazioni di sequenza (Figura 3.9).

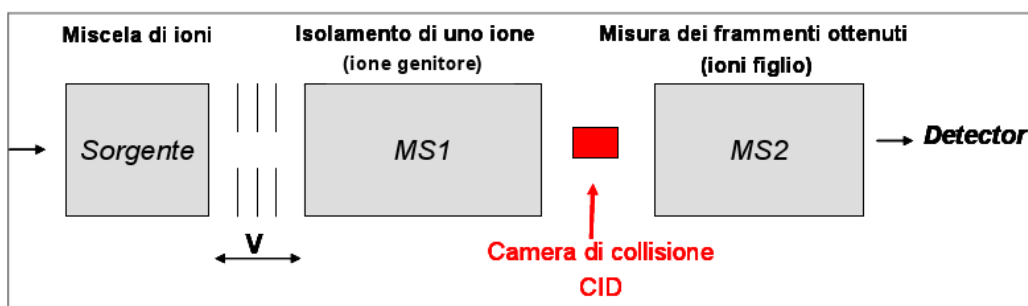


Figura 3.9. Schema di uno spettrometro di massa tandem: il primo analizzatore isola lo ione destinato alla frammentazione (ione genitore) che viene frammentato nella cella di collisione e il secondo analizzatore rileva lo spettro degli ioni frammento (ioni figlio).

L'analizzatore alternativo ai sistemi tandem è l'analizzatore di massa a tempo di volo (TOF). Per completare l'analisi dei peptidi di questa tesi è stato utilizzato il

sistema MALDI-TOF (fig.3.10).

I digeriti proteici sono stati analizzati con uno spettrometro di massa dotato di un raggio laser pulsato (337 nm) di durata 1-10 nsec ed un analizzatore a tempo di volo. Lo strumento misura il tempo che ciascuno ione impiega a raggiungere il rilevatore. Poiché tutti gli ioni possiedono la stessa energia cinetica, il tempo impiegato dagli ioni è esclusivamente in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z).

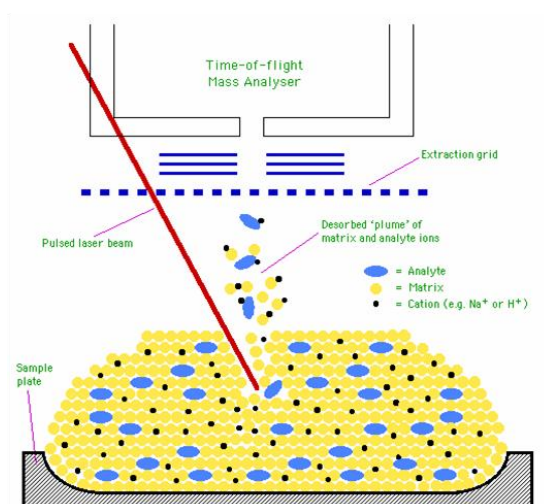


Figura 3.10. Schema di funzionamento di uno spettrometro di massa MALDI-TOF.

Per ogni 4 campioni analizzati lo strumento viene calibrato usando come calibranti dei peptidi standard di peso molecolare noto (500-5000 uma) addizionati alla matrice.

3.4.12 Identificazione delle proteine mediante database on-line

I valori di massa molecolare dei peptidi ottenuti per ciascun digerito proteico, sono stati utilizzati per l'identificazione delle proteine (specie proteica) in tre diversi database (SwissProt, NCBI nr e MSDB), utilizzando il programma Mascot (<http://www.matrix-science.com>). Il programma è in grado di confrontare i valori sperimentali immessi con quelli teorici dei

peptidi ottenuti dall'idrolisi virtuale di tutte le proteine contenute nella banca dati con l'agente proteolitico impiegato. La ricerca fornisce una lista di possibili candidati e ad ogni proteina è associato un valore (score) che indica la probabilità che i peptidi riscontrati nell'analisi appartengano a quella data proteina. In molti casi l'identificazione è pressoché inequivocabile, mentre in altri casi si ottiene solo una buona indicazione sulla natura della proteina.

L'inserimento degli spettri MALDI (fig.3.11) dei frammenti triptici all'interno di un database disponibile online ha permesso l'identificazione di numerose proteine di interesse.

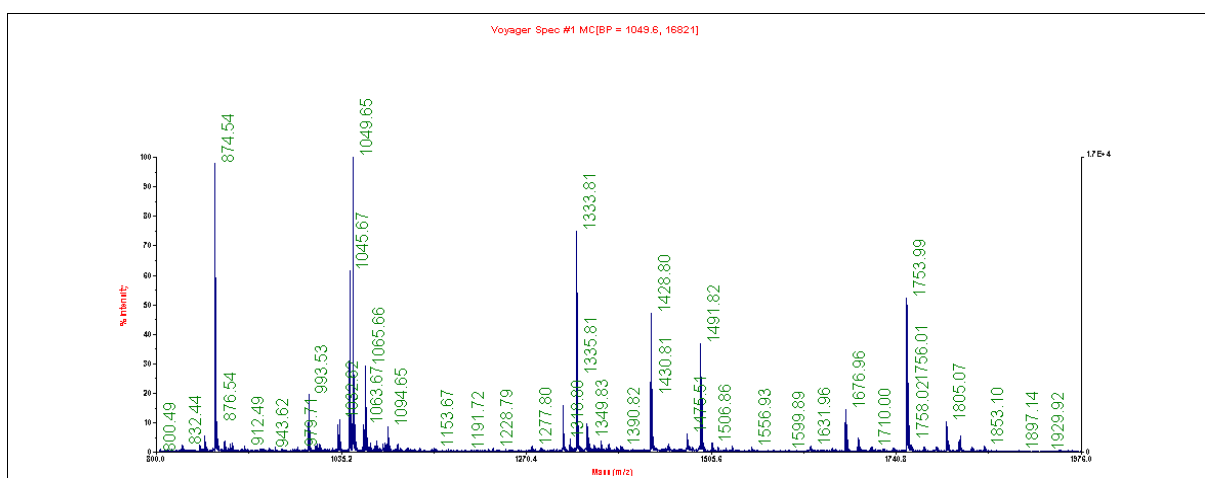


Figura 3.11. Esempio di Spettro di Massa ottenuto col programma DATA EXPLORER.

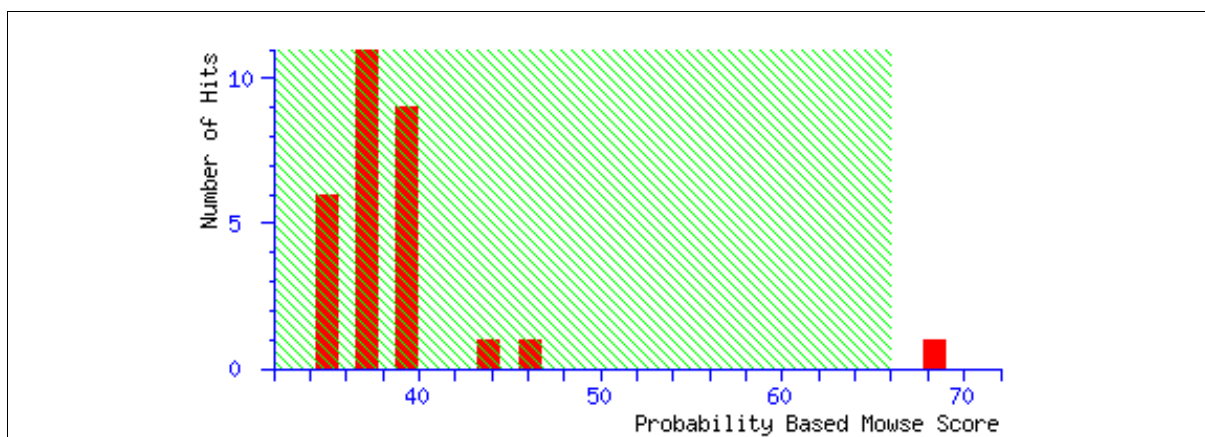


Figura 3.12. Esempio di identificazione certa di una proteina con Mascot

Protein View

Match to: **RBL_CITSI** Score: **78** Expect: **0.00044**
Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Citrus sinensis GN=rbcL PE=3 SV=1
 Nominal mass (M_r): **52999**; Calculated pI value: **6.29**
 NCBI BLAST search of [RBL_CITSI](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications
 Taxonomy: [Citrus sinensis](#)
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: **200**
 Number of mass values matched: **22**
 Sequence Coverage: **52%**

Figura 3.13. Finestra con le informazioni relative all'identificazione della proteina ricercata, riscontrate nel databases.

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MSPQTETKAS VGFKAGVKDY KLTYTTPDYV TKDTDILAAF RVTPQPGVPP
51 EEAGAAVAAE SSTGTWTAVW TDGLTSLDRY KGRCYNIEPV AGEENQYICY
101 VAYPLDLFEE GSVTNMFISI VGNVFGFKAL RALRLEDLRI PPAYTKTFQG
151 PPHQIQRERD KLNKYGRPLL GCTIKPKLGL SAKNYGRAVY ECLRGGLDFT
201 KDDENVNSQP FMRWRDRFLF CAEALYKAQA ETGEIKGHYL NATAGTCEEM
251 LKRAVFAREL GVPIVMHDYL TGGFTANTTL AHYCRDNGLL LHIHRAMHAV
301 IDRQKNHGMH FRVLAKALRL SGGDHIHAGT VVGKLEGERD ITLGFVDLLR
351 DDFVEKDRSR GIYFTQDWVS IPGVIPVASG GIHVWHMPAL TEIFGDDSVL
401 QFGGGTGLGHP WGNAPGAVAN RVALEACVQA RNEGRDLARE GNEIIREASK
451 WSPELAAACE VWKSIFFEFA AMDTL
    
```

Figura 3.14. Sequenza della proteina assegnata dal database. In rosso gli amminoacidi corrispondenti.

3.5 Utilizzo del trattamento ultrasonico

3.5.1 Trattamento con Ultrasound Energy

Il flavedo è un tessuto biochimicamente complesso la cui matrice proteica risulta difficile da estrarre e separare dal resto delle componenti. Quale intervento nelle modifiche finali al protocollo in uso si è scelto di testare l'azione delle onde ultrasoniche per verificare se risultasse utile a migliorare l'elettroforesi bidimensionale. Il trattamento è stato sperimentato presso il gruppo di ricerca BIOSCOPE (Facultad de Ciencias) della Universidad de Vigo nel Campus di Ourense, in Spagna specializzato in proteomica degli alimenti. La tecnica consiste nel sottoporre il materiale preparato per l'estrazione proteica in un sonicatore che sprigiona l'energia in forma di ultrasuoni. L'energia elettrica di cui si alimenta il sistema viene commutata in onde soniche ad altissima potenza e trasmesse dal generatore ad un blocco metallico terminale che può avere forme e dimensioni differenti (fig.3.15 e 3.16).

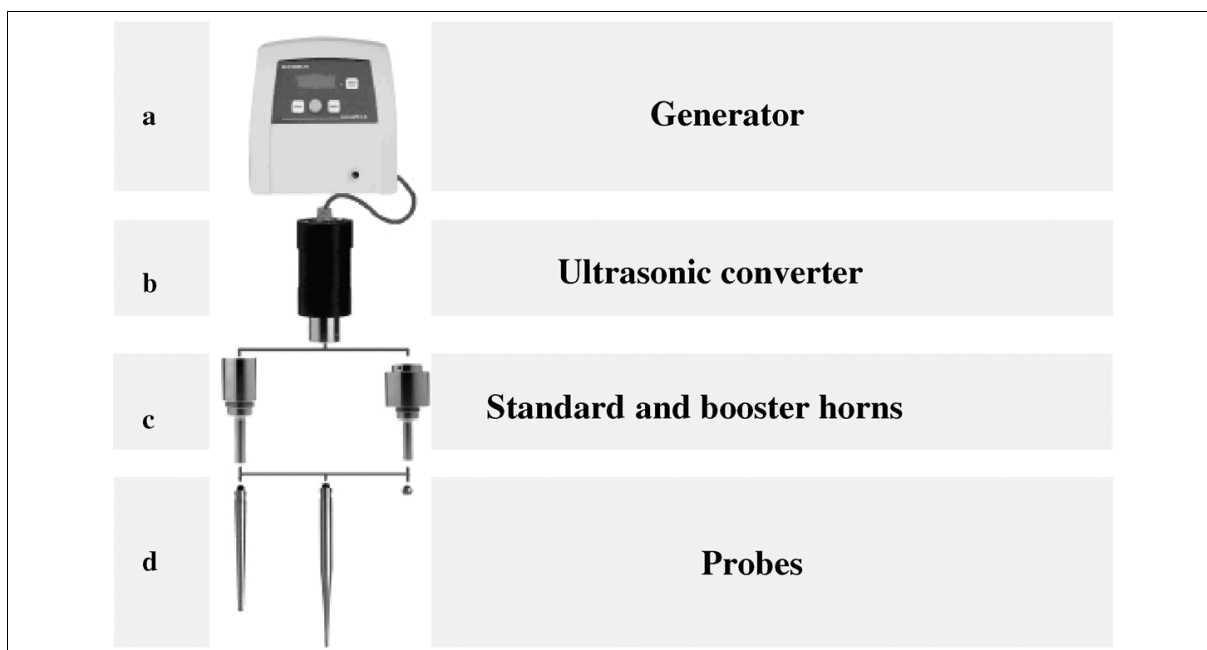


Figura 3.15. Le parti che compongono un apparato ad energia ultrasonica.

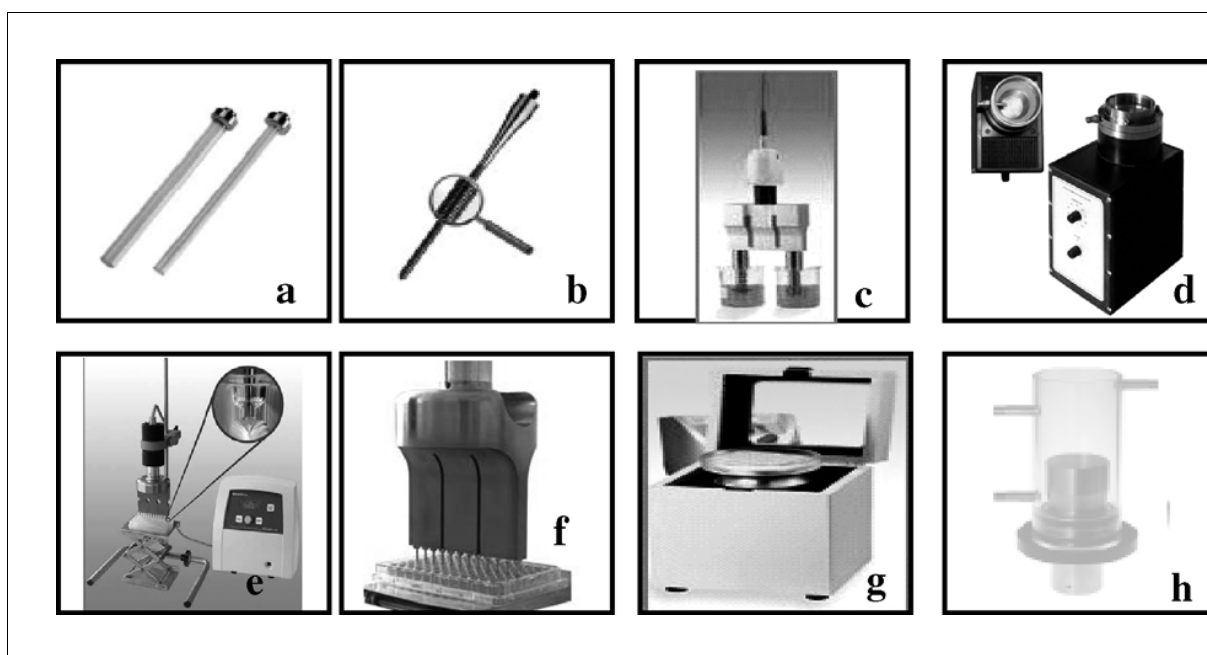


Figura 3.16. Strumenti all'avanguardia nella tecnologia ultrasonica: (a) silica glass probe; (b) spiral probe; (c) dual probe; (d) sonoreactor; (e) ed (f) multi probe; (g) microplate horns; (h) cup horns. Le parti (a,b,e,f, h) sono riproduzioni concesse da Bandelin company; la parte (d) da Dr Hielscher company; (c) e (g) con concessione della Misonix company.

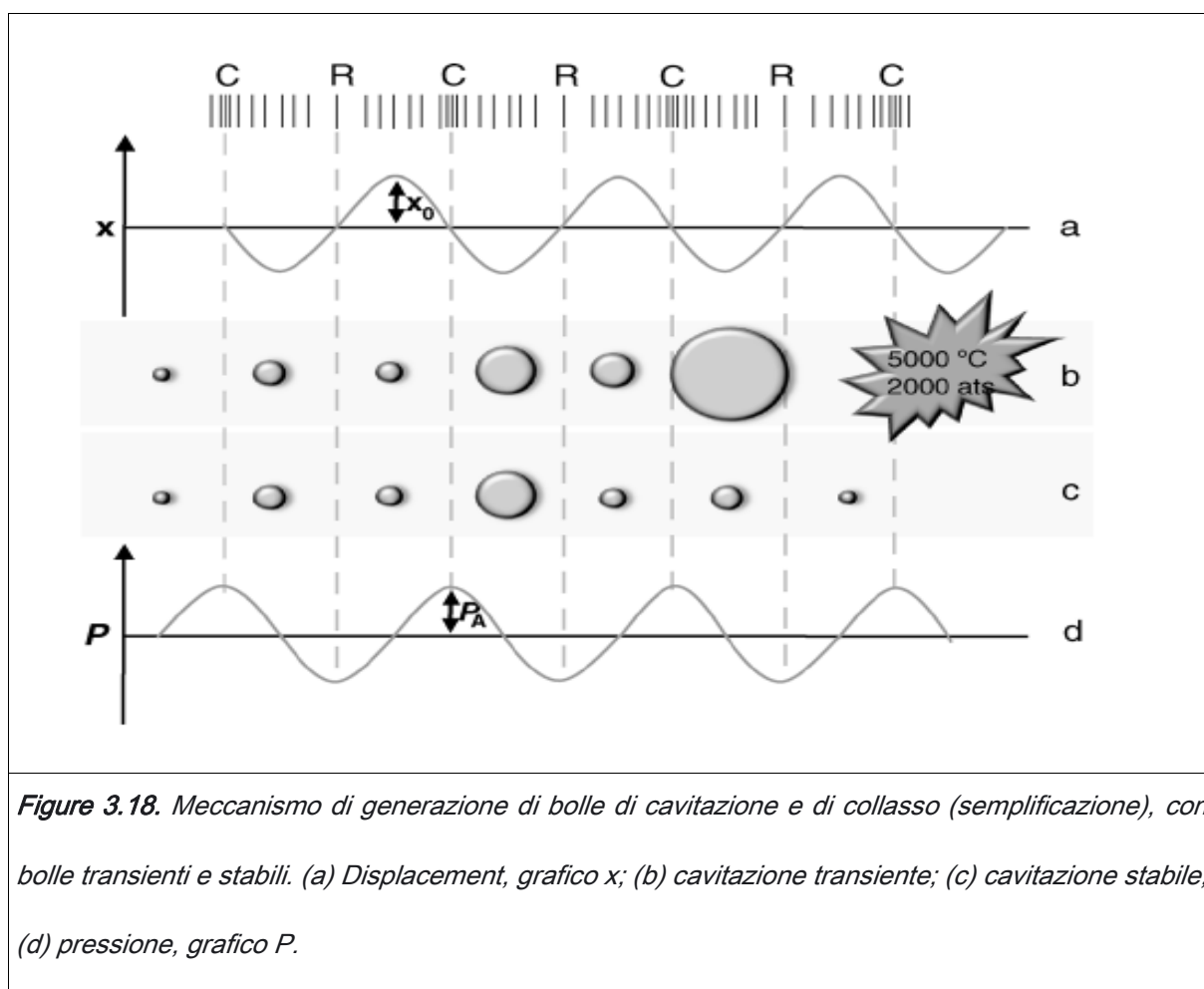
La sonicazione si riferisce espressamente all'utilizzo di ultrasuoni come agenti responsabili della lisi di una sospensione cellulare. In genere l'apparecchiatura è composta da un sonicatore che genera gli ultrasuoni e una sonda che, immersa nella sospensione, trasmette a questa le onde a ultrasuoni generate. L'energia generata è solitamente molto alta perciò i trattamenti sono inferiori al minuto di durata per evitare che il campione si surriscaldi e raggiunga temperature tali da danneggiare irreversibilmente le proteine.

Esistono sonde o bagni ad ultrasuoni. Lo strumento utilizzato presso l'università di Vigo è il SONOPULS HD 2200 (BANDELIN), un ibrido tra una sonda ed un bagno, viene comunemente detto bicchiere nel quale è contenuta una sonda dalle notevoli dimensioni che consente di lavorare anche con volumi maggiori ai 20 ml immergendo direttamente un contenitore di tipo Falcon, trattando il contenuto di più di 10 tubi da 2 ml, in un'unica soluzione, con risultati sorprendenti (figura 3.17).



Figura 3.17. SONOPULS HD 2200, con bicchiere (1) Cup horn BB 6 e Microtube holder EH 6 (2), prodotto dalla casa tedesca BANDELIN. BANDELIN electronic, GmbH & Co. KG, Heinrichstraße 3-4, D-12207, Germany Berlin TwinSonic® series, www.bandelin.com

I suoni, compresi gli ultrasuoni, sono trasmessi attraverso un mezzo fisico dalle onde che comprimono ed allungano gli spazi molecolari del mezzo attraverso cui passano. Quando l'ultrasuono attraversa il mezzo (figura 4.2) la distanza media fra le molecole varierà e oscillerà intorno a valori che rientrano nei limiti della loro posizione media. Quando la pressione negativa avrà generato un'onda ultrasonica di intensità forte e questa avrà attraversato il liquido, la distanza fra le molecole del liquido supererà la distanza molecolare minima richiesta per tenere inalterata la natura fisica del liquido, allora, nel liquido saranno generati dei vuoti. Questi vuoti sono le cosiddette bolle di cavitazione (Santos *et al.*, 2008).



Questo fenomeno avviene nel mezzo liquido, ma allo stesso modo avviene in un altro materiale immerso nel mezzo liquido, come un tessuto cellulare che costituito in maggior parte di acqua subirà gli stessi effetti a livello molecolare che subisce il mezzo liquido (fig.3.18).

3.5.2 Protocollo modificato con trattamento ultrasonico

La confermata efficacia di questo metodo applicato al trattamento di campioni di derivazione organica, comprovato da alcuni studi (Manadas *et al.* 2006) ha spinto a sperimentare questa tecnica sul protocollo estrattivo utilizzato per l'estrazione delle proteine dal limone.

Si è proceduto per gradi, partendo da singole modifiche, apportate di volta in volta. Il primo step su cui ci si è focalizzati è stato quello suggerito da Manadas *et al.*, che riguarda l'applicazione degli ultrasuoni nel passo finale del protocollo, quello della risolubilizzazione del pellet in sample buffer.

Per effettuare questa modifica si è provveduto ad eliminare l'incubazione over night del campione nel buffer sostituendola con il trattamento ultrasonico al fine di comprovare l'efficacia di questo trattamento nella visualizzazione in gel delle proteine.

In tre prove consecutive effettuate sul medesimo campione, rispettando le stesse condizioni di esecuzione, si è verificato che eliminando la fase di incubazione O.N. e sostituendola con una fase di trattamenti ultrasonici (2 volte per 1 min.,

intervallate da mix di 30 sec.), il pellet proteico finale non riesce a disciogliersi nel buffer e non porta alla visualizzazione su gel di alcuna proteina.

A questo punto è stata ripetuta l'estrazione sotto le medesime condizioni di esecuzione, riproponendo la fase di incubazione O.N. del pellet seguita da una serie ripetuta di due sonicazioni da un minuto. Questa volta con esito positivo, infatti i gel hanno mostrato una migliore visualizzazione e separazione delle bande polipeptidiche nei gel 1D, rispetto ai risultati, seppur buoni, dei gel ottenuti con la sola incubazione.

Per rafforzare l'effetto dell'energia ultrasonica sull'estrazione proteica dell'epicarpo di limone si è effettuata una seconda modifica al protocollo che ha riguardato una fase, anch'essa fondamentale nel trattamento dei materiali vegetali di piante recalcitranti ai metodi comuni di estrazione proteica, la purificazione in fase fenolica.

Durante lo step intermedio di sospensione del tessuto risultante dalle fasi di precipitazione e chiarificazione in TCA ed Acetone, si è aggiunto il trattamento ad ultrasuoni, con lo scopo di aumentare la capacità estrattiva del fenolo sulla matrice proteica presente nel tessuto polverizzato, con l'aiuto dell'energia in onde sonore (4 volte per 1 min.).

Anche in questo caso, la visualizzazione delle bande proteiche è stata migliorata, pur se di poco.

Visti gli incoraggianti risultati del metodo ultrasonico nei passaggi fondamentali

del protocollo non resta che sostituire in ogni step le miscele effettuate con il MIX con un minuto di trattamento US.

L'esito si ripete positivo, confermando l'efficacia del trattamento. Una sola cosa resta da migliorare, diminuire i tempi di esecuzione dell'intero protocollo. Il punto più critico risulta essere quello dell'incubazione O.N. del pellet finale in buffer di risospensione, che nel primo tentativo di eliminazione non ha dato buon esito.

Adesso però, si può contare in una migliore estrazione e purificazione del materiale proteico dovuto all'efficacia degli ultrasuoni previsti in ogni passaggio sia di purificazione che di estrazione.

Il tentativo sembra dare buon esito, permettendo così di abbreviare l'esecuzione dell'intero protocollo ad una sola giornata. Resta ancora un passaggio da migliorare ed abbreviare, la fase che prevede la disidratazione del campione polverizzato, prima della fase fenolica.

Il protocollo finora in uso necessita di circa quattro ore di asciugatura a RT, prima di passare alla pesatura e alla sua purificazione in fenolo. L'intervento di ottimizzazione per un protocollo più rapido è quello di sostituire la fase di disidratazione di 4 h con un trattamento ultrasonico prolungato, ripetuto più volte. Così il primo tentativo è di ripetere il trattamento 4 volte per un minuto ciascuna, ottenendo un buon risultato.

Si è così riusciti ad ottenere la semplificazione del protocollo con l'intervento dell'energia ultrasonica e l'obiettivo è stato raggiunto. Ora bisognerà sperimentare il

protocollo così modificato con l'elettroforesi bidimensionale.

L'unica differenza nella preparazione del campione consiste nella sospensione finale in buffer, in quanto per l'elettroforesi 2-D si utilizza un buffer specifico, come specificato nel paragrafo dell'elettroforesi bidimensionale.

CAPITOLO IV: RISULTATI



Capitolo IV: *Risultati*

Nel presente capitolo sono riportati i risultati ottenuti dall'indagine morfometrica, biochimica e proteomica dell'epicarpo dei campioni di frutti consideranti. In particolare, per l'analisi proteomica, data la complessità del sistema vegetale preso in esame e la difficoltà di estrazione e separazione della frazione proteica dovuta all'interferenza delle sostanze presenti nel frutto, sono riportati i dati proteomici ottenuti con due distinti metodi estrattivi; il primo basato sulla precipitazione e contemporanea purificazione delle proteine, il secondo con l'applicazione della tecnica ultrasonica che aumenta sia la resa che la qualità degli estratti proteici.

I primi risultati ottenuti da questo studio, intanto, incoraggiano sull'impiego dell'approccio proteomico per la valutazione dello stato dei tessuti studiati, mirato al monitoraggio biomolecolare e correlato alle condizioni ambientali e colturali, grazie alle quali i tessuti si sviluppano. Sarà possibile, quindi, individuare eventuali marcatori enzimatici con ruoli chiave nel metabolismo degli oli essenziali, che sembrano essere uno dei fattori caratterizzanti le *cultivar*. Non ultima, la possibilità di individuare eventuali marcatori di stress o di optimum.

I primi riscontri positivi hanno incoraggiato e spinto a migliorare la tecnica di estrazione e purificazione con l'intervento dell'energia ultrasonica, tecnica che permette di degradare a livello cellulare i tessuti trattati facendo aumentare la

superficie totale esposta alla dissoluzione chimica.

A tale proposito si è ritenuto necessario proseguire l'indagine su dei nuovi campioni sia attraverso 2D-PAGE, sia tramite Spettrometria di Massa, per l'individuazione di ulteriori proteine ed enzimi al fine di individuare altre proteine ed in particolare la Limonene Sintasi, responsabile della sintesi del limonene (Turner *et al.*, 1999 e Lücker *et al.*, 2004, Hyatt *et al.* 2007).

4.1 Risultati dell'analisi morfometrica dei frutti

I risultati ottenuti dalle indagini morfometriche dei frutti di limone, raccolti a vari stadi di maturazione e provenienti dal comune di Rocca Imperiale, sono riportati di seguito e si riferiscono alla prima fioritura o "Primofiore".

La prima serie di dati è relativa ai tipi di Femminello, presenti nelle cinque aree di Rocca Imp. precedentemente descritte, messi a confronto.

In un secondo momento, i limoni di Rocca Imperiale sono stati messi a confronto con frutti provenienti da altre regioni d'Italia, già affermati ed apprezzati in campo internazionale, che vantano il marchio I.G.P. (Sicilia e Campania).

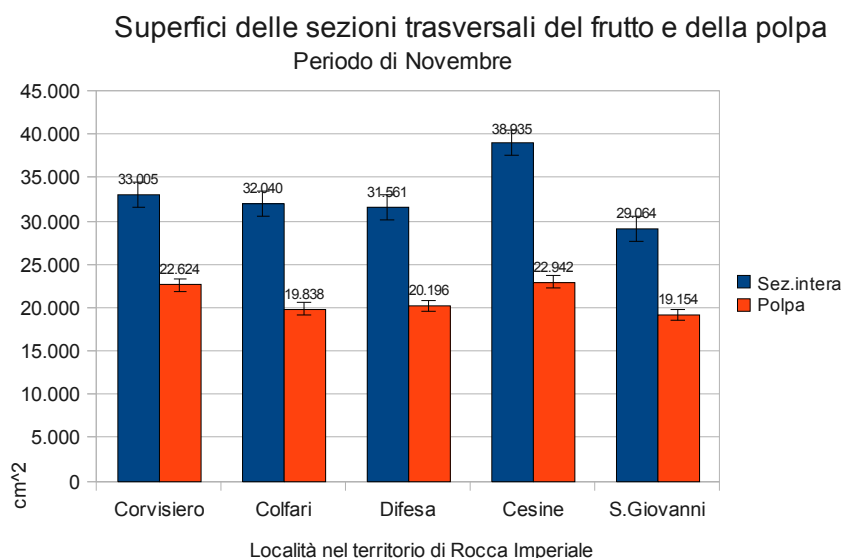


Grafico 4.1. Confronto tra le superfici medie totali e della polpa nei Limoni di Rocca

Nel grafico 4.1 sono rappresentate le grandezze delle superfici delle sezioni trasversali e quelle della polpa del frutto, elemento molto considerato dai parametri merceologici. È evidente una maggiore grandezza di entrambe le superfici dei frutti provenienti dalla località Cesine, mentre risultano simili i valori delle superfici dei frutti delle località Colfari, Difesa e S. Giovanni.

È interessante notare che, per le cultivar provenienti da Corvisiero e Cesine la superficie della polpa risulta essere paragonabile, mentre la superficie totale è di gran lunga maggiore nei frutti di Cesine. Ciò induce a pensare che, sul pericarpo totale, vi è un contenuto di polpa maggiore nei frutti di Corvisiero.

Nel seguente grafico 4.2 sono messi a confronto i due tessuti che compongono il Pericarpo del frutto e cioè, l'Albedo (Mesocarpo) ed il Flavedo (Pericarpo).

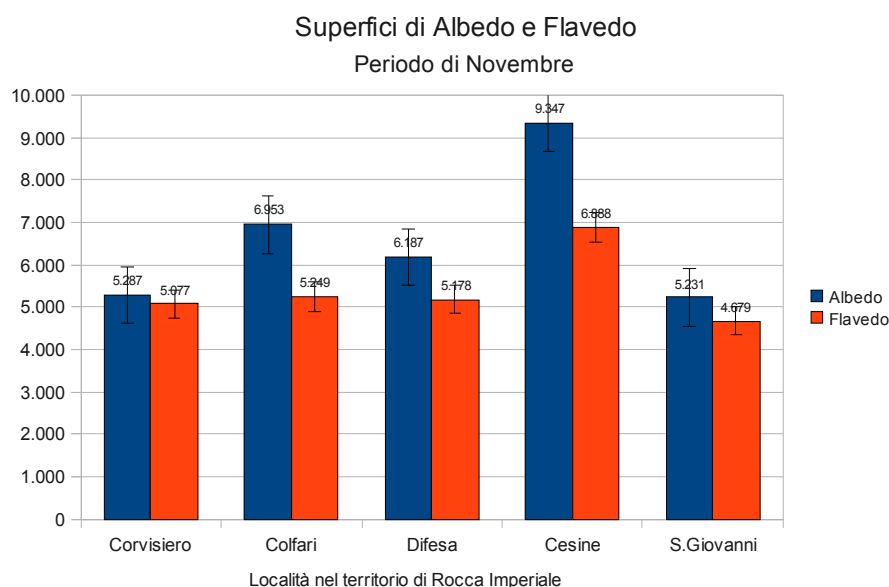


Grafico 4.2. Confronto tra le superfici medie dell'albedo e del flavedo nei Limoni di Rocca Imperiale.

Anche per ciò che riguarda albedo e flavedo, i tessuti dei frutti provenienti da Cesine mostrano dimensioni maggiori rispetto a tutti gli altri. Ciò è indicativo per eventuali utilizzi della buccia di tale frutto sia per l'estrazione delle pectine che per la produzione del pastazzo (alimento di origine biologica per animali).

Un rapporto molto basso tra albedo e flavedo (ca 1:1) si ha nei campioni di Corvisiero a dimostrazione del fatto che la buccia dei frutti di questa località è più sottile. Un rapporto paragonabile a questo è stato riscontrato anche nei frutti dell'altra coltivazione biologica (S. Giovanni).

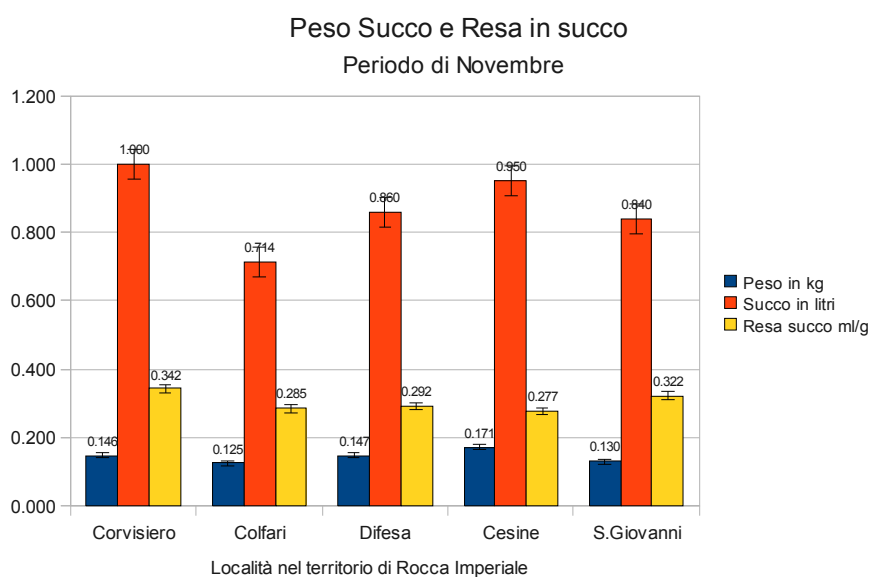


Gráfico 4.3. Confronto tra i valori di succo, peso e resa in succo nei Limoni di Rocca Imperiale.

Nel gráfico 4.3 è presa in considerazione la quantità di succo contenuto nei frutti e messa in relazione col peso, al fine di ottenere la misura della resa in succo (RS), che nei Limoni di Rocca Imperiale è sempre superiore al 25% del peso totale, come dimostrarono i dati contenuti nella tabella 4.1.

<u>% di Resa in Succo</u>	Corvisiero	Colfari	Difesa	Cesine	S. Giovanni
Novembre	34 %	29 %	29 %	28 %	32 %
Dicembre	36 %	32 %	33 %	32 %	37 %
Gennaio	38 %	37 %	36 %	33 %	41 %

Tabella 4.1. Percentuali di Resa in Succo nei tre periodi di campionamento nei Limoni di Rocca Imperiale.

La resa in succo è una tra le qualità più importanti per un agrume e corrisponde alla quantità di succo che questo produce per unità di peso. Da

precisare che i valori relativi al peso sono valori medi, mentre quelli del volume sono ottenuti dalla sommatoria di 20 misure. Il miglior risultato, nel grafico 4.3, sia in succo totale (1 litro per 20 limoni spremuti) che in resa in succo, è stato raggiunto ancora una volta dai frutti di Corvisiero.

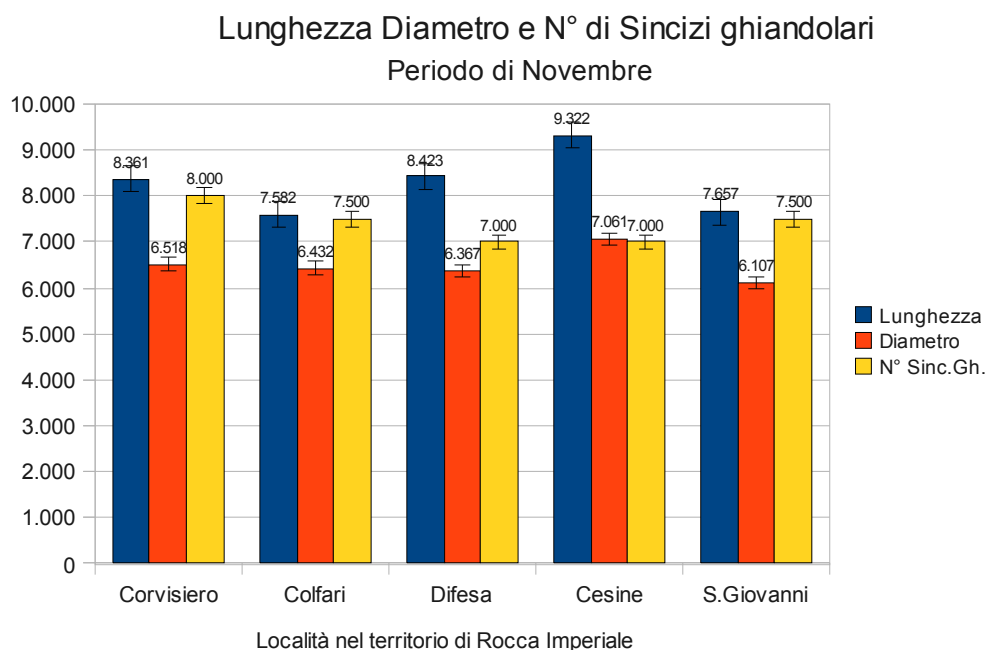


Grafico 4.4. Confronto tra lunghezza e diametro (in cm) e n° di sincizi ghiandolari nei Limoni di Rocca Imperiale.

Nella tabella 4.1, invece, il primato va ai frutti di S. Giovanni, con una percentuale massima sia a novembre (37%), che a dicembre (41%).

Nel grafico 4.4 sono riportati le lunghezze dei frutti, il diametro e i numeri dei sincizi ghiandolari, calcolati per ogni cm di circonferenza.

I frutti con maggior diametro e lunghezza sono quelli della località Cesine. È interessante sottolineare, inoltre, che nei frutti della località Corvisiero si raggiunge il

massimo numero di sincizi ghiandolari, per centimetro di circonferenza. Quest'ultimo risultato si mostra interessante, in quanto, le ghiandole che formano i sincizi sono le stesse che secernono l'olio essenziale che poi viene accumulato e conservato nel lume, fino alla deliquescenza dei tessuti, processo molto lento nel limone.

I dati relativi ai periodi successivi a novembre hanno riportato valori pressoché identici, tranne un lieve e progressivo incremento per ciascuno di essi, dovuto all'accrescimento dei frutti, che da gennaio in poi si è stabilizzato; per tale motivo non sono stati riportati i dati degli altri periodi. Tutti i frutti sui quali è stata condotta l'analisi morfometrica hanno mostrato una circolarità quasi perfetta (valore medio di circolarità pari a 1,000).

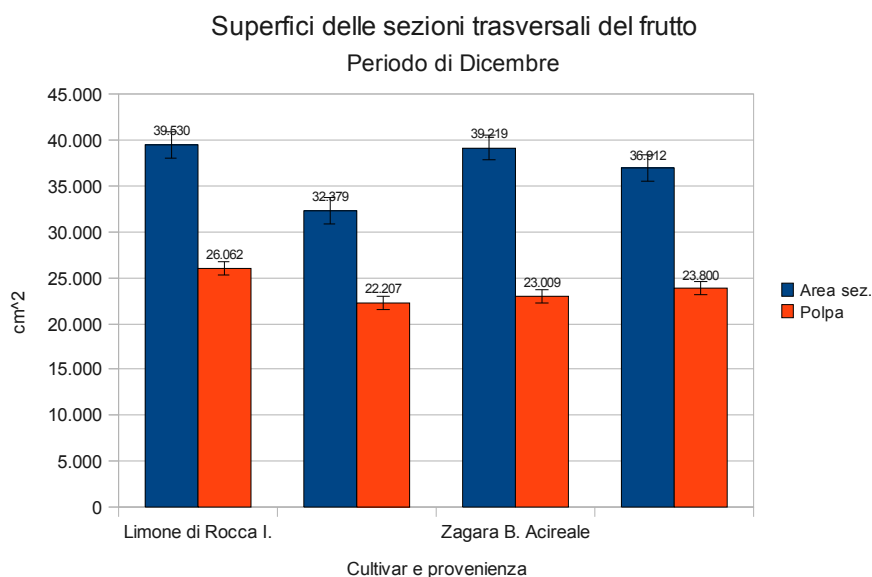


Grafico 4.5. Confronto tra le superfici medie totali delle sezioni e della polpa in diverse cultivar.

Dopo aver esaminato e descritto i caratteri peculiari del limone di Rocca Imperiale, confrontando i dati relativi ai frutti delle diverse zone del territorio

rocchese, si è passati a paragonare questi stessi risultati con quelli di altre cultivar dalle riconosciute peculiarità, provenienti da altre località italiane.

Il valore massimo, sia dell'area totale di sezione che dell'area della polpa, è assegnato al Limone di Rocca Imperiale. I valori della polpa sono paragonabili per le cultivar provenienti dalle altre zone italiane, mentre, per quanto riguarda le superfici totali, il valore minimo è stato riscontrato nella cultivar Scandurra di Acireale.

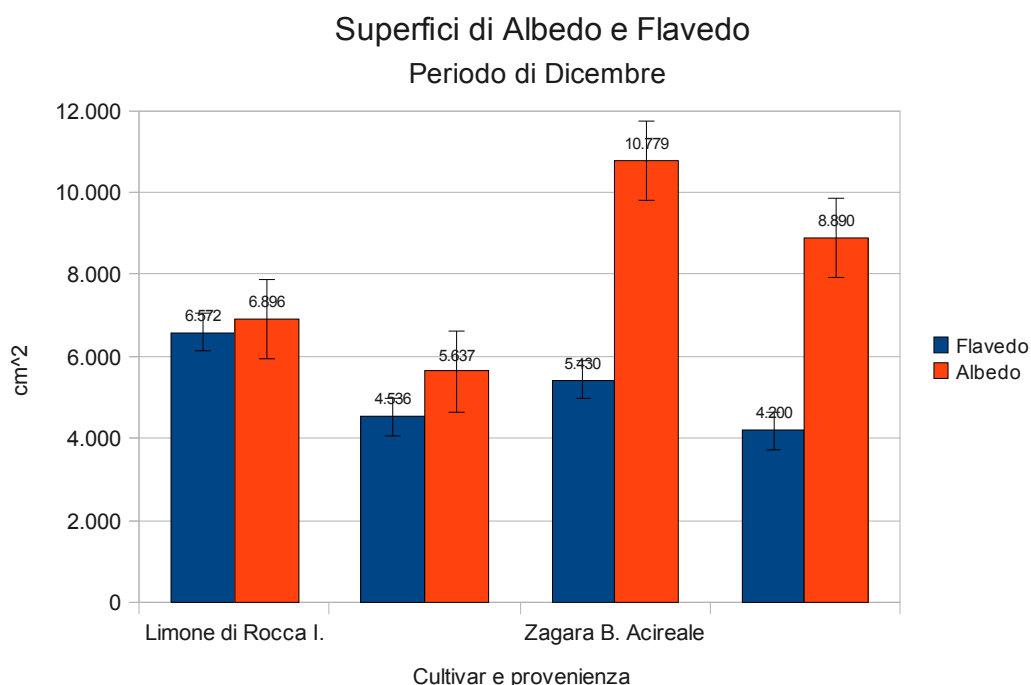


Grafico 4.6. Confronto tra le superfici di albedo e flavedo in varie cultivar.

Il grafico 4.6 mostra l'ampiezza delle superfici dell'albedo e del flavedo; è facilmente osservabile come nelle cultivar Zagara Bianca e Sfusato Amalfitano i valori dell'albedo siano molto alti in relazione ai rispettivi valori del flavedo (rapporto 2:1 ca).

È interessante notare che le superfici del flavedo dei Limoni di Rocca Imperiale sono superiori rispetto alle altre tre varietà.

L'area dell'albedo, simile a quella del flavedo, è indice di una equilibrata distribuzione tra i tessuti della buccia. Tale carattere può essere utilizzato come indicatore di qualità, insieme alle altre caratteristiche prima elencate, riscontrate nel Limone di Rocca Imperiale.

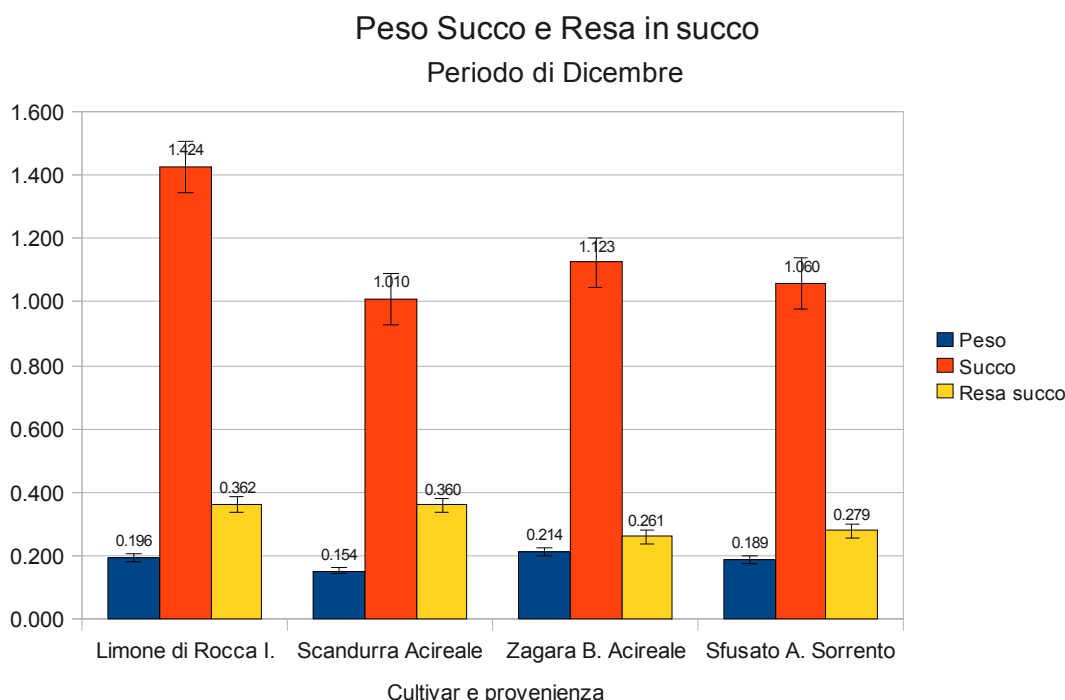


Grafico 4.7. Confronto tra il volume del succo, del peso e della resa in succo.

Il succo totale, derivante dalla spremitura di 20 limoni, ha un volume di 1,424 litri per il limone di Rocca Imperiale, che rappresenta il picco più alto non solo in relazione alle altre cultivar italiane, ma anche in relazione alle cultivar di Rocca

Imperiale del mese di novembre (Grafico 4.3).

Ciò a dimostrazione del fatto che, con la maturazione, oltre all'accrescimento dei tessuti, si ha anche un aumento della quantità di succo presente nella polpa. Conoscere il periodo di abbondanza del succo è un dato utile per il produttore che vuole indirizzare il prodotto ad una precisa nicchia di mercato.

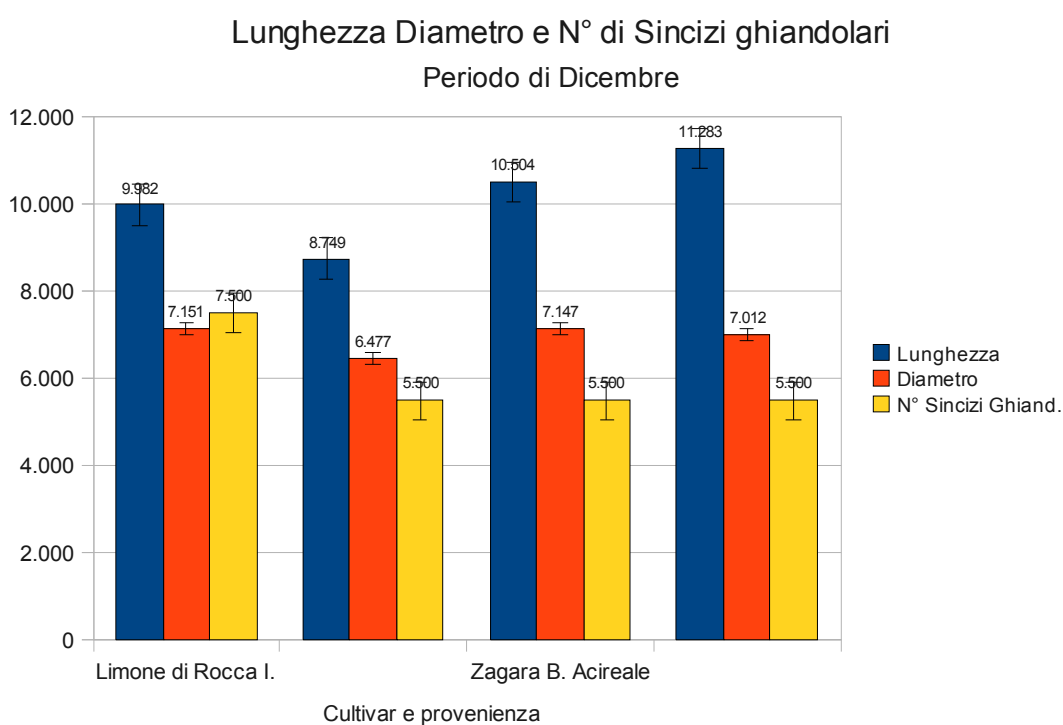


Grafico 4.8. Confronto tra la lunghezza e il diametro (in cm) ed il n° dei sincizi ghiandolari.

Da quest'ultimo grafico si evince che il Limone di Rocca Imperiale rappresenta il frutto migliore tra quelli analizzati e messi a confronto nel nostro lavoro di ricerca; infatti è evidente una netta superiorità dei caratteri fisici, morfologici, quantitativi e

qualitativi.

Questi dati sono stati relazionati a quelli delle analisi biochimiche in merito alla quantità percentuale di limonene, costituente fondamentale dell'olio essenziale di limone, prodotto dalle ghiandole oleifere che costituiscono i sincizi ghiandolari.

Visti gli ottimi risultati ottenuti dal Limone di Rocca Imperiale nel corso delle indagini svolte, è auspicabile un maggior approfondimento sugli stessi, per trarne nuovi spunti, al fine di perfezionare le metodologie analitiche e stimolare nei produttori la consapevolezza delle potenzialità del loro prodotto, individuando insieme con i loro e con i tecnici del Consorzio gli interventi più adeguati, mirati ad una sempre più alta qualità.

4.2 Risultati dell'analisi chimico-organlettica



Figura 4.1. Immagine di un Gascromatografo utilizzato per le analisi.

L'estrazione dei componenti volatili presenti nel campione di limone è stata effettuata utilizzando la tecnica dello spazio di testa dinamico. I composti volatili, adsorbiti sulla trappola, sono stati, quindi, separati, identificati e quantificati. La separazione ed identificazione è stata realizzata mediante tecnica di gascromatografia/spettrometria di massa.

La percentuale di ciascun componente esaminato nel flavedo di limone è riportata nelle tabelle (4.3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10), con riferimento ai tre differenti periodi di campionamento e luoghi di provenienza (Tab. 4.2):

<u>Novembre</u>	<u>Dicembre</u>	<u>Gennaio</u>
Rocca Imperiale	Rocca I. - Acireale	Rocca I., Acireale, Sorrento
Confrontato con i dati rinvenuti in letteratura per lo stesso periodo di fioritura	Il limone di Rocca I. è messo a confronto con le due varietà provenienti da Acireale	Confronto tra 4 le varietà prese in considerazione provenienti dalle tre aree

Tabella 4.2. Periodi e luoghi di provenienza dei frutti analizzati mediante Gas-cromatografia.

CAMPIONAMENTO DI NOVEMBRE

Limone di Rocca Imperiale

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	73,28	%	GAS-MASSA
β -pinene	10,92	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	9,81	%	GAS-MASSA

Tabella 4.3. Percentuali dei terpeni nel Limone di Rocca Imperiale.

CAMPIONAMENTO DI DICEMBRE

Limone di Rocca Imperiale

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	71,29	%	GAS-MASSA
β -pinene	10,33	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	9,41	%	GAS-MASSA

Tabella 4.4. Percentuali dei terpeni nel Limone di Rocca Imperiale.

Limone Scandurra Acireale

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	69,97	%	GAS-MASSA
β -pinene	10,54	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	9,92	%	GAS-MASSA

Tabella 4.5. Percentuali dei terpeni nel Limone Scandurra.

Limone Zagara Bianca Acireale

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	70,32	%	GAS-MASSA
β -pinene	10,27	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	9,74	%	GAS-MASSA

Tabella 4.6. Percentuali dei terpeni nel Limone Zagara Bianca.

CAMPIONAMENTO DI GENNAIO

Limone di Rocca Imperiale

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	72,56	%	GAS-MASSA
β -pinene	10,91	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	9,57	%	GAS-MASSA

Tabella 4.7. Percentuali dei terpeni nel Limone di Rocca Imperiale.

Limone Scandurra Acireale

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	69,12	%	GAS-MASSA
β -pinene	9,45	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	7,93	%	GAS-MASSA

Tabella 4.8. Percentuali dei terpeni nel Limone Scandurra.

Limone Zagara Bianca Acireale

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	69,38	%	GAS-MASSA
β -pinene	9,12	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	7,44	%	GAS-MASSA

Tabella 4.9. Percentuali dei terpeni nel Limone Zagara Bianca.

Limonene Sfusato Amalfitano Sorrento

Componente volatile	Valore analitico	Unità di misura	Tecnica utilizzata
Limonene	68,89	%	GAS-MASSA
β -pinene	9,08	%	GAS-MASSA
γ -terpinene	7,31	%	GAS-MASSA

Tabella 4.10. Percentuali dei terpeni nel Limone Sfusato.

I risultati ottenuti sono relativi ai tre componenti volatili più rappresentativi del flavedo di Citrus limon, Limonene, β -pinene e γ -terpinene.

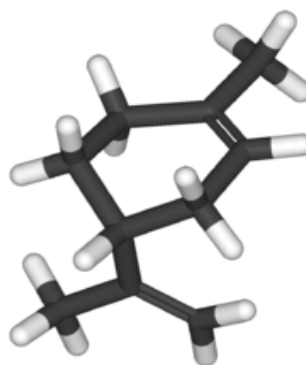


Figura 4.2. La rappresentazione 3D della molecola del limonene.

Il limonene (Fig. 4.2), al quale abbiamo rivolto maggiore attenzione, è un alchene, appartenente alla famiglia dei terpeni semplici, di formula bruta $C_{10}H_{16}$, con peso molecolare 136,24 Da. È una molecola chirale, pertanto si può presentare nelle forme enantiomere destrogira e levogira e nella forma racema detta dipentene. È un liquido che odora di limone (l'enantiomero S) o di arancia (l'enantiomero R), assai diffuso in natura in molti oli essenziali estratti da scorza di limone, da aghi di abete, da pigne, ecc.).

Nelle sue diverse forme e origini, il limonene è largamente utilizzato come aromatizzante nell'industria alimentare e farmaceutica. Come dipentene ha anche ottime proprietà solventi ed è usato a tale scopo nell'industria della gomma e delle vernici, data anche la sua bassa tossicità.

Da quanto appare nelle tabelle relative alle analisi chimiche condotte sull'epicarpo dei frutti di limone è evidente una persistente superiorità di contenuto in limonene, in quei campioni di limone provenienti da Rocca Imperiale, rispetto ai campioni provenienti sia dalla Campania che dalla Sicilia.

I valori percentuali, riportati in letteratura per questo componente, sono inferiori al 70%, valore che viene superato dal limone di Rocca Imperiale nei periodi di dicembre (71,29) e gennaio (72,56). Ancora più interessante, a nostro avviso, è il risultato che si riferisce al periodo di novembre, quando il limonene presente nei campioni di Rocca Imperiale ha raggiunto il picco del 73,28%, ciò a dimostrazione del fatto che le indagini scientifiche possono suggerire ai produttori i periodi migliori per la raccolta, in base alle qualità biochimico-organolettiche presenti nel frutto.

4.3 Risultati dell'indagine proteomica

4.3.1 L'ettroforesi monodimensionale

Sono stati sufficienti 4 grammi di tessuto fresco (in questo caso "flavedo" della varietà Femminello Comune di Rocca Imperiale) per ottenere in media 0,25-0,29

grammi di tessuto polverizzato per ogni estrazione effettuata, dal quale, dopo la fase estrattiva, si è arrivati ad avere da 2,0 a 2,7 mg di tessuto contenente prevalentemente la frazione proteica. È il risultato di ripetute modifiche al protocollo scelto come definitivo per la preparazione del campione citato nel capitolo precedente. Ha portato alla risoluzione di un buon numero di bande proteiche, indicando una migliore capacità estrattiva e l'assenza di proteolisi. Sono visibili circa 90 bande polipeptidiche sul gel monodimensionale, con un range di pesi molecolari compreso tra 10 e 200 kDa ben risolte e con un basso back-ground (Fig. 4.3). La banda prominente è di circa 30 kDa.

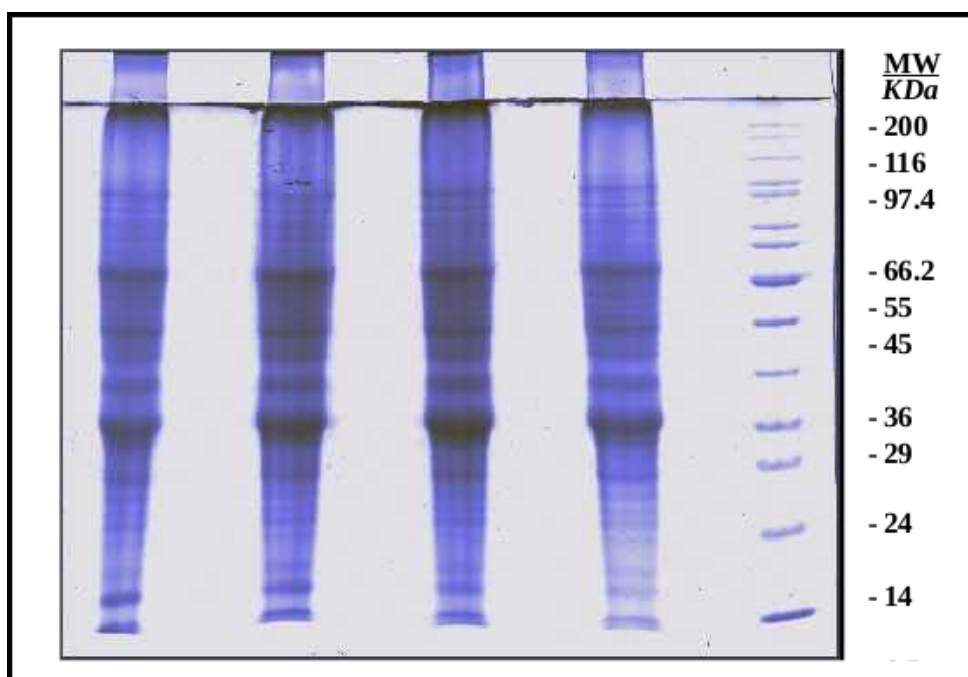


Figura 4.3. Gel di Poliacrilammide in una sola dimensione che permette la visualizzazione delle "bande" polipeptidiche a vari pesi molecolari (MW).

4.3.2 L'elettroforesi bidimensionale

L'analisi elettroforetica bidimensionale (2DE) effettuata, ha dato una buona risoluzione della miscela complessa di proteine. Tale tecnica separa le proteine in funzione di due variabili in due diversi step: la prima dimensione, isoelettrofocalizzazione (IEF), separa le proteine in base al loro punto isoelettrico; la seconda dimensione, SDS-PAGE, le separa in base al loro peso molecolare. Ogni spot risultante dal pattern bidimensionale corrisponde ad una singola o a più specie proteiche nel campione. Mediante questa tecnica è stato possibile riuscire a separare circa 200 differenti spot corrispondenti ad altrettante proteine, distribuite su un gel di poliacrilammide (Fig 4.4).

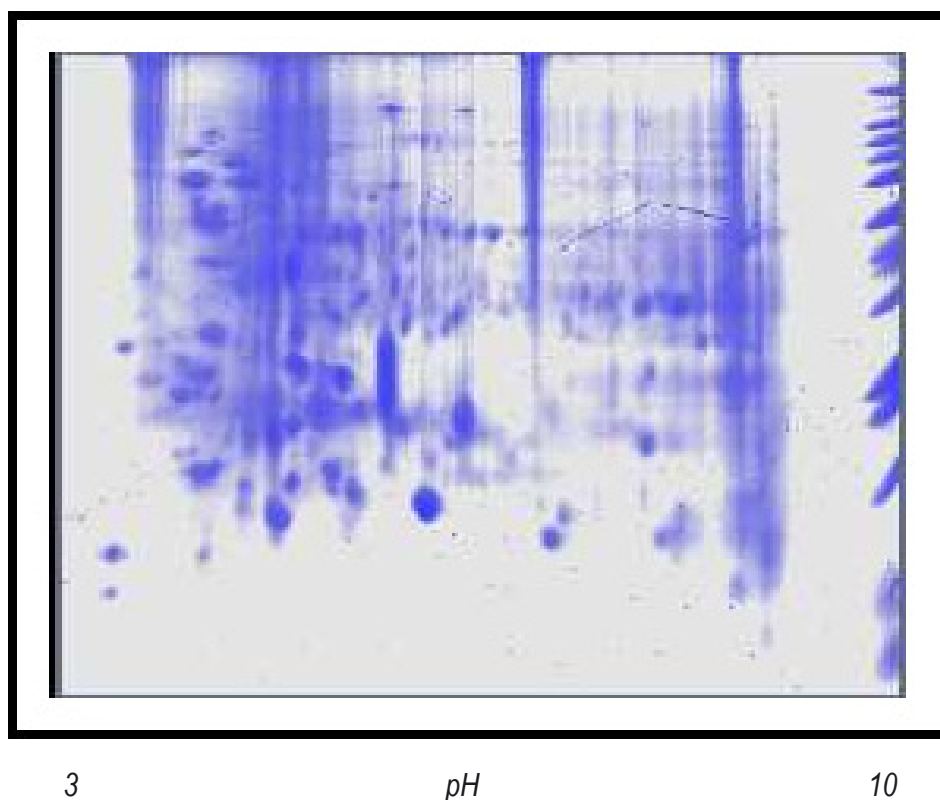


Figura 4.4. Gel bidimensionale di poliacrilammide con riferimento dei pesi molecolari e dell'orientamento del pH non lineare con intervallo 3-10.

Tale protocollo presenta, quindi, una buona risoluzione anche nella separazione elettroforetica bidimensionale. Il pattern proteico ottenuto utilizzando strip "Sigma" a pH 3-10 non lineare, mostra spot polipeptidici ben risolti a diversi punti isoelettrici (IE) e pesi molecolari (MW); gli spot principali sembrano essere individuati in tre gruppi: uno all'altezza di 16 kDa a pH 6; l'altro ad altezza di 25 kDa, con pH 5,5; il terzo all'altezza di 31 kDa con pH tra 6,5 e 7,5.

I risultati ottenuti indicano una efficiente rimozione dei composti interferenti nei tessuti analizzati (flavedo) di *Citrus limon*, procedendo, così ad una ulteriore verifica sull'attendibilità dell'esperimento e dei dati con esso ottenuti.

Sono state effettuate altre due estrazioni ottenendo due ulteriori pattern proteici, relativi allo stesso campione, mantenendo le medesime condizioni di esecuzione. Le 3 repliche dei gel 2-D ottenuti sono state messe a confronto tra loro avvalendosi del supporto di analisi d'immagine per gel elettroforetici, il software "PDQuest" (Bio-Rad).

Partendo dal campione fresco di flavedo di limone, attraverso l'uso delle metodologie finora descritte, sono stati realizzati dei gel elettroforetici bidimensionali (2-DE) che presentano una buona risoluzione in termini di separazione per peso molecolare e punto isoelettrico delle proteine estratte totali (fig 4.5).

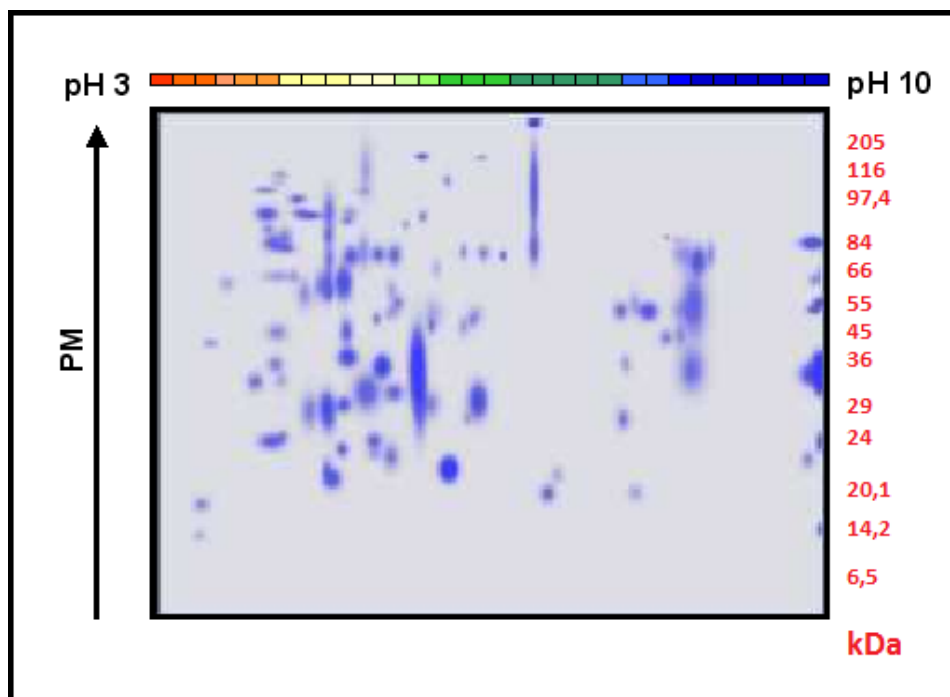


Figura 4.5. Immagine risultante dall'elaborazione dei gel 2-D col software PDQuest. Gel master ottenuto dalla sovrapposizione e fusione di tre gel derivanti dallo stesso campione

4.3.3 Analisi LC-MS e identificazione delle proteine

Dall'analisi in LC-MS di poco più di 60 spot selezionati ed isolati dai restanti 200 circa, si è riusciti ad identificare 60 proteine differenti delle quali la maggior parte presente nei databases come appartenente al genere *Citrus* (Allegato 5).

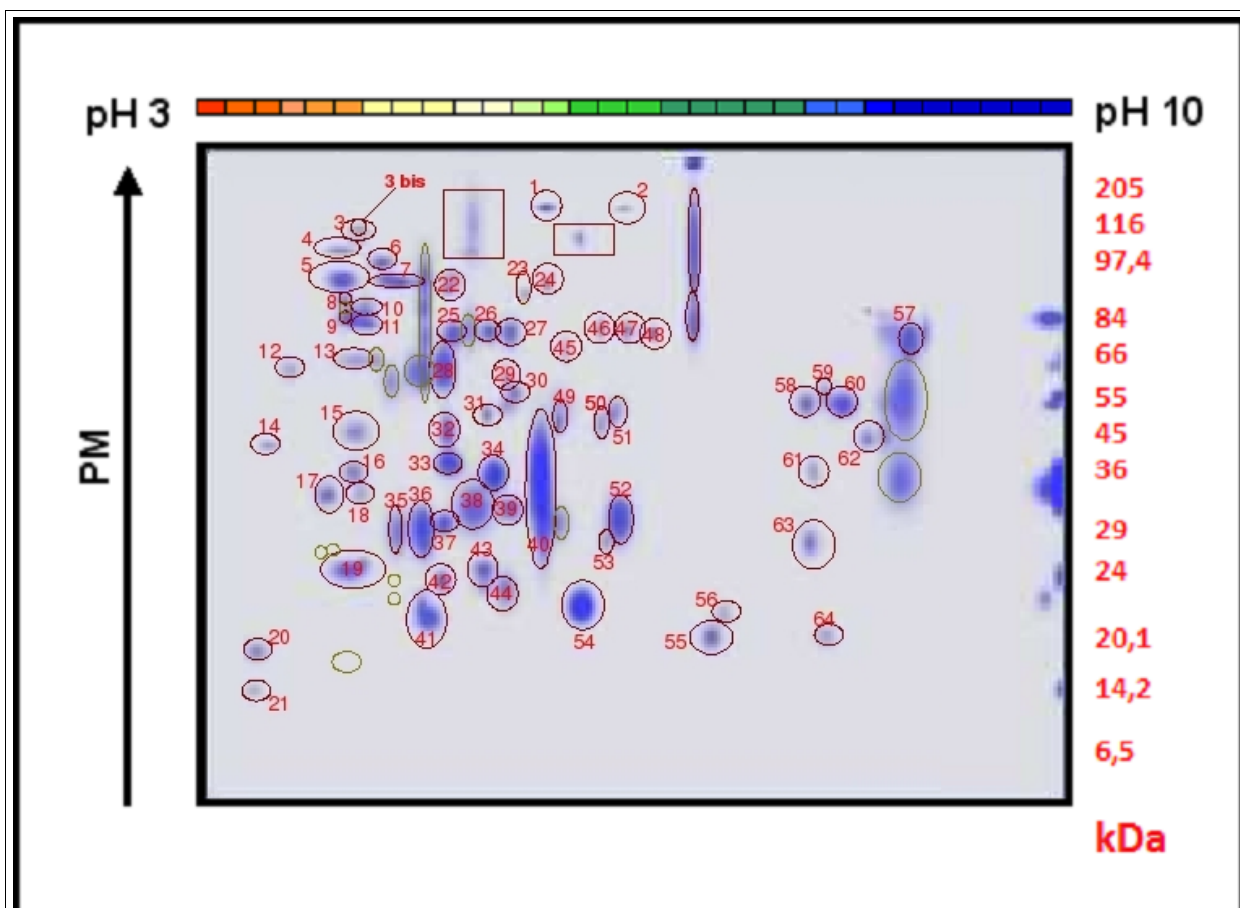


Figura 4.6. Gel master che mostra gli spot presenti in almeno tre gel indipendenti e selezionati per l'analisi in spettrometria di massa. IE=Punto isoelettrico; MW=Peso molecolare

Ciò ha consentito di ottenere una mappa degli spot proteici visualizzati e di definire la loro presenza/assenza o variazione di intensità nella sequenza dei tre gel, di cui uno ne costituisce il sistema di riferimento. Il software ha dato, così, origine ad un gel finale detto "Master" (Fig. 4.6), che contiene gli spot rilevati in tutti e tre i gel. Abbiamo ottenuto in questo modo mappe 2-DE in cui alcuni spot rappresentano il 15% delle proteine estratte, altri sette spot hanno un valore di NV fino a 3,5% (Graf. 4.9, spot altamente espressi). Gli spot rimanenti possono essere distinti tra mediamente espressi (fino a 1,5% NV), debolmente

espressi (fino a 0,5% NV) e altri molto poco espressi (inferiori allo 0,5% NV), (Graf.4.9).

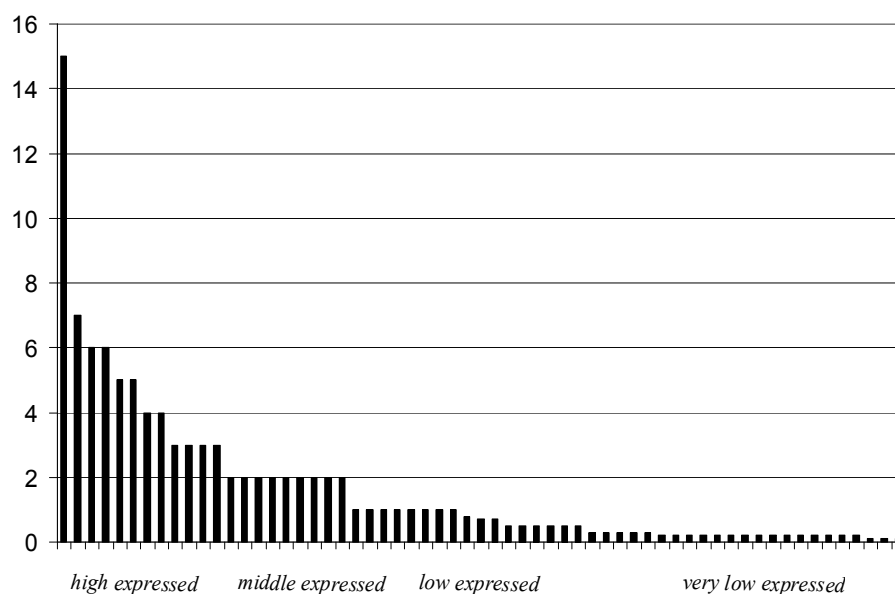


Grafico 4.9. Normal Volume (NV) degli spot il cui livello di espressione è comune in tutti e tre i gel ottenuti in replica. In alcuni spot sono state identificate più proteine insieme.

64 spot selezionati sono stati excissi dal gel, digeriti con tripsina a 37°C tutta la notte e i digeriti triptici ottenuti sono stati analizzati con la tecnica di spettrometria di massa (LC-MS).

Gli spettri, ottenuti da ciascuno spot, sono stati analizzati con il software GPM (www.thegpm.org) (pagina di ricerca on-line in fig.4.7). Nella figura 4.8 è riportato uno spettro come esempio.

the gpm

GPM Tornado, simple search form

- spectra**
common, mzXML, mzData, DTA, PKL or MGF only
/media/4A2D-7416/Analisi MALDI Lisboa/Vittorio_Anali Browse...
- taxon**
Select one or more.
 Eukaryotes Prokaryotes Viruses

none
A. thaliana (genome)
Arabidopsis thaliana
Brassica napus
Citrus sinensis
Gossypium hirsutum
Gossypium raimondii
Glycine max

none
Acaryochloris marina MBIC11017
Acholeplasma laidlawii PG 8A
Acidiphilium cryptum JF-5
Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270
Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 53993
Acidobacteria bacterium Ellin345
Acidothermus cellulolyticus 11B

1. Include reversed sequences: | none | mixed | only |
 2. all ^{15}N amino acids
 Find proteins with peptide log(e) < -1 and protein log(e) < -1

- measurement errors**
1. Fragment mass error: 100 ppm
- residue modifications**
1. Complete modifications (unimod)

Set 1
Carbamidomethyl (C)
57.021464@C specify your own more sets ...
own

Set 2
No further mods

2. Potential modifications (unimod)

none
Oxidation (M) specify your own 15.994915@M
Oxidation (W)
Deamidation (N)

3. Use sequence annotations yes no

Eukaryote proteomes 1 2 3 4 5 6 7
 Boutique proteomes human mouse frog cow bacteria plant fish rat
 Algorithms XI P3 | XI Hunter
 Information gpmDB wiki review




Figura 4.7. Pagina di ricerca del software on-line www.thegpm.org.

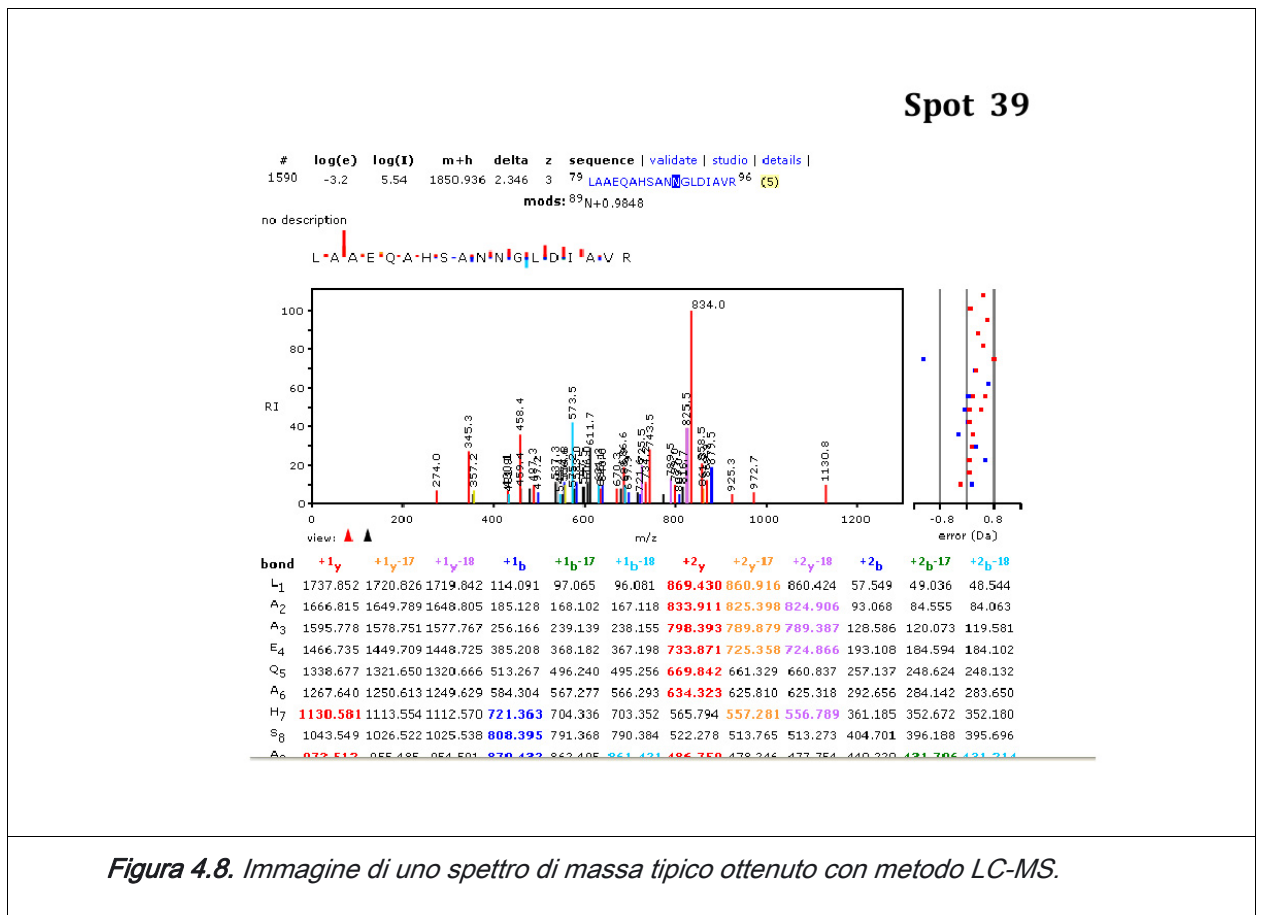


Figura 4.8. Immagine di uno spettro di massa tipico ottenuto con metodo LC-MS.

Il software genera per ciascuno spot un elenco di probabili peptidi. A ciascun peptide viene assegnato, dal software, uno score statistico di probabilità basato sull'affidabilità delle perdite di massa di ciascun amminoacido tenendo conto anche della lunghezza totale del peptide stesso. Più lo score (espresso in scala logaritmica) è basso, maggiore è l'affidabilità del peptide.

I peptidi identificati dal software sono stati analizzati singolarmente e selezionati in base all'affidabilità del loro spettro di massa. Lo spot N.15, attribuito alla *beta-1,3-glucanase*, (Sela-Buurlage *et al.*, 1993) è l'unico che è stato identificato direttamente dal software GPM, mentre in alcuni spot è stata identificata più di una proteina. Gli altri spot ritenuti affidabili sono stati poi analizzati con il software BLAST per identificare, per similarità, la proteina di interesse.

Per migliorare il metodo di identificazione degli spot che non hanno prodotto nessun peptide significativo è prassi effettuare un'analisi DE NOVO, metodo di sequenziamento che consente di costruire da zero sequenze peptiche che non siano incluse in alcun database. Tale metodo è stato applicato a 10 spot che non hanno dato nessuna identità significativa con i software precedenti. Nell'allegato 3 sono riportate le proteine identificate mediante GPM, BLAST e DE NOVO, raggruppate secondo la loro funzionalità e il metabolismo in cui esse operano.

È stata trovata corrispondenza con alcune vie biosintetiche che coinvolgono le proteine identificate ed enzimi. In particolare, molte proteine sono coinvolte nel metabolismo primario, come fotofosforilazione e fosforilazione ossidativa, mentre le

altre appartengono allo stress ossidativo e al metabolismo secondario). Lo spot maggiormente espresso corrisponde ad enzimi coinvolti nella disintossicazione e nel metabolismo antiossidante. Alcune proteine sono state classificate come "sweet orange proteins", le cui funzioni in pianta sono ancora sconosciute.

Nel grafico 4.10 sono riportate le percentuali di ciascuna categorie proteica funzionale; come si può osservare la categoria più rappresentata è quella della "sweet citrus proteins" (30%), mentre le proteine associate allo stress e ai meccanismi di difesa rappresentano 23%. Il 10% è rappresentato da enzimi attivi nel metabolismo secondario mitocondriale e il 18% si divide equamente fra metabolismo per la detossificazione e degli zuccheri semplici. Il restante 19% delle proteine con specificità sconosciuta potrebbe rappresentare una o più metabolismi tipicamente associabili al tessuto del flavedo di limone.

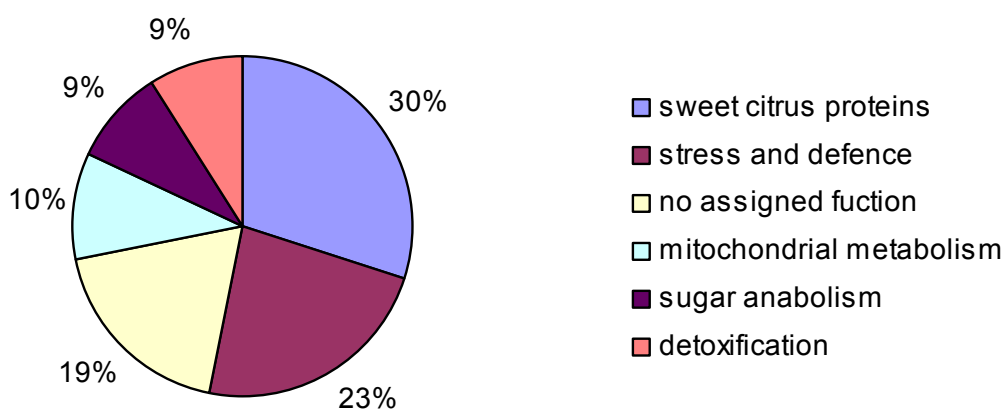


Grafico 4.10. Diagramma che rappresenta la suddivisione delle funzioni delle proteine identificate all'interno del frutto col metodo TCA/AC. I valori sono espressi in percentuale.

Inoltre, dall'analisi GPM degli spots è emerso che i seguenti tre peptidi,

(1) *AEDFFFSGLGKPGNTANR**

(2) *LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR#*

(3) *TNAAAYSALNSQFPG EVTIADTVFGANPSINPDFLGK§*

che non danno alcuna attribuzione sicura con il BLAST, sono stati ritrovati in diciassette spots con range di PM tra 20 kDa e 120 kDa e un corrispondente range di estrema variabilità del punto isoelettrico fra 5.0 e 9.5 (Tab.4.11). Questo dato non usuale ha posto come prima ipotesi la presenza di un “contaminante aspecifico” nella filiera di preparazione ed analisi del campione proteico. Dal confronto dei dati con quelli presenti in letteratura riguardo alla proteomica del genere Citrus, è emerso che tali peptidi sono stati riscontrati identici a quelli ottenuti mediante digestione triptica e riportati per la germin-like protein di Citrus sinensis (Pörtl *et al.*, 2007). I peptidi corrispondono a sequenze codificanti del Open Reading Frame (ORF) della proteina dedotta dal cDNA dell'arancia. Nel dettaglio il peptide 1 corrisponde al frammento T8 del ORF, mentre il peptide 2 coincide totalmente con il frammento T10; infine il peptide 3 corrisponde al frammento più lungo T11 (Fig.4.9). Complessivamente i tre frammenti rappresentano il 36% dell'intera sequenza codificante.

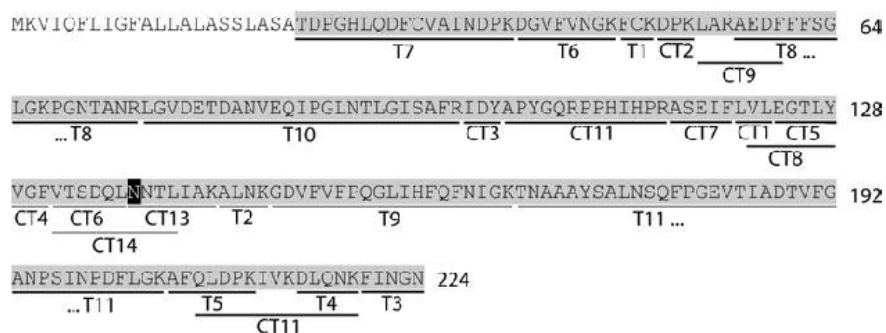


Figura 4.9. Ricostruzione della sequenza putativa della germin-like protein Cit s1. Pörtl '07

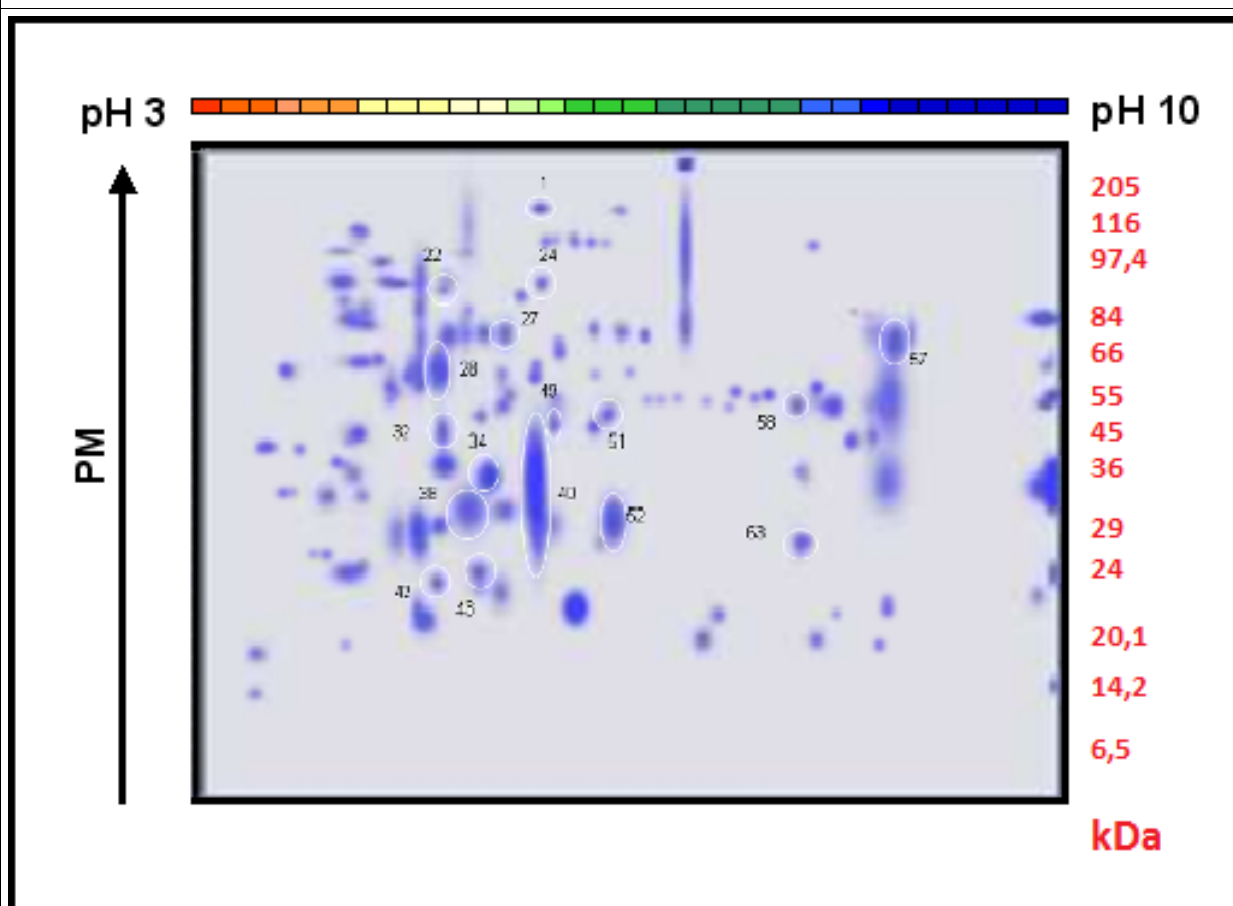


Figura 4.10. Localizzazione sul gel dei peptidi attribuibili alla germin-like protein Cit s1.

Nella Tabella 4.11 sono riportate le sequenze peptidiche della glicoproteina Cit s1 individuati nei 60 spots del gel 2-DE. Insieme al numero di ogni spot vengono riportati i pesi molecolari (PM) e i punti isoelettrici (pI).

TABELLA 4.11.

<i>Spot num.</i>	<i>PM</i>	<i>pI</i>	<i>Sequenze peptidiche identificate</i>
42	20.0	5.0	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR
28	43.5	5.1	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR
32	33.5	5.1	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR AEDFFFSGLGKPGNTANR
22	66	5.2	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR AEDFFFSGLGKPGNTANR
38	26	5.3	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK
43	22	5.4	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR
34	29.5	5.5	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK
27	53.5	5.8	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR
1	120	6.0	AEDFFFSGLGKPGNTANR LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR
40	28	6.0	AEDFFFSGLGKPGNTANR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK
24	65	6.0	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR
49	34	6.2	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK
51	35	6.8	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR
52	25	6.8	AEDFFFSGLGKPGNTANR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK
58	36	8.5	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK
63	23	8.6	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK
57	50	9.5	LGVDETDANVEQIPGLNTLGISAFR TNAAAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDFLGK

4.3.4 Estrazione delle proteine con ultrasuoni

L'utilizzo degli ultrasuoni ha consentito di velocizzare i tempi di esecuzione e di aumentare notevolmente la qualità degli estratti proteici ottenuti, in termini di resa e separazione sul gel 2D, rispetto al protocollo TCA/AC (Allegato 3). Infatti, l'energia sprigionata in un minuto dal sonoreattore ha avuto un positivo effetto in tutte le fasi del protocollo in cui questa tecnica è stata applicata, in confronto alla analoghe fasi del protocollo TCA/AC. Ne è un esempio l'efficienza estrattiva della sonicazione come metodo di estrazione/solubilizzazione del campione proteico nel buffer del campione 1D riportato nel grafico 4.11; è evidente come aumentando il tempo di sonicazione, aumenti la quantità di proteina solubilizzata che determina un aumento dell'Abs a 280 nm. Dal tempo zero a 20 secondi la velocità di incremento del valore di ABS è maggiore, mentre diminuisce dai 20 ai 40 sec., fino a raggiungere lo stato stazionario (saturazione) 60 sec. Ciò conferma il dato che, nelle nostre condizioni sperimentali, il massimo effetto del trattamento ultrasonico si ottiene ad una durata temporale non superiore al minuto, che coniuga la massima efficienza con il minimo danno per le strutture organiche arrecato dall'aumento della temperatura interna al campione. Nella Figura 4.12 sono riportate le corse elettroforetiche dei campioni ottenuti con il metodo TCA/AC e il metodo US; la qualità della separazione elettroforetica, in termini di risoluzione delle bande polipeptidiche, il loro numero e l'assenza di streaking verticali sono senza dubbio maggiori nei campioni ottenuti con il protocollo US rispetto a quelli ottenuti con protocollo TCA/AC. Alla luce di questi

risultati si è scelto come tempo ideale per il trattamento ultrasonico del campione di limone la durata di 60 sec, applicata ai campioni da processare per l'analisi bidimensionale.

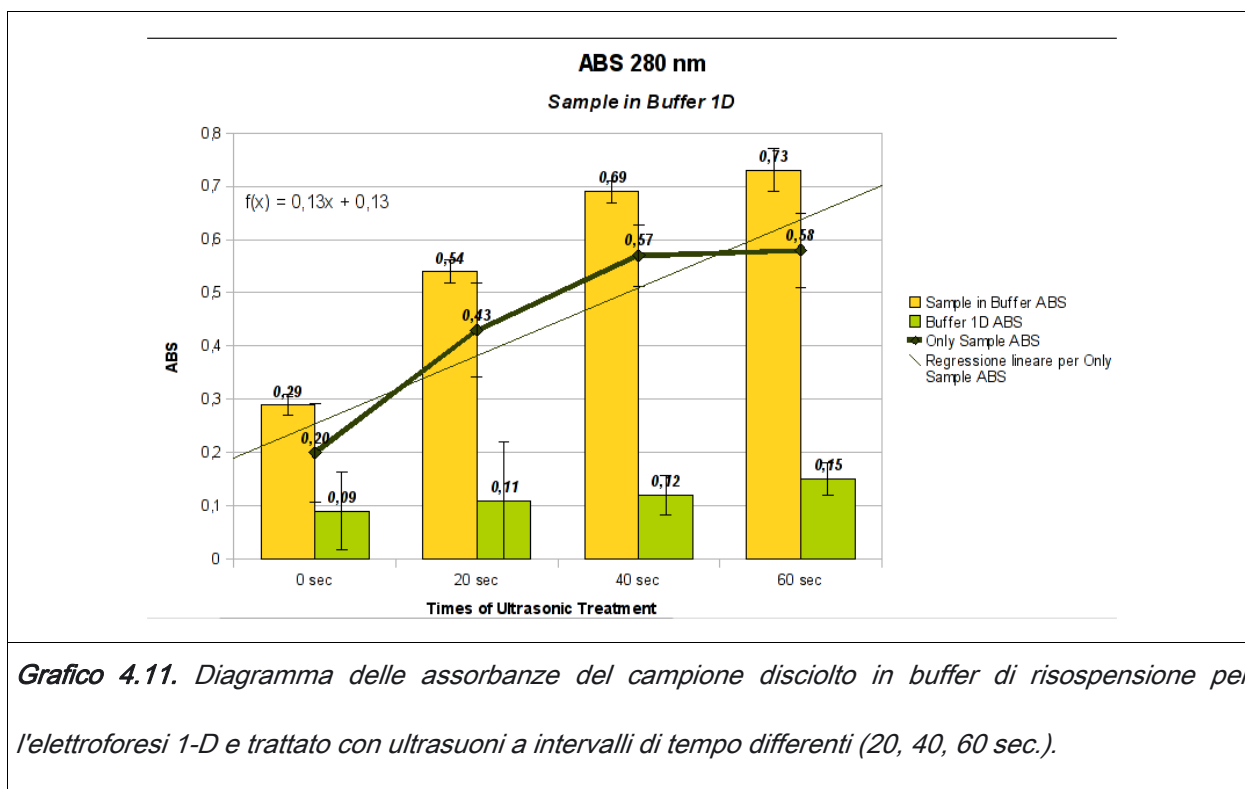


Grafico 4.11. Diagramma delle assorbanze del campione disciolto in buffer di risospensione per l'elettroforesi 1-D e trattato con ultrasuoni a intervalli di tempo differenti (20, 40, 60 sec.).

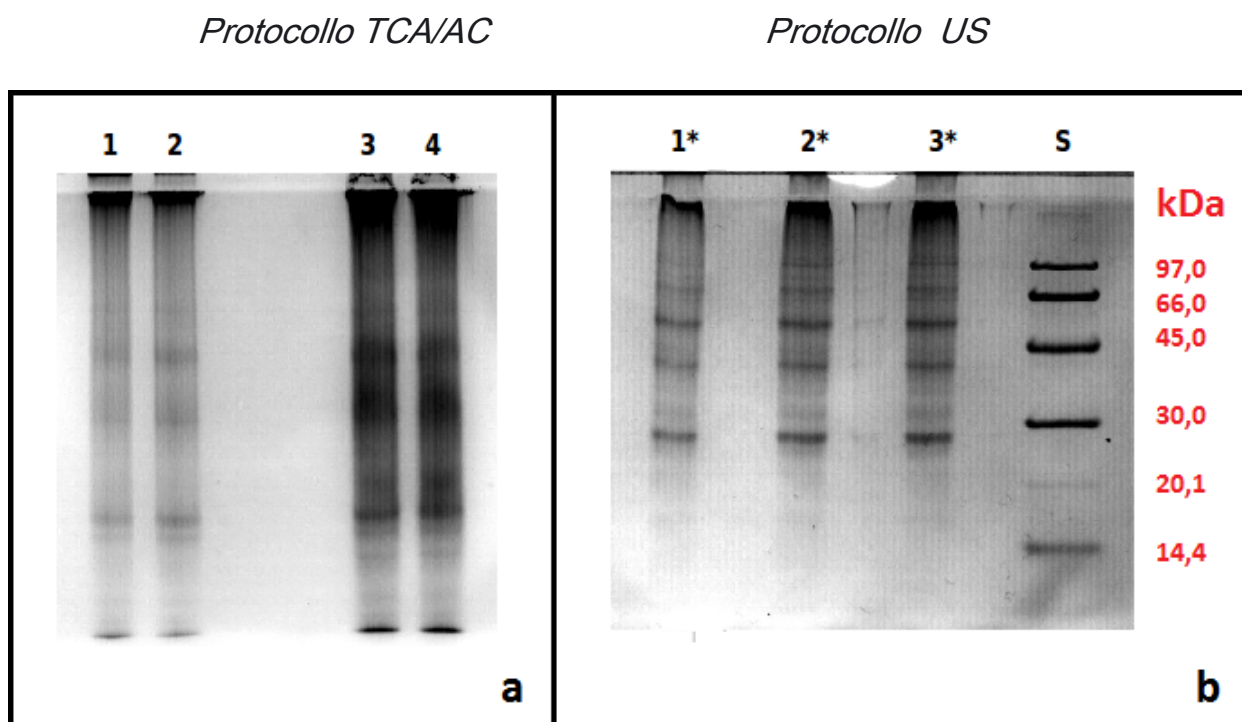


Figura 4.11. Confronto tra due gel 1-DE ottenuti seguendo due protocolli differenti. Il gel A è stato ottenuto senza trattamento ad ultrasuoni, mentre il gel B è stato ottenuto sostituendo al mix un minuto di ultrasuoni. Modalità di caricamento nelle Lanes: (1A, 2A, 1*B, 2*B, 3*B = campione in buffer 1:1, tot = 10 μ l; (3A, 4A = solo campione, tot = 10 μ l); (S = Standard, tot = 10 μ l).

Riassumendo, nella tabella 4.12 sono riportate le fasi principali di confronto fra il protocollo TCA/AC e il protocollo US. Le fasi in cui la sonicazione migliora notevolmente il protocollo sono due: la fase di disidratazione sostituita dalla sonicazione che aumenta la capacità estrattiva; l'aumento della solubilità delle proteine nel buffer che migliora la qualità delle proteine e la loro separazione su gel 1D e 2D.

Un dato da non sottovalutare è la significativa diminuzione del tempo di esecuzione che dalle 21 h necessarie al protocollo TCA/AC, è ridotto a 4.2 ore del

protocollo US. Trattandosi di pratiche routinarie, questo rappresenta un indubbio vantaggio.

TAVOLA RIASSUNTIVA DEI TEMPI DI ESECUZIONE DEI PROTOCOLLI			
Protocollo TCA/AC	Tempo	Protocollo US	Tempo
Polverizzazione, Precipitazione e Lavaggi	3 h	Polverizzazione, Precipitazione e Lavaggi	3 h
Disidratazione del Powder Tissue	4 h	Trattamento ultrasonico ad ogni step	1 min
Estrazione con Fenolo	1 h	Estrazione con Fenolo	1h
Disidratazione del pellet finale	1h	US del Pellet in Buffer del Campione	1 min
Incubazione in Buffer del Campione	ON	Tempo da poter utilizzare per altre analisi	16,58 h
Tempo Totale	21 h	Tempo Totale	4,02 h

Tabella 4.12. Schema delle fasi di realizzazione dei due protocolli (TCA/AC e US). Si noti come è alta la differenza tra la durata del primo rispetto alla durata del secondo. I passaggi in cui si riesce a recuperare tempo sono, il secondo (Disidratazione del Powder Tissue per 4 h) che nel protocollo US viene semplicemente sostituito con un minuto di trattamento ultrasonico e, ancora più consistente, l'ultimo step (Incubazione in Buffer del Campione ON), che nel protocollo US diventa tempo utile per altre analisi.

Applicando il protocollo US al campione per l'elettroforesi bidimensionale è stata valutata anche in questo caso l'assorbanza (ABS) analogamente a quanto effettuato per la valutazione dell'effetto della sonicazione sulla solubilizzazione nel buffer 1D.

Anche in questo caso si osservano i risultati analoghi con un aumento progressivo della solubilizzazione delle proteine con un limite di saturazione a 60 sec.

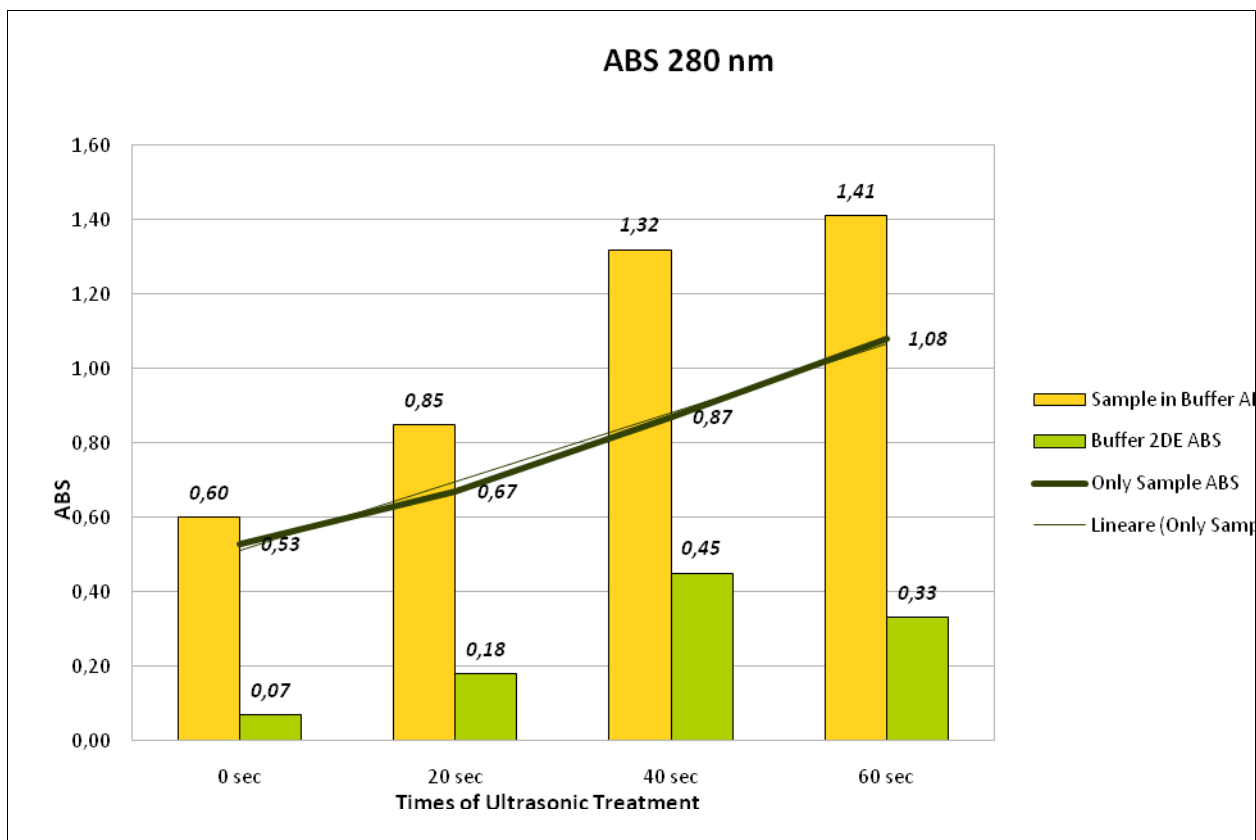


Grafico 4.12. Diagramma delle assorbanze del campione disciolto in buffer di risospensione per l'elettroforesi 2-D e trattato con ultrasuoni a intervalli di tempo differenti (20, 40, 60 sec.).

4.3.5 Confronto tra mappe 2D ottenute con protocolli TCA/AC e US

Nella figura 4.12a sono riportate le mappe polipeptidiche di tre repliche indipendenti ottenute con i campioni proteici estratti con il protocollo TCA/AC da flavedo di limone proveniente da colture convenzionali. In tutti e tre i casi, la popolazione di spot e le loro relative intensità sono significativamente ($P < 0.001$) paragonabili, consentendo di affermare la riproducibilità e affidabilità del metodo. Analogamente, nella figura 4.12b sono riportate le mappe polipeptidiche di repliche indipendenti ottenute con il protocollo US da campioni di limone convenzionale,

anche in questo con una riproducibilità delle classi polipeptidiche e delle loro relative intensità statisticamente significativa. Il confronto fra le mappe proteiche ottenute dai campioni estratti con i due protocolli, ha evidenziato che l'applicazione del protocollo US ha notevolmente migliorato la qualità delle mappe polipeptidiche ottenute, che appaiono più discriminate nelle loro varie componenti, con un aumento del numero di spot e una loro migliore risoluzione. Inoltre, si evidenziano spot proteici anche nelle regioni generalmente "buie" di un gel caratterizzate da pH estremamente acidi (zona anodica) e da pH molto alcalini (zona catodica).

Gel 2D Limone convenzionale

Protocollo TCA/AC

Protocollo US

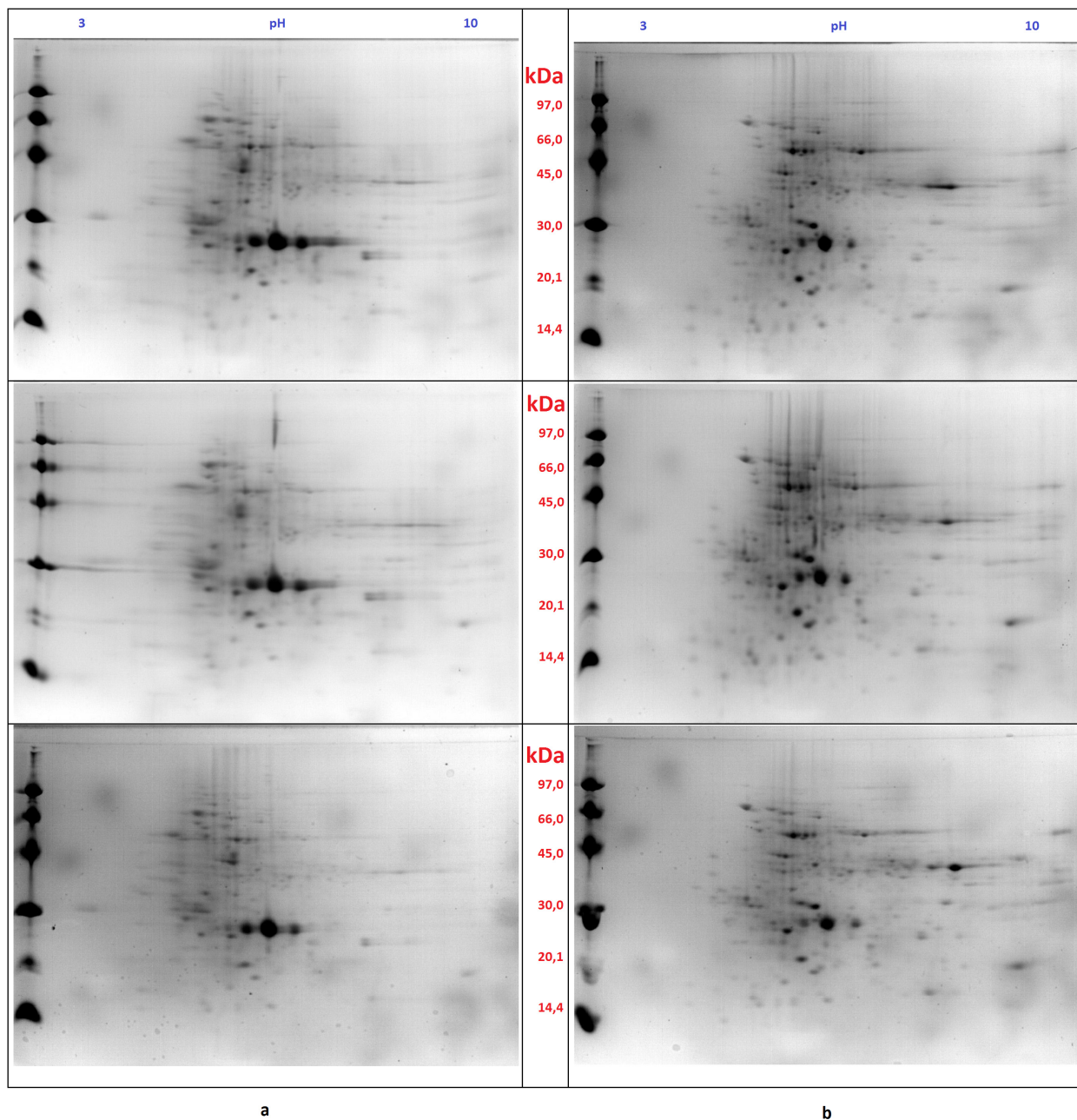


Figura 4.12. Sei repliche di gel 2D ottenuti da limoni convenzionali, con i due differenti protocolli, rispettivamente tre con protocollo TCA/AC (a) e tre con protocollo US (b).

Nella Figura 4.13 sono confrontate le mappe polipeptidiche ottenute con il protocollo TCA/AC e il protocollo US. Con il protocollo TCA/AC (Fig. 4.13a) sono stati ottenuti circa 150 spot, maggiormente localizzati nella regione di pI tra 4.0 e 8.0 unità di pH. I pesi molecolari variano fra 14 e 70 kDa. Sono debolmente rilevabili gruppi di spot nella regione acida a pI 3.5 e alcalina 9.0. Il 15% del totale delle proteine su gel corrispondono a tre grandi spot di identico peso molecolare di ~ 25 kDa, ma con tre diversi pI tra 6-8,5. Nella figura 4.13b è riportata la mappa polipeptidica ottenuta da proteine estratte con il protocollo US; come si può notare il numero di spot è aumentato rispetto alla mappa precedente e gli spot a pH alcalini appaiono più intensi e numerosi. Nella regione a pI intermedi, molte classi proteiche appaiono più intense e se ne rilevano altre non presenti nella mappa ottenuta con il protocollo TCA/AC; viceversa i tre maggiori spot polipeptidici risultano meno intensi nella mappa ottenuta con protocollo US rispetto a quella relativa al protocollo TCA/AC.

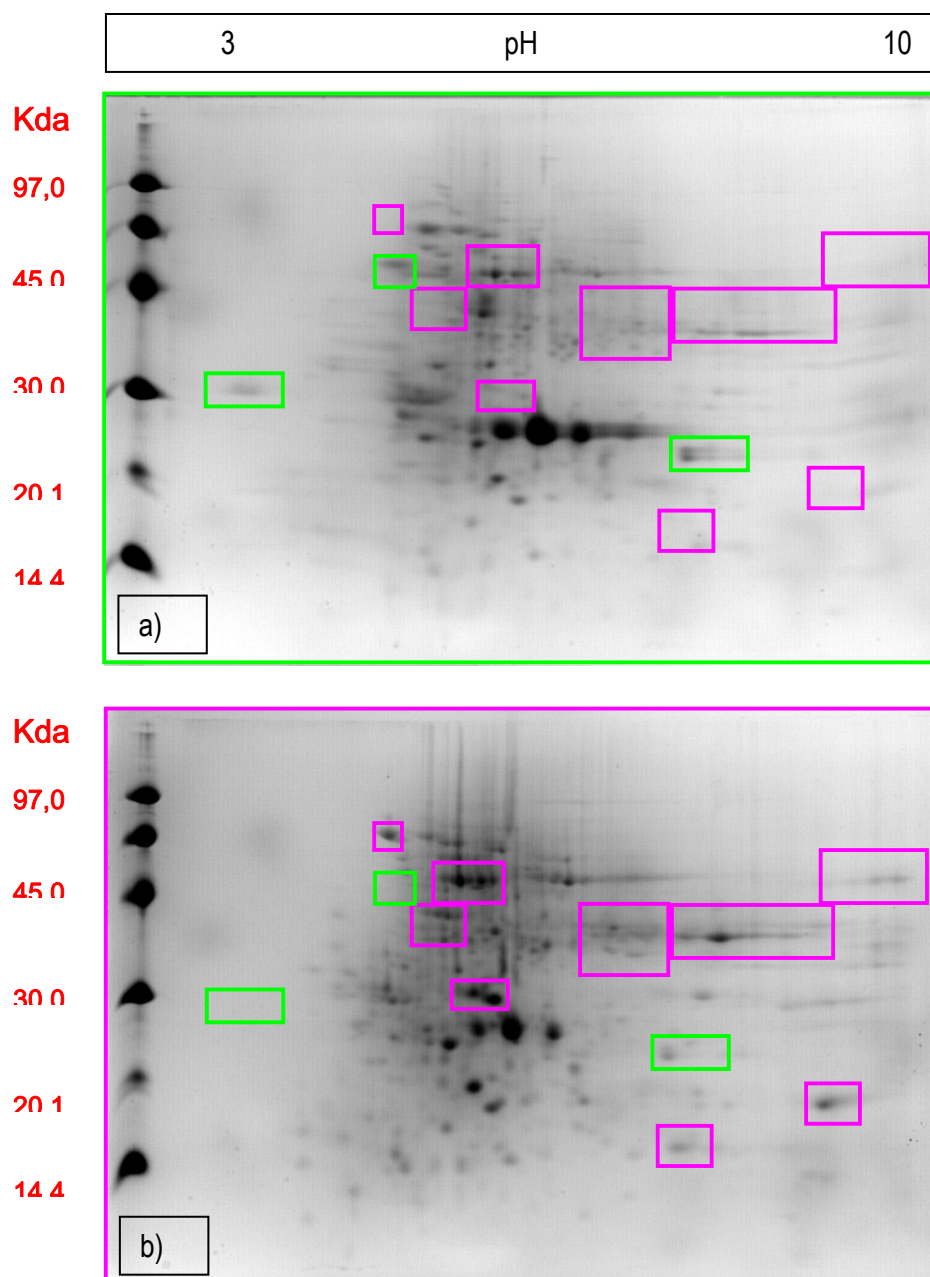
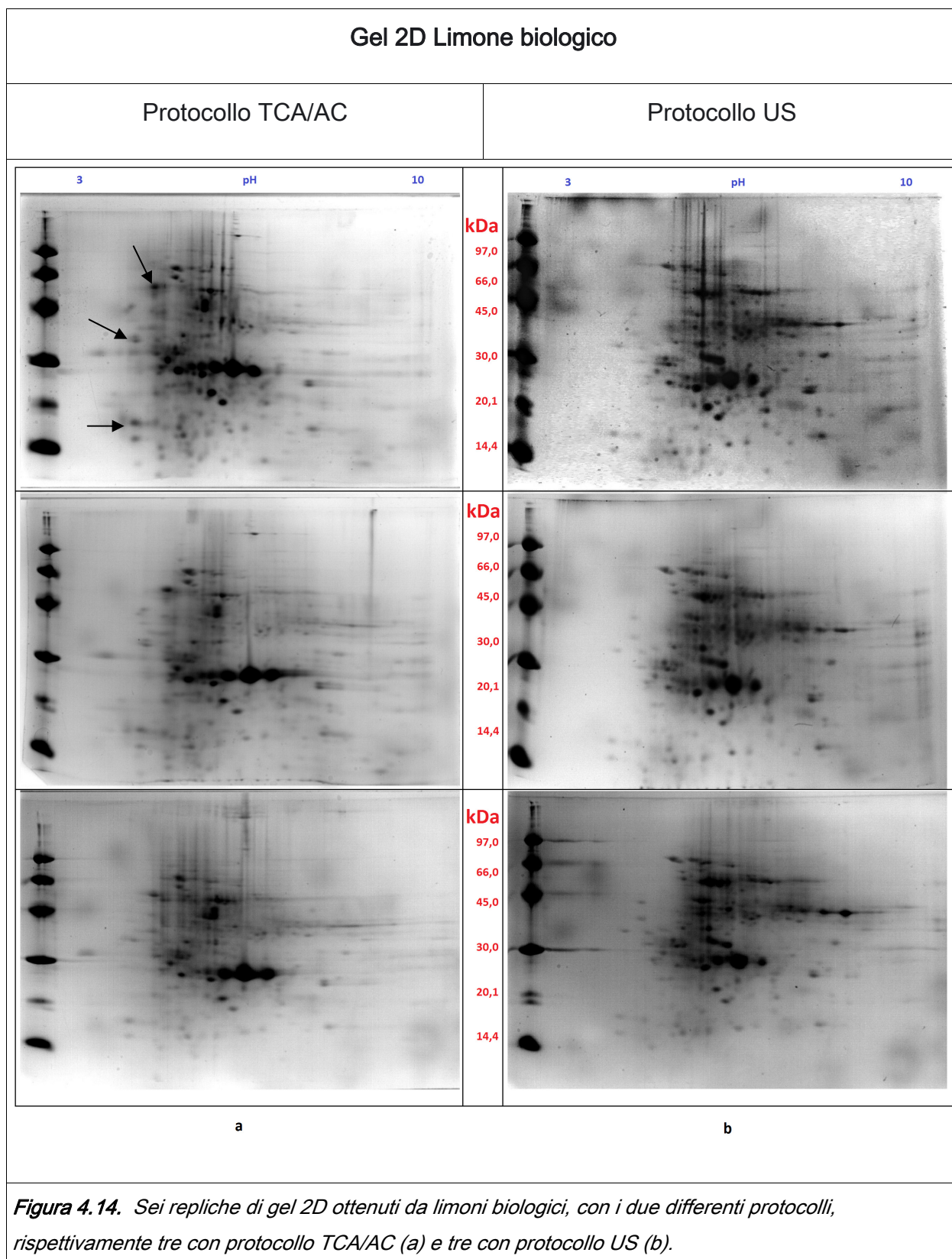


Figura 4.13. Confronto delle mappe polipeptidiche ottenute con il protocollo TCA/AC (a) e il protocollo US (b). Nei riquadri verdi sono raggruppati gli spot meglio rappresentati nel protocollo TC/AC rispetto al protocollo US; nei riquadri rossi sono raggruppati gli spot meglio rappresentati nel protocollo US.



Nella figura 4.14 sono riportate le mappe polipeptidiche di tre repliche ottenute con campioni proteici estratti con metodi TCA/AC e US, da flavedo di limone proveniente dalle colture biologiche. Le mappe hanno un significativo grado di riproducibilità, valutata precedentemente per lo stesso metodo, e presentano più di 200 spot compresi nel range di 3.5 e 9.0 unità di pH. Essi si distribuiscono in valori di PM fra 10 e 90 kDa. Sei spot di identico peso molecolare di 25 kDa ma di diverso pI compreso fra 6-8 unità di pH, rappresentano poco più del 20% del totale delle proteine su gel. Dal confronto fra le mappe polipeptidiche del flavedo di limoni convenzionali (Fig 4.12a) e quelli biologici ottenute entrambe mediante il protocollo TCA/AC, appare evidente la presenza di classi polipeptidiche caratteristiche del flavedo dei limoni biologici (Fig 4.14a, vedi frecce); inoltre in questi ultimi aumentano significativamente ($P < 0,05$) le intensità di spot che sono presenti in entrambi i campioni.

Nella figura 4.14b sono riportate le mappe polipeptidiche di tre repliche indipendenti ottenute con protocollo US da flavedo di limone proveniente da agricoltura biologica. Anche in questo caso la riproducibilità delle mappe è significativa. L'applicazione degli ultrasuoni migliora anche qui la qualità degli estratti che appaiono caratterizzati da un maggior numero di spot e meglio definiti, rispetto agli estratti ottenuti con protocollo TCA/AC per i limoni biologici riportati in Fig 4.14a e per i limoni convenzionali riportati in Fig. 4.12, ottenuti con entrambi i protocolli.

4.3.6 Analisi MALDI-TOF e identificazione delle proteine differenzialmente estratte con i due protocolli estrattivi TCA/AC e US

Gli spot differenzialmente estratti nei gel ottenuti con i due metodi TCA/AC e US, sono stati selezionati ed analizzati in MALDI-TOF, presso il dipartimento di chimica dell'Università Nova di Lisbona e, attraverso il programma on-line MASCOT, sono state effettuate le assegnazioni per similarità delle sequenze peptidiche, nei database SwissProt, NCBI e MSDB.

I risultati sono raggruppati di seguito nelle tabelle e riguardano le proteine identificate per i limoni biologici (4.13 e 4.14) e convenzionali (4.15 e 4.16). Per effettuare queste analisi sono stati selezionati ed excisi soltanto gli spot presenti in un solo gel ed assenti negli altri, in modo da ottenere informazioni utili sulla efficacia dei protocolli. Un maggior numero di spot individuati su un gel può dipendere sia dal metodo estrattivo, sia dal campione, che nel nostro caso è diverso nel metodo di coltivazione.

Elenco delle proteine analizzate con MALDI-TOF e identificate con MASCOT

Proteine ottenute da limone biologico con protocollo estrattivo TCA/AC						
Spot	Score	M.W.	p.I.	Database Num.	Specie	Protein
24	67	52.3	5.85	CAA09001	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CRE010110 NID
40	76	80.9	5.55	gi 34452231	<i>Pisum sativum</i>	mini-chromosome maintenance 7
41	72	61.7	9.38	gi 19920135	<i>Oryza sativa</i>	Putative retroelement
44	78	51.4	10.41	gi 20270854	<i>Schizocodon soldanelloides</i>	maturase
45	67	14.5	9.07	Q2XSE5_GLYTO	<i>Glycine tomentella</i>	Seed maturation protein
51	72	110.9	9.04	gi 50511382	<i>Oryza sativa</i>	putative polyprotein
57	69	48.3	5.41	Q8H135_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hypothetical protein At5g08670 (Fragment)
58	72	45.3	5.26	Q5N7P8_ORYSA	<i>Oryza sativa</i>	Putative ATP synthase beta subunit
60	71	71.4	9.21	gi 119358834	<i>Ostreococcus tauri</i>	Abc1 Yeast ABC1-like protein (IC)
62	66	46.5	8.80	S41596	<i>Arabidopsis thaliana</i>	protein kinase ASK-alpha (EC 2.7.1.-) [similarity]

Tabella 4.13. Proteine identificate dal flavedo di limone biologico estratte con protocollo TCA/AC.

Proteine ottenute da limone biologico con protocollo estrattivo US						
Spot	Score	M.W.	p.I.	Database Num.	Specie	Protein
10	60	29.3	7.23	HIS7A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
11	72	97.8	5.42	gi 116059765	<i>Ostreococcus tauri</i>	Gamma-tubulin complex
17	57	40.2	9.98	RPOC2_PSEAK	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
22	58	47.5	9.05	FB228_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	F-box protein At4g10400
23	73	53.4	5.90	gi 224128231	<i>Populus trichocarpa</i>	predicted protein
27	79	26.5	8.47	gi 220061235	<i>Pogostemon cablin</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
28	95	48.5	6.23	O03059_9MAGN	<i>Peltoboykinia tellimoides</i>	Ribulose bisphosphate carboxylase large subunit (Fragment)
29	81	29.8	9.85	gi 125599895	<i>Oryza sativa</i>	hypothetical protein OsJ_23900
30	80	59.6	6.13	gi 186521400	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATP binding / hydrogen ion transporting ATP synthase, rotational mechanism
31	59	59.1	6.01	ATPBM_MAIZE	<i>Zea mays</i>	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
32	84	35.2	8.68	gi 18312373	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit
36	71	88.9	4.85	gi 255561383	<i>Ricinus communis</i>	GTP binding protein, putative
39	81	143.2	9.85	gi 38345965	<i>Oryza sativa</i>	OSJNBb0062B06.6
49	57	156.6	5.90	R1B12_SOLDE	<i>Solanum demissum</i>	Putative late blight resistance protein homolog R1B-12
53	71	74.4	5.07	Q8GX04_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hypothetical protein At1g22882
55	66	24.9	11.14	Q6ZLE3_ORYSA	<i>Oryza sativa</i>	Hypothetical protein OJ1005_H01.13
59	79	31.24	5.24	gi 194698182	<i>Zea mays</i>	unknown

Tabella 4.14. Proteine identificate dal flavedo di limone biologico estratte con protocollo US.

Proteine ottenute da limone convenzionale con protocollo estrattivo TCA/AC						
Spot	Score	M.W.	p.I.	Database Num.	Specie	Protein
9	68	40.9	9.30	Q94ID3_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cytokinin synthase
14	73	19.4	8.98	gi 147790168	<i>Vitis vinifera</i>	hypothetical protein
19	71	39.0	10.4	gi 224091128	<i>Populus trichocarpa</i>	predicted protein

Tabella 4.15. Proteine identificate dal flavedo di limone convenzionale estratte con protocollo TCA/AC.

Proteine ottenute da limone convenzionale con protocollo estrattivo US						
Spot	Score	M.W.	p.I.	Database Num.	Specie	Protein
1	74	75.5	5.18	gi 124245039	<i>Cucumis sativus</i>	chloroplast HSP70
21	76	37.1	7.12	gi 157337895	<i>Vitis vinifera</i>	unnamed protein product
26	71	41.3	5.71	gi 219363037	<i>Zea mays</i>	hypothetical protein LOC100216776
28	39	17.4	5.68	gi 22686	<i>Corylus avellana</i>	major allergen
29	66	24.2	6.82	gi 241993370	<i>Pimpinella saxifraga</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
30	71	68.3	9.87	BAA85217	<i>Oryza sativa</i>	AP000570 HID
31	72	26.5	8.47	gi 220061235	<i>Pogostemon cablin</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
32	74	18.3	8.70	gi 260401128	<i>Citrus sinensis</i>	cyclophilin
33	72	20.5	10.16	gi 255072973	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	ribosomal protein L21
34	88	16.9	7.85	Q9MBF3_CITUN	<i>Citrus unshiu</i>	Glycine-rich RNA-binding protein
35	72	64.3	6.75	gi 242068905	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g022240
39	68	12.9	7.03	Q1SCD7_MEDTR	<i>Medicago truncatula</i>	Hypothetical protein
40	64	59.9	5.95	ATPB_M_NICPL	<i>Nicotiana glauca</i>	ATP synthase subunit beta, mitochondrial

Tabella 4.16. Proteine identificate dal flavedo di limone convenzionale estratte con protocollo US. La proteina corrispondente allo spot 28 ha ottenuto un'assegnazione con uno score troppo basso per consentire un'attribuzione sicura, ma che farebbe risalire ad un major allergene di *Corilus avellana*.

In totale sono state identificate 42 proteine con buona attendibilità che sommate a quelle precedenti raggiungono un totale di 102 proteine identificate finora esclusivamente dal tessuto del flavedo di limone.

Analizzando i dati di queste tabelle si può notare che il numero maggiore di proteine identificate come peculiari, sia per il metodo di coltivazione che per il metodo di estrazione, si ottiene dai limoni biologici le cui proteine sono estratte con il protocollo che prevede il trattamento ultrasonico, per un totale di 17 proteine, che rappresentano il 40% delle proteine identificate (tab. 4.14). Per il campione proveniente da coltivazioni convenzionali e trattato con il protocollo US si è riusciti ad identificare 13 proteine (tab.4.16), per un valore percentuale del 29%. Il campione di limone biologico, trattato con il metodo estrattivo TCA/AC ha permesso di identificare soltanto 10 proteine (tab.4.13), il 22%. Infine il dato più negativo si è ottenuto estraendo le proteine dai limoni convenzionali con il protocollo TCA/AC, per un totale di 3 proteine (tab.4.15), che equivalgono al 9% delle proteine identificate con MALDI-TOF, come rappresentato nel diagramma 4.13.

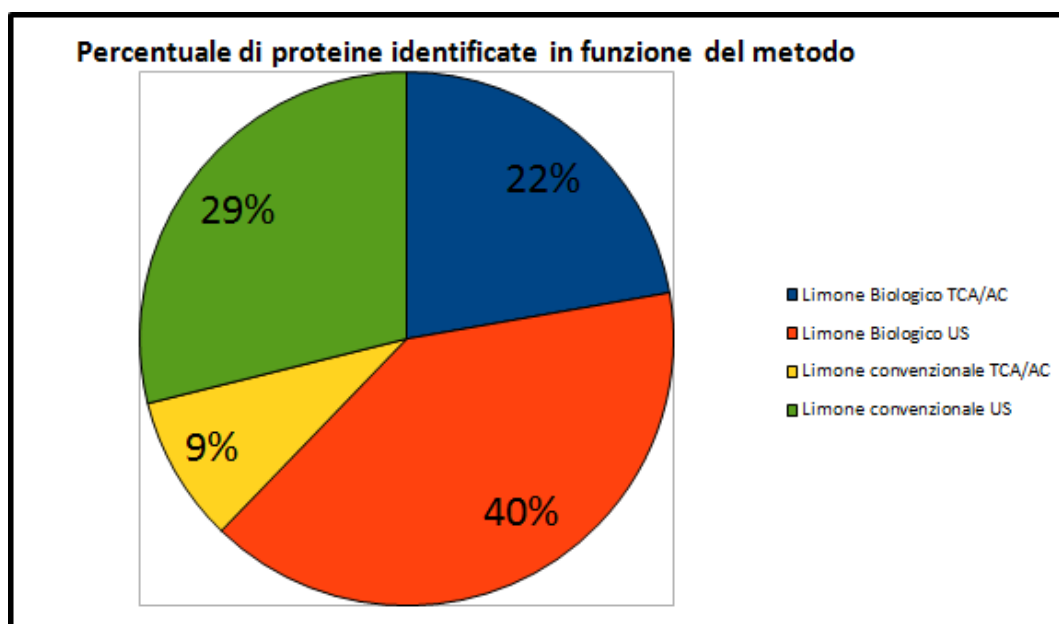


Grafico 4.13. Rappresentazione dell'efficacia metodologica nell'identificazione delle proteine in campioni di limone provenienti da colture biologiche e convenzionali.

Questo dato ci permette di avanzare l'ipotesi che il metodo estrattivo con l'impiego dell'energia ultrasonica favorisca l'estrazione e la separazione totale delle componenti proteiche dal tessuto del flavedo di limone. Inoltre, il metodo di coltivazione del limone sembrerebbe influire in maniera evidente sui patterns proteici dei campioni analizzati (fig.4.15). Il numero complessivo di spot con differenti pesi molecolari e punti isoelettrici nei gel ottenuti da limone coltivato secondo il metodo dell'agricoltura biologica è maggiore rispetto a quello relativo al limone coltivato secondo il metodo dell'agricoltura convenzionale. Gli spot individuati ed analizzati per i gel del limone biologico sono 40 per il campione trattato con protocollo US e 29 per quello trattato con TCA/AC, rispetto ai 19 del campione di limone convenzionale trattato con protocollo US e ai 10 dello stesso campione trattato con TCA/AC.

DISCUSSIONE



L'approccio integrato allo studio delle caratteristiche tissutali, biochimiche e proteomiche del flavedo di *Citrus limon* ha fornito dati utili a stabilire le peculiarità dei frutti coltivati nei limoneti di Rocca Imperiale, ma soprattutto ha evidenziato che la pratica colturale influisce significativamente sulla struttura istoanatomica del flavedo, sulla composizione delle molecole responsabili delle sue qualità organolettiche e sull'espressione differenziale di proteine che potrebbero essere responsabili di queste variazioni.

Le caratteristiche istoanatomiche del frutto del Femminello di Rocca, suggeriscono infatti la presenza di un determinante qualitativo a cui concorrono le caratteristiche genetiche della cultivar e le condizioni pedoclimatiche, come evidenziato dal confronto con gli altri frutti provenienti dalle diverse regioni di coltivazione che godono già del marchio IGP; da un punto di vista quali-quantitativo dei frutti (superficie media, sezione trasversale, superfici medie dell'albedo e del flavedo, quantità di succo, peso fresco dei frutti e resa in succo), il limone di Rocca Imperiale risulta avere parametri superiori a quelli degli altri frutti. Anche per quanto riguarda le caratteristiche morfo-anatomiche del flavedo, il tessuto primariamente indagato in questa tesi, esso presenta numerosi sincizi ghiandolari con una densità maggiore nei frutti di Rocca rispetto ai frutti provenienti dalla Sicilia e dalla Campania. A questo si associa un corrispondente aumento della qualità degli oli essenziali sintetizzati e accumulati da questi gruppi ghiandolari, che nei frutti di

Rocca presentano un contenuto di limonene superiore al 70% (Pignataro, 2008). Localmente le condizioni colturali delle diverse zone di Rocca, influiscono fortemente su tutti questi parametri; in particolare i frutti provenienti da località Corvisiero in cui la coltivazione biologica è stata introdotta da più di un decennio, hanno evidenziato caratteristiche qualitative superiori rispetto a tutti i parametri analizzati; tali risultati dimostrano che la coltivazione biologica consolidata nel tempo fornisce garanzie salutistiche non solo perché bandisce l'uso di sostanze chimiche di sintesi per la difesa fitosanitaria (Regolamento (CE) N. 834/2007), che come è noto nuocciono gravemente al consumatore, ma esaltano le caratteristiche di qualità intrinseca del prodotto agrumicolo (De Lorenzo e Di Renzo, 2006). In particolare due parametri qualitativi, come la resa in succo e il numero dei sincizi ghiandolari, rendono il limone biologico un prodotto commercialmente competitivo.

Le innumerevoli caratteristiche qualitative oltre che salutari rendono il limone una coltivazione di notevole importanza economica e di conseguenza innescano interessi su scala mondiale. L'Italia è e lo è stata ancor di più in passato uno tra i leader mondiali del settore tant'è vero che la produzione agrumicola caratterizza il paesaggio di vasti comprensori all'interno dei quali è un'importante fonte di reddito con profonde radici nel territorio. I radicali cambiamenti che hanno investito il settore obbligano ad un costante aggiornamento delle conoscenze per poter rispondere adeguatamente all'attuale evoluzione dello scenario che ha visto altre regioni del mondo sottrarre ai nostri produttori consistenti fette di mercato.

Le nuove proposte di studio e di ricerca in agrumicoltura suggerite dai continui avanzamenti nelle conoscenze agro-biotechologiche da parte dei ricercatori e presenti anche in questo lavoro, rispondono alle svariate necessità del comparto produttivo e dell'industria di trasformazione con l'obiettivo di trasferire ai tecnici, ai produttori ma anche ai consumatori, le conoscenze necessarie ad una razionalizzazione nell'avanzamento innovativo del processo produttivo, nel rispetto di quelle che sono le priorità del momento: una riduzione degli sprechi, un uso razionalizzato delle risorse idriche, una progressiva eliminazione di pesticidi e sostanze chimiche di sintesi per le concimazioni e la difesa da patogeni, per giungere a sostituirle con molecole di origine naturale (Codex Alimentarius, 2009; Le Guillou *and* Scharpé, 2001; Fukuoka, 1980). La gestione agro-ecologica degli agrumeti contribuirebbe a superare la crisi ambientale che sta attraversando il pianeta e ad attutire i colpi inferti dalle avversità biotiche ed abiotiche, ai danni delle coltivazioni di ogni genere, causate in gran parte dai cambiamenti climatici e dall'inquinamento.

L'indagine proteomica

Il flavedo di limone è un tessuto caratterizzato da cellule epidermiche fortemente pigmentate dalla presenza di numerosi cromoplasti che, durante la maturazione del frutto, sintetizzano e accumulano elevate quantità di caroteni e carotenoidi (Costa *et al.*, 2006; Rodrigo *et al.*, 2004); immersi nel tessuto epidermico si differenziano grandi complessi ghiandolari, la cui funzione è quella di sintesi ed

accumulo di complesse miscele monoterpeneche che sono i componenti maggiori di ciò che va sotto il nome di olio essenziale. Per queste caratteristiche il flavedo è un tessuto estremamente recalcitrante ai più comuni metodi estrattivi, in quanto ricco di sostanze non-proteiche che interferiscono severamente con l'estrazione e la purificazione delle proteine (Lliso *et al.* 2007). Uno dei maggiori problemi che i ricercatori incontrano nell'approccio allo studio proteomico di un tessuto vegetale è ottenere un campione proteico di elevata purezza e qualità, senza cui non è possibile produrre analisi biomolecolari accurate e affidabili (Zheng *et al.* 2007). Recentemente numerosi protocolli estrattivi pubblicati utilizzano procedure multistep allo scopo di estrarre utilizzando tamponi acquosi e successivamente di purificare la componente proteica (Saravanan *and* Rose, 2004; Wang *et al.*, 2006; Spadafora *et al.*, 2008). Altri protocolli, invece, consentono di estrarre e purificare le proteine mediante acidi e solventi organici con l'intento di precipitare le proteine e di allontanare contemporaneamente tutte le sostanze interferenti. L'approccio proteomico basato sull'estrazione delle proteine del flavedo mediante il protocollo multistep messo appunto specificamente per questo tessuto e la successiva separazione su gel bidimensionali ha rilevato una caratteristica mappa polipeptidica distribuita su un ampio range di pesi molecolari e punti isoelettrici.

Il metodo estrattivo, basato essenzialmente sull'uso di acidi forti e di solventi organici ha in questa prima fase del lavoro, reso il campione proteico mediamente purificato, la cui risoluzione è stata resa possibile solo dopo un'accurata elaborazione

d'immagine dei gel risolti.

Nonostante questo aspetto, è stato possibile individuare chiaramente gli spot presenti su tutti i gel analizzati con buona approssimazione. Non sono presenti in letteratura, dati di proteomica bidimensionale relativi unicamente al tessuto di flavedo per il genere *Citrus*. Campioni di foglia e di albedo analizzati con metodi paragonabili presentano risultati analoghi per quanto riguarda il numero di spot analizzati ed il grado di purezza del campione, su. (Maserti *et al.*, 2007; Lliso *et al.*, 2007).

Le 60 proteine identificate attraverso analisi LC/MS hanno dato identità significative nel confronto con le sequenze presenti nei database di *Citrus* e in altri database generici come GPMdb (www.thegpm.org). Di queste 60 proteine, 11 rappresentano quasi il 35% delle proteine espresse, tra queste, due enzimi del ciclo glutatione-ascorbato sono fra le più rappresentate; si tratta di enzimi che comunemente sono emo-proteine ed hanno un cofattore EME nel sito catalitico della reazione di ossidoriduzione (Raven *et al.* 2004); in particolare l'ascorbato perossidasi citosolica, che in pianta svolge il fondamentale ruolo di detossificazione dei perossidi tra cui il perossido d'idrogeno utilizzando l'ascorbato come substrato (Davletova *et al.*, 2005). Il secondo enzima è un'ascorbato perossidasi cloroplastica che svolge un ruolo importantissimo nella detossificazione dei perossidi derivanti dal processo fotosintetico (Kangasj rvi *et al.*, 2008; Maruta *et al.*, 2007). Nei cloroplasti delle piante superiori il sistema ascorbato/glutathione è localizzato nello stroma e partecipa alla detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dissipando l'energia

fotonica in eccesso (Sanmartin *et al.*, 2003). Estesa bibliografia riporta che l'espressione dell'ascorbato perossidasi è elicitata in condizioni di stress ed in seguito ad attacco patogeno indicando l'importanza di questo enzima nel controllo della concentrazione dell'acqua ossigenata (H₂O₂) nel signaling intracellulare (Shigeoka *et al.*, 2002; Davletova *et al.* 2005; De Gara *et al.*, 2000; Maruta *et al.*, 2007). Sulla base di questi dati, gli elevati livelli di espressione di questi due enzimi fanno supporre che in questo tessuto il metabolismo di detossificazione e di difesa siano molto elevati e potrebbero essere in relazione l'uno con l'altro. Infatti, il flavedo è sottoposto a stress luminosi intensi, stress termici e attacchi biotici, tutti stress compresi come significativi sorgenti di radicali perossido (Lafuente *et al.*, 2004).

Sempre fra le proteine altamente espresse troviamo la HSP70, HSP17,8-classe I, la HSP19-classe II, quest'ultima identificata con elevata omologia nel database di *Citrus*. Anche in questo caso una estesissima bibliografia assegna alle heat shock proteins innumerevoli ruoli nella modulazione della risposta a svariati stress biotici ed abiotici. Recentemente esse sono state descritte nei processi di sviluppo e termotolleranza nelle graminacee (Sharma-Natu *et al.*, 2010), nello stress da metalli pesanti (Tominaga *et al.*, 2010) e come chaperons molecolari nello shock termico ed in altre svariate forme di stress (Timperio *and* Zolla 2008). La relazione fra i ROS e le HSP sembra inoltre esistere corroborando l'ipotesi che le piante sono state capaci di sviluppare un elevato controllo sull'azione dalle specie reattive dell'ossigeno. Nel nostro contesto ciò suggerisce che nel flavedo vi sia uno stringente controllo della

tossicità dei ROS a cui concorrono più specie proteiche. Altro enzima fortemente espresso è la beta-1,3-glucanasi di classe III, la cui espressione è indotta da una varietà di segnali correlati alla risposta di difesa, ma anche da trattamenti con H₂O₂, da ferita o da trattamenti con elicitori fungini preparati da *Phytophthora* spp così come da inoculazioni di *Pseudomonas syringae*. Tuttavia, i livelli di espressione dell'enzima sono fortemente indotti anche dal jasmonato, dall' etephon e dal salicilato. Riguardo alla sua espressione costitutiva la beta -1,3- glucanasi è espressa in plantule di soia e tabacco a 4 giorni dalla germinazione, mentre in plantule di 30 giorni è possibile rilevare la sua espressione solo nelle radici. L'insieme di questi dati suggerisce che l'enzima ha un ruolo sia nello sviluppo che nella difesa da attacco patogeno (López-Martín et al., 2008; Cheong *et al.*, 2000). Nel frutto di arancio la sua espressione è stata correlata allo shock da freddo e alla produzione di etilene (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2008).

A completare il quadro delle proteine altamente espresse sono la Gliossalasi I e la Glicer aldeide-3-fosfato deidrogenasi. La Gliossalasi I, nota anche come isomerasi, fa parte del sistema delle Gliossilasi insieme alla Gliossalasi II, che catalizza la detossificazione del Metil-gliossale a D-lattato usando il glutatione ridotto come cofattore che ad opera della gliossalasi 2 viene nuovamente ridotto. Il Metil-gliossale è un intermedio dei triosofosfati nel pathway glicolitico. I suoi elevati accumuli sono tossici nelle cellule e possono inibirne la crescita, agendo sulla degradazione delle proteine, del DNA e attivando i sistemi di difesa ossidativa. Da qui il ruolo primario

delle gliossalasi la cui distribuzione in tutti i regni dei viventi indica il ruolo universale nel metabolismo primario. Recentemente è stato dimostrato che le gliossalasi, in pianta, subiscono un aumento dell'espressione a seguito di diversi stress come lo quello salino e lo stress da metalli pesanti (Hossain *and* Fujita, 2009). Connesso a questo pathway è la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi che, come è noto, catalizza il sesto step di glicolisi convertendo la gliceraldeide-3fosfato in glicerato-1,3-disfosfato; si tratta quindi del metabolismo primario ossidativo che fornisce energia localizzato nel citosol delle cellule eucariotiche. Gli elevati livelli del metabolismo glicolitico suggeriscono una richiesta di energia derivata direttamente dagli zuccheri semplici e potenzialmente connessa al metabolismo di detossificazione e di difesa anch'essi fortemente elevati. Tra le proteine mediamente espresse troviamo la cianato idratasi che suggerisce come il flavedo di citrus sia capace di idrolizzare il cianato trasformandolo in carbammato che rientra nel pathway metabolico di biosintesi delle purine, glutammato, arginina, prolina e più generalmente nel metabolismo dell'azoto (Lam *et al.*, 1996). Gran parte delle proteine identificate come mediamente espresse appartengono alle ATP sintasi vacuolari, mitocondriali, cloroplastiche. Di rilevante interesse è la Isoflavone reduttasi che sintetizza la riduzione di specifici isoflavoni in isoflavanoni (Wang *et al.*, 2006). Gli isoflavonoidi, com'è noto giocano un ruolo importante nella difesa delle piante e associano un ampio range di benefici per la salute umana (Terreaux *et al.*, 2003; Messina *et al.*, 2002). Hanno infatti un effetto benefico riducendo i rischi di cancro osteoporosi e

abbassando i livelli di colesterolo nel sangue. In pianta svolgono il ruolo di fitoalessine nella difesa da patogeno e da erbivoro; anche in questo caso la presenza della isoflavone reductasi fra le proteine mediamente espresse suggerisce un ruolo di questo pathway nella difesa da patogeno nel flavedo.

Infine la presenza della Perossidasi TPX1, correlata all'adattamento allo stress di salinità può essere coinvolta nei processi di adattamento a shock osmotico dovuto alla carenza idrica che causa un aumento della salinità nel terreno (Medina *et al.*, 1999, Sun *et al.*, 2009; Giorno *et al.*, 2009).

Fra le proteine poco espresse e molto poco espresse troviamo la subunità alfa della chaperonina cloroplastica di 60 kDa e l'enolasi. In questa classe di proteine le più rappresentate sono classificate come *sweet orange proteins*, la cui identificazione è stata effettuata tramite l'EST database di cui però non è ancora nota la funzione in pianta.

Dall'analisi proteomica effettuata su flavedo di limone è emerso che gli effetti antiossidanti e di detossificazione rientrano in due metabolismi importanti per il tessuto maturo.

È interessante notare che, le proteine legate alla risposta di difesa e allo stress sono anche altamente espresse, indicando che il flavedo è una potente barriera contro le aggressioni biotiche e abiotiche.

Riassumendo, delle 60 proteine identificate con il metodo estrattivo TCA/AC, 13 appartengono ai metabolismi di stress e difesa, 6 al metabolismo mitocondriale, 5 a

quello dei cloroplasti ed all'anabolismo degli zuccheri, 6 ai metabolismi ossidativi e di detossificazione; altre 25 proteine non sono state correlate ad alcun metabolismo e 15 di queste sono state osservate in *Citrus sinensis* come "sweet orange proteins".

Non sono stati identificati i peptidi nei restanti 10 spot, anche se le identità di sequenza sono state controllate nella banca dati EST di Citrus, in cui la preponderanza delle sequenze depositate deriva dal tessuto dell'endocarpo; ciò potrebbe significare che queste proteine non identificate siano selettivamente espresse nel flavedo dove assolvono il loro ruolo in specifiche vie metaboliche di questo tessuto, diverse da quelle presenti nell'endocarpo. L'analisi proteomica del frutto di limone fin qui realizzata, insieme alla futura descrizione metabolica del frutto che se ne potrà produrre, contribuirà alla comprensione ulteriore dei fenomeni legati alla coltivazione, ai processi di pre- e post- raccolta e ai fattori che influenzano lo sviluppo dei frutti e la loro maturazione, consentendo l'implementazione di nuove pratiche per la qualità della frutta utile per la salute umana.

A tal proposito, un dato molto interessante emerso nell'analisi bioinformatica è stata l'individuazione di tre peptidi rintracciati in numerosi spot analizzati. La particolarità più evidente è che questi peptidi sono presenti in spot a diversi pesi molecolari e punti isoelettrici, inoltre, non danno alcuna attribuzione dallo score attendibile con proteine note in database. Da ricerche bibliografiche è apparso che queste sequenze appartengono ad una proteina allergenica della classe CIT S, precisamente la Cit s 1 (Pörtl *et al.*, 2007), descritta come una proteina allergenica

importante in arancio dolce (Crespo *et al.*, 2006).

Da ulteriori ricerche, si sa inoltre che fra gli allergeni di *Citrus sinensis* la Cit s 1 causa un forte aumento di IgE in pazienti allergici, come è stato dimostrato in numerosi studi clinici (Ahrazem *et al.*, 2006). La Cit s1 costituisce uno di tre allergeni recentemente identificati e caratterizzati in *C. sinensis*, insieme alla Cit s 2 che è una profilina (Lopez Torrejon *et al.*, 2005) e alla Cit s 3 che appartiene alle proteine di trasporto dei lipidi (LTP) (Ahrazem *et al.*, 2005).

La Cit s 1 è stata descritta come una proteina di 24 kDa secondo quanto diagnosticato in uno studio su sei pazienti le cui IgE l'hanno riconosciuta come tale (Ibanez *et al.*, 2004), mentre la sua sequenza peptidica è stata esaminata e determinata mediante spettrometria di massa descrivendola come tipica di una glicoproteina germin-like (Pörtl *et al.*, 2007).

L'attività biologica della Cit s1 nel tessuto di flavedo però, rimane ancora da chiarire.

Le Germin e le Germin-like proteins sono glicoproteine della parete cellulare con una robusta struttura quaternaria che mostrano una resistenza insolita al trattamento dei detergenti, alla denaturazione causata dal calore ed alla degradazione delle proteasi (Bernier *and* Berna, 2001).

Esse costituiscono una famiglia numerosa e variegata di proteine vegetali che partecipano a molti processi che sono importanti per lo sviluppo delle piante e di difesa, mostrando un certo numero di funzioni, dal metabolismo antiossidante

(ossalato ossidasi, superossido dismutasi, ecc) per la ricezione e la trasduzione del segnale o nel rafforzamento della parete cellulare e resistenza all'attacco di patogeni e da parte degli stress abiotici (Manosalva *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2006).

Questo studio è stato in grado di individuare i peptidi dell'allergene Cit S1 nel limone ampiamente espresso nel tessuto flavedo e di dare maggiori informazioni sulla sua struttura attraverso l'approccio proteomico.

Alla luce di queste conoscenze i nostri dati hanno sottolineato che il tessuto di flavedo di limone è in grado di sintetizzare grandi quantità di proteine Cit s1 come si può dedurre dall'elevata espressione degli spot in cui i peptidi sono stati trovati. Dei diciassette spot rilevati, quelli di più alto peso molecolare misurano 120 kDa e sono coerenti come peso, con l'isoforma tipicamente esamerica riportata per le Germin-like proteins; questo peso molecolare suggerisce che la Cit S1 nel limone sia composta da un trimero (ca. 120 kDa) di tre dimeri (ca. 40 kDa ciascuna), il cui monomero ha dimensioni 20 kDa, differentemente da come in precedenti relazioni è stata indicata la Cit s1 in diverse specie del genere *Citrus*, cioè come una glicoproteina monomerica di 24 kDa.

I nostri risultati sono supportati dalle conoscenze sulla proprietà generale delle Germin-like proteins, che segnalano l'estrema resistenza di queste proteine alla denaturazione in acido tricloroacetico, acetone, calore ed SDS, tutte condizioni che si verificano in questo lavoro, durante i trattamenti sperimentali, che generano appunto le separazioni della proteina nei segmenti peptidici sistematicamente nei punti di

maggior debolezza strutturale.

I frammenti di peptidi di Cit s 1 da noi rilevati con tecnologia LC-MS e software GPM dopo la purificazione e la digestione triptica sono coincidenti con quelli più grandi ottenuti da Pörtl *et al.* (2007) dall'estratto di buccia d'arancia. Benchè siano note le proprietà allergeniche di questa proteina, ancora non è nota il suo ruolo nel tessuto di Citrus; una possibile ipotesi è che la Cit s1 possa svolgere un ruolo di ossalato ossidasi, così come riportato per l'attività di un elevato numero di proteine germin-like (Dumas *et al.*, 1993). Come è noto infatti, nell'endocarpo dei frutti di *Citrus* viene accumulata una notevole quantità di ossalato di calcio, che viene sequestrato e precipitato nei vacuoli delle cellule sacculiformi (Kulaksizoğlu *et al.*, 2007). La Cit s1, potrebbe essere quindi l'enzima che catalizzando l'ossidazione dell'ossalato, libera perossido di idrogeno e contribuisce così al rafforzamento della parete cellulare nella risposta sistemica di difesa da patogeno (Zimmermann *et al.*, 2006).

L'identificazione delle diverse classi proteiche finora ottenute ha dimostrato l'efficacia del metodo proteomico per lo studio di tessuti vegetali particolari come il flavedo di limone. Nelle sue applicazioni, tale approccio, ha dovuto tener conto della complessità biochimica del flavedo, che ha contrastato in maniera considerevole la purificazione della frazione proteica, con l'ottenimento di risultati accettabili; nonché del ruolo fisiologico articolato e di fondamentale importanza che questo tessuto riveste, essendo "tessuto di frontiera" tra i compartimenti interni e l'ambiente esterno

al frutto. Questo rende peculiare l'interpretazione delle funzioni e la descrizione dei metabolismi, non ancora del tutto chiari e conosciuti.

Il miglioramento del protocollo di estrazione e purificazione, al fine di ampliare il quadro proteico totale del tessuto ed ottenere così un maggior numero di spot ben separati e facilmente identificabili, è stato possibile grazie all'introduzione dell'energia ad ultrasuoni (sonicazione) nelle tecniche estrattive e di preparazione del campione proteico per l'analisi mono- e bi-dimensionale.

La sonicazione ha consentito di ottenere una migliore separazione delle proteine, in quanto l'energia sviluppata delle onde sonore è in grado di degradare porzioni subcellulari che i metodi classici basati solo sulla dissoluzione chimica non permettono (Carreira *et al.*, 2009). Ciò rende più accessibili all'estrazione ambienti subcellulari altamente idrofobici quali membrana plasmatica, nucleare, e frazione microsomale, aumentando significativamente la resa proteica (Capelo-Martínez, 2008).

La sonicazione del campione, inoltre, migliora la solubilità delle proteine dopo precipitazione con TCA, così come dopo ogni altro lavaggio, aumentandone il recupero totale in campioni altamente purificati e quindi risolvibili in gel con elevata riproducibilità (Manadas *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2002).

A dimostrazione dell'efficacia estrattiva i gel bidimensionali ottenuti con il metodo ultrasonico separano in maniera caratteristica proteine con punti isoelettrici nelle regioni estremamente acide ed alcaline del gel, spot non apprezzabili in

maniera significativa negli analoghi, trattati con il metodo TCA/AC. Dal confronto delle mappe polipeptidiche è evidente anche l'aumento del numero di spot presenti nei campioni sonicati che sono del tutto assenti nelle mappe polipeptidiche non sonicate; sempre nel confronto emerge che esiste, per alcune classi proteiche una complementarità di estrazione tra i due metodi. Ne sono un esempio i tre spot maggiormente rappresentati che, pur conservando una elevata espressione nei campioni sonicati, rappresentano quasi il 15% del totale delle proteine non sonicate; ciò suggerisce che l'ambiente subcellulare in cui sono collocate queste proteine risulta più accessibile all'estrazione col metodo TCA/AC e meno col metodo ad ultrasuoni.

L'analisi proteomica degli spot differentemente espressi nei campioni non sonicati evidenzia la presenza dell'enzima citochinina sintasi e di altre due proteine presenti in banca dati, ma alle quali non è stata assegnata nessuna identificazione; la sonicazione invece, determina la presenza di 13 diverse proteine non rilevabili con protocollo non sonicato; tra queste una HSP70 cloroplastica, la subunità maggiore della Rubisco, la ciclofilina, quest'ultima identificata nel database di *Citrus*; a minor peso molecolare è stata identificata una proteina che risulta avere una attribuzione, anche se non significativa, con una proteina allergenica di *Corylus avellana*.

Sempre a basso peso molecolare sono state identificate, la proteina ribosomale L21 e una RNA-binding protein.

La preponderanza di proteine plastidiali e cloroplastiche lascia supporre che il

metodo ultrasonico migliori abbondantemente la qualità estrattiva dalle componenti subcellulari ricche in componenti membranose.

Un'interessante applicazione per saggiare la capacità estrattiva da frutti provenienti da diversi metodi di coltivazione si è ottenuta impiegando i due metodi estrattivi a flavedo di frutti provenienti da coltura biologica stabilizzata. Analogamente a quanto riscontrato nei campioni precedenti il trattamento con ultrasuoni determina una maggiore rappresentazione di proteine con localizzazione cloroplastica (subunità Rubisco), Mitochondriale (ATP sintasi e Piruvato ossido reduttasi) e di membrana (GTP binding protein), corroborando l'ipotesi che la sonicazione faciliti l'accessibilità dell'estrazione. I dati in nostro possesso confermano che l'energia associata alle onde ultrasoniche esercita un'azione che può ritenersi simile a quella dei detergenti non cationici comunemente usati nei protocolli per l'estrazione delle proteine organellari (Manadas *et al.*, 2006; Carreira *et al.*, 2007).

Appare quindi interessante come l'accoppiamento delle sonicazione all'intervento di acidi e solventi organici completi il quadro degli agenti estraenti, sia nella fase acquosa che lipidica.

In contrasto con i benefici apportati dall'applicazione della sonicazione è la ridotta estrazione di proteine che invece risultano altamente espresse nelle mappe polipeptidiche ottenute con il metodo TCA/AC; ciò suggerisce, che nell'ottica di ottenere il più ampio spettro possibile nell'identificazione delle proteine realmente espresse nel tessuto, l'applicazione di entrambi i metodi per lo studio selettivo di

determinate categorie proteiche sembra essere l'approccio più ottimale.

Come ultima analisi resta il confronto tra le proteine ottenute con il metodo ad ultrasuoni in frutti che variano per la pratica colturale; è interessante notare che la percentuale di variazione delle proteine differenzialmente presenti fra i due campioni supera il 10% nel flavedo di limone biologico rispetto a quello di coltivazione convenzionale. Dai dati risultanti in letteratura su approcci di proteomica e genomica funzionale di campioni trattati a differenti condizioni, la percentuale di variabilità dell'espressione genica o proteica si aggira intorno al 2-3% del totale del trascrittoma/proteoma (Mazzuca *et al.*, 2009; Alagna *et al.*, 2009).

Alla luce di questi dati il risultato ottenuto sui campioni biologici appare abbastanza insolito e sottolinea la profonda incidenza della pratica colturale sui livelli di espressione proteica del flavedo. A conforto di questo dato sono i risultati analoghi ottenuti in *Solanum tuberosus* in cui le differenze nel pattern proteico dei due campioni messi a confronto superavano anche in questo caso abbondantemente la soglia del 2% di variabilità. La stima della variabilità riscontrata è destinata ad aumentare man mano che tutti gli spot differenzialmente espressi saranno identificati. L'altro dato interessante riguarda quelle proteine che sono over espresse nelle risposte da stress che aumentano in coltivazioni cresciute con regimi di fertilizzazioni organiche (Lehesranta *et al.*, 2007).

Gli enzimi da noi identificati, SOD, Gliossalasi e Ascorbato perossidasi, come altamente espressi, sono altresì overespressi in tuberi di patata biologica.

Possiamo concludere che la maggior sorgente di differenza nel profilo proteico fra la coltivazione biologica e quella convenzionale consiste nei trattamenti di concimazione e protezione delle colture attuati nella pratica colturale biologica; inoltre le proteine identificate portano un incremento delle proteine di difesa e da stress nel tessuto del flavedo e dimostrano come la tecnica proteomica sia capace di evidenziare differenze anche in un esperimento in pieno campo.

Le proteine differenzialmente espresse, identificate con entrambi i metodi estrattivi (TCA/AC e US) e provenienti dai due tipi di colture (biologica e convenzionale) sono riconducibili a differenti pathway e svolgono svariate funzioni all'interno e all'esterno della cellula del tessuto analizzato.

Alcuni di questi pathway e funzioni sono stati riscontrati all'interno della piattaforma bioinformatica MetaCyc (MetaCyc.org), un database universale delle vie metaboliche degli enzimi presenti in tutti gli ambiti della biologia (Caspi et al., 2008).

Delle oltre novanta proteine identificate, il 18% è imputabile a funzioni che trovano la loro applicazione nei pathway di risposta agli stress abiotici e alla risposta di difesa da agenti biotici; il metabolismo energetico, riconducibile per lo più al metabolismo mitocondriale corrisponde al 14% del totale delle proteine identificate.

Il metabolismo degli zuccheri è rappresentato sia da enzimi della via glicolitica che da enzimi della via gluconeogenica e rappresenta l'8% del totale delle proteine. Interessanti pathway della detossificazione determinano un metabolismo rappresentato dal 6,5% delle proteine identificate. Le restanti proteine si

distribuiscono tra metabolismo nucleare (9%) e proteine con diverse funzioni ascrivibili ad altri metabolismi cellulari (13%).

Un dato, che suggerisce sicuramente il nuovo punto di partenza per indagini proteomiche più approfondite, è rappresentato dal 26% di quelle proteine che, pur avendo ottenuto un'attribuzione, non hanno ancora riconosciuta alcuna funzione.

Infatti, dal momento che nei database specifici di *Citrus*, la preponderanza delle sequenze deriva dal tessuto dell'endocarpo, ciò potrebbe significare che queste proteine dalla funzione ancora incognita possano assolvere ruoli in specifiche vie metaboliche del flavedo, diverse da quelle presenti negli altri tessuti del frutto.

AA.VV. COST Domain Committee "Food and Agriculture", *Plant proteomics in Europe (EUPP)*, 2008, MONITORING PROGRESS REPORT.

Aebersold R., Mann M., *Mass spectrometry-based proteomics*, 2003, Nature 422: 198-207.

Ahrazem O., Ibanez M. D., Lopez-Torrejon G., Sanchez-Monge R., Sastre J., Lombardero M., Barber D. and Salcedo G., *Lipid transfer proteins and allergy to oranges*, 2005, Int Arch Allergy Immunol, 137:201–210.

Ahrazem O., Ibanez M. D., Lopez-Torrejon G., Sanchez-Monge R., Sastre J., Lombardero M., Barber D. and Salcedo G., *Orange germin-like glyco-protein Cit s 1: an equivocal allergen*, 2006, Int Arch Allergy Immunol. 139: 96-103.

Alagna F., D'Agostino N., Torchia L., Servili M., Rao R., Pietrella M., Giuliano G., Chiusano M.L., Baldoni L. and Perrotta G., *Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development*, 2009, BMC Genomics 10:399.

America A. H. and Cordewener J. H., *Comparative LC-MS: a landscape of peaks and valleys*, 2008, Proteomics, 8:731-49.

Arumuganathan K. and Earle E. D., *Nuclear DNA content of some 479 important plant species*, 1991, Plant Molecular Biology Reporter, vol. 9, no. 3, pp. 208-218.

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

Bernier F. and Berna A., *Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins, but what do they do exactly?*, 2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 545–554.

Bonk T. and Humeny A., *MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA*, 2001, *The Neuroscientist*, 1: 6-12.

Bradford M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, 1977, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Burks A. W., Williams L. W., Connaughton C., Cockrell G., O'Brien T. J. and Helm R. M., *Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge*, 1992, *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 962-969.

Capelo-Martinez J.-L., *Ultrasound in Chemistry*, 2008, Analytical Applications, Ed: Wiley-VCH, Verlag GmbH.

Carbonaro M., *Proteomics: present and future in food quality evaluation*, 2004, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 15, Issues 3-4, Pages 209-216.

Carpentiere S. C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R. and Panis B., *Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis*, *Proteomics*, 2005, 5 (10): 2497-507.

Carreira R. J., Cordeiro F. M., Moro A. J., Rivas M. G., Rial-Otero R., Gaspar E. M., Moura I. and Capelo J. L., *New findings for in-gel digestion accelerated by high-intensity focused ultrasound for protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*, 2007, *J. of Chromatography A*, 1153, 291-299.

Carreira R. J., Lodeiro C., Diniz M. S., Moura I. and Capelo J. L., *Can ultrasonic energy efficiently speed (18)O-labeling of proteins?*, 2009, *Proteomics*, 9(21):4974-7.

Caspi R., Foerster H., Fulcher C. A., Kaipa P., Krummenacker M., Latendresse M., Paley S., Rhee S. Y., Shearer A. G., Tissier C., Walk T. C., Zhang P. and Karp P. D., *The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases*, 2008, *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, pp. 623-631.

Cavaliere C., Cucci F., Foglia P., Guarino C., Samperi R. and Laganà A., *Flavonoid profile in soybeans by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 21 Issue 14, Pages 2177 - 2187.

Chan L. L., Chun-Lap L. and Hodgkiss I. J., *Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis*, 2002, *Proteomics*, 2, 1169-1186.

Cheong Y. H., Kim C. Y., Chun H. J., Moon B. C., Park H. C., Kim J. K., Lee S., Han C., Lee S. Y. and Cho M. J., *Molecular cloning of a soybean class III beta-1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection*, 2000, 154(1):71-81.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Thirty-Second Session, FAO Headquarters, Rome, Italy, 29 June - 4 July 2009.

Costa M. G. C., Mendes A. F. S., Cidade L. C., Soares-Filho W. S., Otoni W. C. and Moore G. A., *Towards Metabolic Engineering of Carotenoid Content in Sweet-orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.)*, 2006, *Biotechnology and Sustainable Agriculture and Beyond Proceedings of the 11th IAPTC&B Congress*, August 31-18, 2006 Beijing, China.

Crespo J. F., Retzek M., Foetisch K., Sierra-Maestro E., Cid-Sanchez A. B., Pascual C. Y., Conti A., Feliu A., Rodriguez J., Vieths S. and Scheurer S., *Germin-like protein Cit s 1 and profilin Cit s 2 are major allergens in orange (Citrus sinensis) fruits*, 2006, Mol. Nutr. Food Res. 2006, 50, 282 – 290.

Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D. J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K. and Mittler R., *Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis*, 2005, Plant Cell. Jan, 17(1):268-81.

De Gara L., Paciolla C., De Tullio M.C., Motto M. and Arrigoni O., *Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species*, 2000, Physiologia Plantarum, Volume 109, Number 1, , pp. 7-13(7).

de Jong E. C., van Zijverden M., Spanhaak S., Koppelman S. J., Pellegrom H. and Penninks A. H., *Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins*, 1998, Clin. Exp. Allergy 28, 743-751.

De Lorenzo A. and Di Renzo L., *Nutrire per prevenire: quali nuovi indicatori di rischio nutrizionale?*, Working Paper, SABIO n. 2, Roma 2006.

Dumas B., Sailland A., Cheviet J. P., Freyssinet G. and Pallett K., *Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein*, 1993, C R Acad Sci III., 316(8):793-8.

Ewan P. W., *Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations*, 1996, BMJ 312, 1074-1078.

Forment J., Gadea J. and Huerta L., et al., *Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies*, 2005, Plant Molecular Biology, vol. 57, no. 3, pp. 375-391.

Forment J., Gadea J., Huerta L., Abizanda L., Agusti J., Alamar S., Alos E., Andres F., Arribas R., Beltran J. P., Berbel A., Blazquez M. A., Brumos J., Canas L. A., Cercos M., Colmenero-Flores J. M., Conesa A., Estables B., Gandia M., Garcia-Martinez J. L., Gimeno J., Gisbert A., Gomez G., Gonzalez-Candelas L., Granell A., Guerri J., Lafuente M. T., Madueno F., Marcos J. F., Marques M. C., Martinez F., Martinez-Godoy M. A., Miralles S., Moreno P., Navarro L., Pallas V., Perez-Amador M. A., Perez-Valle J., Pons C., Rodrigo I., Rodriguez P. L., Royo C., Serrano R., Soler G., Tadeo F., Talon M., Terol J., Trenor M., Vaello L., Vicente O., Vidal C. H., Zacarias L. and Conejero V., *Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies*, 2005, *Plant Molecular Biology*, 57:375-391.

Fukuoka M., *La rivoluzione del filo di paglia; un'introduzione all'agricoltura naturale*, 1980, Quaderni d'Ontignano, Libreria Editrice Fiorentina, Firenze.

Fusaro V. A. and Stone J. H., 2003, *Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator*, *Clin. Exp. Rheumatol.* 21(S32):S3-14.

Gauci S., Veenhoff L. M., Heck A. J. and Krijgsveld J., *Orthogonal Separation Techniques for the Characterization of the Yeast Nuclear Proteome*, 2009, *J Proteome Res* 8(7):3451-3463.

Giorno F., Wolters-Arts M., Grillo S., Scharf K.-D., Vriezen W. H. and Mariani C., *Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers*, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 2, pp. 453-462, 2010, Advance Access publication 23 October, 2009.

Godovac-Zimmermann J., Brown L., *Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry*, 2001, *Mass. Spec.* 20: 1-57.

Han J.-Z., and Wang Y.-B., *Proteomics: present and future in food science and technology*, 2008, *Trends in Food Science & Technology*, 19 (1), pp. 26-30.

Harris D. C., *Chimica Analitica Quantitativa*, Zanichelli, 1991.

Hefle S. L., Nordlee J. A. and Taylor S. L., *Allergenic foods*, 1996, Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 36, S69-89.

Hossain M. A. and Fujita M., *Purification of Glyoxalase I from Onion Bulbs and Molecular Cloning of Its cDNA*, *Bioscience*, 2009, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 73, No. 9 pp.2007-2013.

Hourihane J. O., Dean T. P. and Warner J. O., *Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges*, 1996, BMJ 313, 518-521.

Hourihane J. O., Kilburn S. A., Dean P. and Warner J. O., *Clinical characteristics of peanut allergy*, 1997, Clin. Exp. Allergy 27, 634-639.

Hurkman W. J. and Tanaka C. K., *Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis*, 1986, Plant Physiol., 81: 802-806.

Hyatt D. C., Youn B., Zhao Y., Santhamma B., Coates R. M., Croteau R. B. and Kang C., *Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis*, 2007, PNAS, vol. 104 no. 13, 5360-5365.

Ibanez M. D., Sastre J., San Ireneo M. M., Laso M. T., Barber D. and Lombardero M., *Different patterns of allergen recognition in children allergic to orange*, 2004, J Allergy Clin Immunol. 113:175- 177.

Kangasj rvi S., Lepist  A., H nnik inen K., Piippo M., Luomala E. M., Aro E. M. and Rintam ki E., *Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses*, 2008, Biochem J. 1;412(2):275-85.

Kanitsar K., Arce L., R os A. and Valc rcel M., *Determination of phenolic constituents in citrus samples by on-line coupling of a flow system with capillary electrophoresis*, 2001, Electrophoresis, 22: 1553-1565.

Katz E., Fon M., Lee Y. J., Phinney B. S., Sadka A. and Blumwald E., *The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism*, 2007, *Planta* 226: 989–1005.

Katz E., Martinez Lagunes P., Riov J., Weiss D., Goldschmidt E. E., *Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit*, 2004, *Planta*, 219: 243–252.

Kulaksizoğlu S. and Sofikerim M., Cevik C., *In vitro effect of lemon and orange juices on calcium oxalate crystallization*, 2008, *Int Urol Nephrol*, 40(3):589-94.

Laemmli U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, 1970, *Nature*, 227, 680-685.

Lafuente M. T. and Sala J. M., *Active Oxygen Detoxifying Enzymes and Phenylalanine Ammonia-lyase in the Ethylene-Induced Chilling Tolerance in Citrus Fruit*, 2004, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (11), pp 3606–3611.

Laganà A., Bacaloni A., Castellano M., Curini R., De Leva I., Faberi A. and Materazzi S., *Sample preparation for determination of macrocyclic lactone mycotoxins in fish tissue, based on on-line matrix solid-phase dispersion and solid-phase extraction cleanup followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, 2003, *J AOAC Int.* Jul-Aug;86(4):729-36.

Lam H.-M., Coschigano K. T., Oliveira I. C., Melo-Oliveira R. and Coruzzi G. M., *The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants*, 1996, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:569–93.

Le Guillou G. and Scharpé A., *Organic Farming: Guide to Community Rules*, 2001, European Commission, Luxembourg, pp. 28.

Lehesranta S. J., Koistinen K. M., Massat N., Davies H. V., Shepherd L. V., McNicol J. W., Cakmak I., Cooper J., Lück L., Kärenlampi S. O. and Leifert C., *Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers*, 2007, *Proteomics*, 7, 597–604.

Lliso I., Tadeo F. R., Phinney B. S., Wilkerson C. G. and Talón M., *Protein Changes in the Albedo of Citrus Fruits on Postharvesting Storage*, 2007, J. Agric. Food Chem., 55 (22), pp 9047–9053.

López-Martín M. C., Romero L. C. and Gotor C., *Cytosolic cysteine in redox signaling*, 2008, Plant Signal Behav, (10):880-1.

Lopez-Torrejon G., Ibanez M. D., Ahrazem O., Sanchez-Monge R., Sastre J., Lombardero M., Barber D. and Salcedo G., *Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen*, 2005, Allergy. 60:1424–1429.

Lücker J., Schwab W., van Hautum B., Blaas J., van der Plas L. H. W., Bouwmeester H. J. and Verhoeven H. A., *Increased and Altered Fragrance of Tobacco Plants after Metabolic Engineering Using Three Monoterpene Synthases from Lemon*, 2004, Plant Physiology, January Vol. 134, pp. 510-519.

Luro F. L., Costantino G., Terol J., Argout X., Allario T., Wincker P., Talon M., Ollitrault P. and Morillon R., *Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (Citrus clementina Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping*, 2008, BMC Genomics, 16;9:287.

Marques M. C., Alonso-Cantabrana H., Forment J., Arribas R., Alamar S., Conejero V. and Perez-Amador M. A., *A new set of ESTs and cDNA clones from full-length and normalized libraries for gene discovery and functional characterization in citrus*, 2009, BMC Genomics, Sep 11;10:428.

Martinez-Godoy M. A., Mauri N., Juarez J., Marques M. C., Santiago J., Forment J. and Gadea J., *A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis*, 2008, BMC Genomics, 3;9:318.

Manadas B. J., Vougas K., Fountoulakis M. and Duarte C. B., *Sample sonication after trichloroacetic acid precipitation increases protein recovery from cultured hippocampal neurons, and improves resolution and reproducibility in two-dimensional gel electrophoresis*, 2006, Electrophoresis 27, 1825–1831.

Manosalva P. M., Davidson R. M., Liu B., Zhu X., Hulbert S. H., Leung H. and Leach J. E., *A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice*, 2009, *Plant Physiol*, 149(1):286-96.

Margis R., Dunand C., Teixeira F. K. and Margis-Pinheiro M., *Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview*, 2008, *FEBS J.* 275(15):3959-70.

Maruta T., Tanouchi A., Tamoi M., Yabuta Y., Yoshimura K., Ishikawa T. and Shigeoka S., *Arabidopsis Chloroplastic Ascorbate Peroxidase Isoenzymes Play a Dual Role in Photoprotection and Gene Regulation under Photooxidative Stress*, 2007, *Plant Cell Physiol.*

Mason T. J., *Sonochemistry*, 2000, Oxford Chemistry Primers, Oxford, UK.

Mason T. J. and Lorimer J. P., *Sonochemistry: Theory, Applications and uses of Ultrasound in Chemistry*, 1989, Wiley-Interscience, New York.

Mazucca S., Spadafora A., Bracale M., Marsoni M., Cozza R., Rende F., Chiappetta A. and Innocenti A. M., *Analisi proteomica e morfocitologica in popolazioni di Posidonia oceanica in relazione al disturbo ambientale*, 2004, Convegno Conisma-Aiol, Terrasini.

Mazucca S., Spadafora A., Filadoro D., Vannini C., Marsoni M., Cozza R., Bracale M., Pangaro T. and Innocenti A. M., *Seagrass light acclimation: 2-DE protein analysis in Posidonia leaves grown in chronic low light conditions*, 2009, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume 374, Pages 113-122.

Medina M. I., Quesada M. A., Pliego F., Botella M. A. and Valpuesta V., *Expression of the tomato peroxidase gene TPX1 in NaCl-adapted and unadapted suspension cells*, 1999, *Plant Cell Reports* 18: 680–683.

Mehta A., Silva M. S., Guidetti-Gonzalez S., Carrer H., Takita M. A. and Martins N. F., *et al. Signaling pathways in a Citrus EST database*, 2007, *Genet. Mol. Biol.* [online]. vol.30, n.3, suppl., pp. 734-751.

Messina M., Gardner C. and Barnes S., *Gaining Insight into the Health Effects of Soy but a Long Way Still to Go: Commentary on the Fourth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*, 2002, J. Nutr, 132:547S-551S.

Müller A. and Steinhart H., *Recent developments in instrumental analysis for food quality*, 2007, Food Chemistry Volume 101, Issue 3, Pages 1136-1144.

Nyrén, P., *The History of Pyrosequencing*, 2007, Methods Mol Biology 373: 1-13.

Oeljeklaus S., Meyer H. E. and Warscheid B., 2009, *Advancements in plant proteomics using quantitative mass spectrometry*, J Proteomics, 72:545-554.

Pandey A. and Mann M., *Proteomics to study genes and genomes*, 2000, Nature, 405: 837-846.

Park O. K., *Proteomic Studies in Plants*, 2004, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37 (1): 133-138.

Perata P., Loreti E., Alpi A., Gonzali S., Pinchera A., Tonacchera M., Lazzeri V., *Piante transgeniche accumulanti iodio*, Istituto di biologia e biotecnologia agraria, 2005, Brevetto N.: A000155.

Picciarelli P., Lorenzi R., Paolicchi F. and Ceccarelli N., *Auxin Biosynthesis and homeostasis of indole-3-acetic acid in Laburnum anagyroides seedsbook*, 2004, 44-44, Chania, Crete, Greece.

Pignataro, V., *Le peculiarità del "limone di Rocca Imperiale"*, in AA.VV. *Il Limone di Rocca Imperiale, Patrimonio dell'agricoltura calabrese*, 2008, Ed. Librare, Cosenza, Realizzato con il contributo della Regione Calabria, Misura 4.8 P.O.R. CALABRIA 2000/2006 e concesso dall'autore sotto licenza *Creative Commons*.

Pignataro V., Spadafora A., Filadoro D. and Mazzuca S., *Proteins Extraction and Characterization from Lemon flavedo*, Proceedings of “XXXII CIOSTA - CIGR Conference - IUFRO” 1, 271-274.

Pörtl G., Ahrazem O., Paschinger K., Ibanez M. D., Salcedo G., and Wilson I. B.H., *Molecular and immunological characterization of the glycosylated orange allergen Cit s 1*, 2007, *Glycobiology*, vol. 17 no. 2 pp. 220–230.

Raven E. L., Lad L., Sharp K. H., Mewies M. and Moody P. C., *Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase*, 2004, *Biochem. Soc. Symp.* (71): 27-38.

Regolamento (CE) N.834/2007, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2007, L 189/1 IT.

Rodrigo M. J., Marcos J. F. and Zacarías L., *Biochemical and Molecular Analysis of Carotenoid Biosynthesis in Flavedo of Orange (Citrus sinensis L.) during Fruit Development and Maturation*, 2004, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (22), pp 6724–6731.

Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M. and Nyrén P., *Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release*, 1996, *Analytical Biochemistry* 242: 84.

Ronaghi M., Uhlén M., and Nyrén P., *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*, 1998, *Science* 281: 363.

Sanchez-Ballesta M. T., Zacarias L., Granellb A. and Lafuente M. T., *β -1,3-Glucanase gene expression as a molecular marker for postharvest physiological disorders in citrus fruit and its hormonal regulation*, 2008, *Postharvest Biology and Technology*, Volume 48, Issue 1, Pages 146-149.

Sanmartin M., Drogoudi P. D., Lyons T., Pateraki I., Barnes J. and Kanellis A. K., *Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone*, 2003, *Planta* 216: 918–928.

Saravanan R. S. and Rose J. K. C., *A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues*, 2004, *Proteomics*, 4:2522–2532.

Santos H. M., Lodeiro C. and Capelo-Martínez J. L., *The Power of Ultrasound*, Chapter 1 in *Ultrasound in Chemistry, Analytical Applications*, 2008, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 1-16.

Sela-Buurlage M. B., Ponstein A. S., Vloemans S. A., Melchers L. S., Van der Elzen P. J. M. and Cornelissen B. J. C., *Only specific chitinases and beta-1,3-glucanases exhibit antifungal activity*, 1993, *Plant Physiol.*, 101 (3):857-863.

Sharma-Natu P., Sumesh K. V. and Ghildiyal M. C., *Heat Shock Protein in Developing Grains in Relation to Thermotolerance for Grain Growth in Wheat*, 2010, *Journal of Agronomy and Crop Science*, Volume 196, Number 1, pp. 76-80(5).

Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. and Yoshimura K., *Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes*, 2002, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 372, pp. 1305–1319.

Shimada T., Fuiii H. and Endo T., et al., *Toward comprehensive expression profiling by microarray analysis in citrus: monitoring the expression profiles of 2213 genes during fruit development*, 2005, *Plant Science*, vol. 168, no. 5, pp. 1383-1385.

Sicherer S. H. and Sampson H. A., *Peanut and tree nut allergy*, 2000, *Curr. Opin. Pediatr.* 12, 567-573.

Song C., Fang J., Li X., Liu H. and Thomas Chao C., *Identification and characterization of 27 conserved microRNAs in citrus*, 2009, *Planta*, Sep;230(4):671-85. Epub 2009 Jul 8.

Spadafora A., Filadoro D., Mazzuca S., Bracale M., Marsoni M., Cardilio M. and Innocenti A. M., *2-DE polypeptide mapping of Posidonia oceanica leaves, a molecular tool for marine environment studies*, 2008, Plant Biosystems, Volume 142, pages 213 – 218.

Sugiyama A., Nishikawa F., Endo T., Nakano M., Ikoma Y., Shimizu T. and Omura M., *Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray*, 2007, Plant Science, 173(3):340-348.

Sun P., Tian Q.-Y., Chen J. and Zhang W.-H., *Aluminium-induced inhibition of root elongation in Arabidopsis is mediated by ethylene and auxin*, Journal of Experimental Botany, Vol. 61, No. 2, pp. 347–356, 2010, Advance Access publication 25 October, 2009.

Talon M. and Gmitter F. G. Jr., *Citrus Genomics*, 2008, Hindawi Publishing Corporation, International Journal of Plant Genomics pp. 1-17.

Terol J., Conesa A., Colmenero J. M., Cercos M., Tadeo F., Agustí J., Alós E., Andres F., Soler G., Brumos J., Iglesias D. J., Götz S., Legaz F., Argout X., Courtois B., Ollitrault P., Dossat C., Wincker P., Morillon R. and Talon M., *Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance*, 2007, BMC Genomics, 25;8:31.

Terol J., Naranjo M. A., Ollitrault P. and Talon M., *Development of genomic resources for Citrus clementina: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences*, 2008, BMC Genomics, Sep 18;9:423.

Terreaux C., Polasek J. and Hostettmann K., *Plant Constituents with Hormonal Effects*, *Current Organic Chemistry*, 2003 , Volume 7, Number 12, pp. 1151-1161(11).

Timperio A. M., Egidi M. G. and Zolla L., *Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP)*, 2008, Journal of Proteomics, Volume 71, Issue 4, Pages 391-411.

Tominaga M., Harada A., Kinoshita T. and Shimazaki K. I., *Biochemical Characterization of Calcineurin B-like Interacting Protein Kinase in Vicia guard cells*, 2010, Plant Cell Physiol.

Turner G., Gershenzon J., Nielson E. E., Froehlich J. E. and Croteau R., *Limonene Synthase, the Enzyme Responsible for Monoterpene Biosynthesis in Peppermint, Is Localized to Leucoplasts of Oil Gland Secretory Cells*, 1999, Plant Physiology, 120: 879–886.

van Os H., Andrzejewski S., Bakker E., Barrena I., Bryan G. J., Caromel B., Ghareeb B., Isidore E., de Jong W., van Koert P., Lefebvre V., Milbourne D., Ritter E., van der Voort J. N., Rousselle-Bourgeois F., van Vliet J., Waugh R., Visser R. G., Bakker J. and van Eck H. J., *Construction of a 10,000-marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genomewide physical map*, Genetics, 2006, 173(2):1075-87.

Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S. and Cresti M., *Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds*, 2003, Electrophoresis, 24 (14): 2369-75.

Wang W., Vignani R., Scali M. and Cresti M., *A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis*, 2006, Electrophoresis 27: 2782–2786.

Wang X., He X., Lin J., Shao H., Chang Z. and Dixon R. A., *Crystal Structure of Isoflavone Reductase from Alfalfa (Medicago sativa L.)*, 2006, Journal of Molecular Biology, Volume 358, Issue 5, Pages 1341-1352.

Westermier R., Loland S. and Asbury R., *La tecnologia proteomica*, 2002, Journal of Clinical ligand assay, 25: 250-260.

Wigand P., Tenzer S., Schild H. and Decker H., *Analysis of Protein Composition of Red Wine in Comparison with Rosé and White Wines by Electrophoresis and High-Pressure Liquid Chromatography—Mass Spectrometry (HPLC-MS)*, Journal of agricultural and food chemistry 2009, 57(10):4328-4333.

Wilkins M. R., Sanchez J. C., Williams K. L. and Hochstrasser D. F., *Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects*, 1997, Electrophoresis 17(5):830-8.

Wilkins M. R., Williams K. L., Apple R. D. and Hochstrasser D. F., *New Frontiers in Functional Genomics*, 1997, in Proteome Research, ed. Springer Berlin.

Wishart D. S., *Metabolomics: applications to food science and nutrition research*, 2008, Trends in Food Science & Technology, Volume 19, Issue 9, Pages 482-493.

Wong J. W., Sullivan M. J. and Cagney G., *Computational methods for the comparative quantification of proteins in label-free LCn-MS experiments*, 2008, Brief Inform, 9(2):156-65.

Zheng Q., Song J., Doncaster K., Rowland E., and Byers D. M., *Qualitative and Quantitative Evaluation of Protein Extraction Protocols for Apple and Strawberry Fruit Suitable for Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry Analysis*, 2007, J. Agric. Food Chem., 55 (5), pp 1663–1673.

Zhu W., Smith J. W. and Huang C. M., *Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics*, 2010, J Biomed Biotechnol, 840-518.

Zimmermann G., Bäumlein H., Mock H.-P., Himmelbach A. and Schweizer P., *The Multigene Family Encoding Germin-Like Proteins of Barley. Regulation and Function in Basal Host Resistance*, 2006, Plant Physiology, Vol. 142, pp. 181-192.

Xu C., Xu Y. and Huang B., *Protein Extraction for Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteomic Profiling in Turfgrass*, 2008, Crop Sci. 48:1608-1614.

Sitografia

<http://www.ivia.es>

<http://www.genomics.cn/en/index.php>

<http://www.potatogenome.net>

<http://www.lswn.it>

www.itpa.it

<http://en.wikipedia.org/wiki/Proteomics>

www.proteomicworld.org - Clinical Proteomics Research Map

www.cprmap.com

www.ebi.ac.uk/pride - PRIDE - Proteomics Identifications database

<http://www.proteomescience.de>

<http://www.hupo2005.com>

<http://www.isbiotechnology.com>

<http://www.corriere.it/salute/>

http://apps.isiknowledge.com/full_record.do

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr9000948>

CitEST (Citrus ESTs database), <http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>

Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ALLEGATO 1

Il genere *Citrus* raggruppa, oltre al limone, molte altre specie, tra cui numerosi ibridi. Fanno parte del **genere "Citrus"**:

Citrus maxima - Pummelo

Citrus medica - Cedro

Citrus reticulata - Mandarino

Ibridi importanti

Citrus × *aurantifolia* - Limetta

Citrus × *aurantium* - Arancio amara

Citrus × *bergamia* - Bergamotto

Citrus × *hystrix* - Limetta kaffir o Combava

Citrus × *ichangensis* - Limone limetta

Citrus × *limon* - Limone

Citrus × *limonia* - Rangpur

Citrus × *paradisi* - Pompelmo

Citrus × *sinensis* - Arancio dolce

Altri ibridi

Citrus × *volkameriana* - Limone volkameriano

Citrus × *jambiri* - Limone rugoso

Citrus × *karna* - Limone karna

Citrus × *latifolia* - Limetta di Tahiti o limetta persiana

Citrus × *limetta* - Limetta romana

Citrus × *limettoides* - Limetta dolce di Palestina

Citrus × *lumia* - Lumia

Citrus × *myrtifolia* - Chinotto

Mandarini

Citrus × *unshiu* - Mandarino satsuma

Citrus × *reshni* - Mandarino Cleopatra

Citrus × *sunki* - Mandarino acido

Citrus × *tangerina* - Mandarino tangerino

Citrus × *indica* - Mandarino indiano

Citrus × *tachibana* - Mandarino tachibana

Citrus × *madurensis* - Mandarino calamondino

Citrus × *natsudaidai* - Pompelmo giapponese

Citrus × *junos* - Arancio juzu

Citrus × *latipes* - Papeda di Khasi

Citrus × *micranta* - Biasong o papeda a fiore piccolo

Citrus × *celebica* - Papeda di Celebes

Citrus × *macrophylla* - Alemow o Colo

Citrus × *macroptera* - Papeda della Malesia o don gan

Citrus × *pennivesiculata* - Gajanimma

Citrus × *clementina* - Clementina

Citrus × *tangelo* - Mapo

Falsi ibridi o ibridi misti

Citrus floridana sin: - ×*Citrofortunella floridana*

C. madurensis sin: - ×*Citrofortunella microcarpa* - ×*Citrofortunella mitis*

Citrus japonica - in realta del genere *Fortunella* - *Fortunella japonica*

Citrus margarita - in realta del genere *Fortunella* - *Fortunella margarita*

ALLEGATO 2

Capitolo di libro

Pignataro V. , *Il limone di Rocca Imperiale Patrimonio dell'agrumicoltura calabrese*. AA.VV. Cap. III, " Le peculiarità del "limone di Rocca Imperiale"" , Cosenza: Edizioni Librare. 2008. pp. 31-37.

Atti di convegno

Pignataro V. , Spadafora A. , Filadoro D. , Mazzuca S. , " *Proteins extraction and characterization from lemon flavedo*". Atti del convegno "XXXIII CIOSTA CIGR V Conference 2009 - IUFRO", Reggio Calabria, 17-19 JUNE, 2009, Giammetta G and Zimbalatti G: Reggio Calabria, 2009, Vol. 1, pp. 271-274.

Pignataro V. , Spadafora A. , Filadoro D. , Mazzuca S. , " *Proteome from lemon (citrus limon) peel, a tissue producing high quantity of allergens*". Contributo a 4° Annual National Conference of Italian Proteomic Association, Milan, 22-25 June 2009.

Pignataro V. , Mazzuca S. , Capelo J. L. , " *Speeding up the sample treatment for proteome studies of lemon*". 1st International Congress on Analytical Proteomics - ICAP, Costa da Caparica, Lisboa, Portugal , September 30th - October 3rd, 2009.

Pignataro V. , Spadafora A. , Innocenti A. M. , Mazzuca S. , " *Estrazione e caratterizzazione di proteine dall'epicarpo di limone (Citrus limon var. femminello) di Rocca Imperiale*". Atti del convegno "S.B.I.", Reggio Calabria, 17/19 Settembre, 2008, A cura di Spampinato G., Signorino G., KALIT EDITRICE: Reggio Calabria, 2008, p. 125.

Pignataro, V., Mazzuca, S., Innocenti, A.M., 2008, *Proteins characterization in lemon fruit (Citrus limon, L. Burm.f. var. Femminello, Rocca Imperiale)*, ISHS (International Society of Horticultural Science) Commission Biotechnology and Molecular Biology, First International Symposium on Biotechnology of Fruit Species, *Biotechfruit2008*, Dresden, Germany.

Pignataro V. , Innocenti A. M. , Mazzuca S. , " *Estrazione e caratterizzazione di proteine dall'epicarpo di limone (Citrus limon var. Femminello) di Rocca Imperiale*". Atti del convegno "S.B.I. - Le Biotechnologie Vegetali all'inizio del terzo millennio un ponte verso il futuro", Università degli Studi di Salerno - Fisciano (Sa), 23-25 giugno, 2008, 2008, p. 45.

Altro

Pignataro V. , Mazzuca S. , *Studio per l'individuazione delle caratteristiche Fenologiche, Biomolecolari e Biochimiche del limone di Rocca Imperiale.* , 2008, Progetto di riferimento: Caratterizzazione del limone di Rocca Imperiale, misura 4.7 - P.O.R. CALABRIA 2000/2006, per conto di "Consorzio di Tutela e Valorizzazione del Limone di Rocca Imperiale".

Pignataro V. , " *Caratteristiche Fenologiche, Biomolecolari e Biochimiche del Limone di Rocca Imperiale.* Contributo a "Il limone di Rocca Imperiale Patrimonio dell'agrumicoltura calabrese", Rocca Imperiale (Cs), 28 Luglio 2008.

Pignataro V. , " *Caratterizzazione del Limone di Rocca Imperiale.* Contributo a Presentazione del Disciplinare I.G.P. Limone di Rocca Imperiale, Rocca Imperiale (Cosenza), 1 agosto 2007.

ALLEGATO 3

PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE PROTEICA DALL'EPICARPO DI LIMONE (TCA/AC)

1. *Polverizzazione del tessuto -Triturare il tessuto (1-2 g) con pestello e mortaio aggiungendo di volta in volta azoto liquido, fino ad ottenere una polvere finissima, utile per rimuovere le impurità e per una buona estrazione proteica.*
2. *Lavaggi in TCA: in Acqua -Trasferire la polvere (0.1-0.3 g) in tubi da 2ml e riempirli con 20% TCA in Acqua (4°C). Passare al vortex per 30 sec e centrifugare a 13000-16000 rpm per 3 min a 4°C. Eliminare il sovranatante (ripetere l'operazione 5 volte). in Acetone -riempire i tubi con 20% TCA in Acetone 100% freddo (-20°C). Lasciare incubare per 20 min a -80°C. Passare al vortex per 30 sec e centrifugare a 13000-16000 rpm per 3 min a 4°C. Eliminare il sovranatante.*
3. *Lavaggi in Metanolo -Riempire i tubi con Metanolo 80% freddo ed Ammonio acetato 0.1 M. Passare al vortex per 30 sec e centrifugare a 13000-16000 rpm per 3 min a 4°C. Eliminare il sovranatante.*
4. *Lavaggi in Acetone -Riempire i tubi con Acetone 80% freddo. Passare al vortex per 30 sec e centrifugare a 13000-16000 rpm per 3 min a 4°C. Eliminare il sovranatante (ripetere l'operazione 4 volte).*
5. *Evaporazione del solvente -Lasciare evaporare l'Acetone dal tessuto a RT e tritare con aggiunta di Silicon dioxide (0.5g per ogni grammo di tessuto fresco di partenza).*
6. *Estrazione e precipitazione delle proteine -Aggiungere 0.8 ml di 1:1 Fenolo/SDS buffer per ogni 0.05-0.1 g di tessuto ottenuto e pesato asciutto. Passare al vortex per 30 sec. e lasciare incubare per 5 min. Centrifugare a 13000-16000 rpm per 3 min. Trasferire 0.3 ml di fase fenolica superiore in nuovi tubi da 2 ml e riempirli con 5:1 di Ammonio acetato 0.1 M in Metanolo e lasciare riposare a -20°C per 10 min oppure overnight. Passare al vortex per 30 sec e centrifugare a 13000-16000 rpm per 5 min a 4°C. Eliminare il sovranatante. È visibile un pellet bianco.*
7. *Lavaggi finali -Lavare il pellet risultante con Metanolo 100% e successivamente con Acetone 80% (ripetere l'operazione 2volte). Passare al vortex e centrifugare per 3 min. Eliminare il sovranatante e lasciare asciugare il pellet a RT. Disciogliere le proteine in un buffer a scelta.*

ALLEGATO 4

Protocollo per la 2DE

Re-suspension Sample Buffer

Necessary Volumes: 200ul/Sample

Time: 1-2 hours of Incubation

X5 ml:

- Urea (7M) 2,1 g
- CHAPS (4%) 200 mg
- Tiourea (2M) 760 mg
- DTT (320mM) 250 mg

First Dimension (IEF)

- IPG Strip pH 3-10 (Linear or Nonlinear) 7 cm
- Sample+Buffer 125ul (x strip da 7 cm e 250 x strip da 18 cm)
- IPG Buffer-Ampholyte pH 3-10 (Linear or Nonlinear) 1,25ul/Sample
- Bromophenol Blue Colorant (1,25ul/Sample)

Gel Preparation **x2 strip**

Gel 7 cm lastrine piccole spaziatori 1.5 mm

Resolving gel: (12,5%) 20ml

Tris ph 8.8 (lower gel) 10 ml

glicerolo 40 % 2 ml

Acrilammide 30% 8 ml

APS 10% 200microlitri

TEMED 20 microlitri

Stacking gel: (6%) 4ml x 0.5 cm

acqua 2.2 ml

Tris pH 6.8 (upper gel) 1 ml

Acrilammide 30% 0.8 ml

APS 50 microlitri (ul)

TEMED 5 microlitri (ul)

Condizioni di corsa: **x2 gel**

Stacking Volt 120 (Constant) mA 30 /2 (15mA x gel)

Resolving Volt 120 (Constant) mA 90 /2 (45mA x gel)

ALLEGATO 5

Elenco delle proteine totali ottenute tramite GPM, BLAST, DE NOVO e MASCOT

Metabolismo di stress e difesa

At1g07400.1, 17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-C);
HSP19 class II [Citrus x paradisi]
Heat shock protein
Heat shock protein 70 [Arabidopsis thaliana]
HSP70 7 [Triticum aestivum]
HSP70 [Arabidopsis thaliana]
HSP19 class II [Citrus x paradisi]
beta-1,3-glucanase class III [Citrus clementina x Citrus reticulata]
CYN (CYANASE); cyanate hydratase [Arabidopsis thaliana]
sweet orange leaf, infected with Xylella fastidiosa (stage 2 of 2); Citrus sinensis;
sweet orange leaf infected with Xylella fastidiosa (stage 1 of 2); Citrus sinensis
isoflavone reductase-like protein 5 [Vitis vinifera]
TPX1 [Arabidopsis thaliana]
Putative late blight resistance protein homolog R1B-12
chloroplast HSP70
chloroplast HSP70 (molecular chaperone DnaK)

Metabolismo energetico

ATP synthase alpha chain
ATPSynthaseBetaChain
ATP synthase alpha chain, mitochondrial
malate dehydrogenase (NAD), mitochondrial [Arabidopsis thaliana]
mitochondrial small [Arabidopsis thaliana]
mitochondrial F1 ATP synthase Beta subunit [Arabidopsis thaliana]
ATP binding / hydrogen ion transporting ATP synthase, rotational mechanism
ATP synthase subunit beta, mitochondrial
GTP binding protein, putative
Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A [Zea mays]
Vacuolar ATP Synthase subunit B
At1g76030.1 Vacuolar ATP Synthase kDa subunit
Shaggy-related protein kinase alpha

Liccolisi e gluconeogenesi

2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Glycine max]
chloroplast / 60 kDa chaperonin alpha subunit / CPN-60 alpha
RuBisCO subunit binding-protein alpha subunit
Enolase [Zea mays]
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit

Metabolismo nucleare

Glycine-rich RNA-binding protein
putative polyprotein
Maturase
Putative retroelement
mini-chromosome maintenance 7
DNA-directed RNA polymerase subunit beta
Gigantea gi|188354314|
OSJNBb0062B06.6 Cromosoma "4" di riso

Proteine strutturali

gamma tubulin complex
ACT7 (actin 7) [Arabidopsis thaliana]
Elongation factor 1-alpha [Oryza sativa Japonica Group]
Putative uncharacterized protein AT4g39730
(AT1G61750 Arabidopsis thaliana) unknow protein
60S acidic ribosomal protein PO + (RPP0B) [Arabidopsis thaliana] Disterzione cellulare

Metabolismo di detossificazione e antiossidante

glyoxalase I
glyoxalase I [Cucurbita maxima]
cytosolic ascorbate peroxidase [Arachis hypogaea]
ascorbate peroxidase2 [Zea mays]
catalytic/coenzyme binding [Arabidopsis thaliana]
CYN (CYANASE); cyanate hydratase [Arabidopsis thaliana]

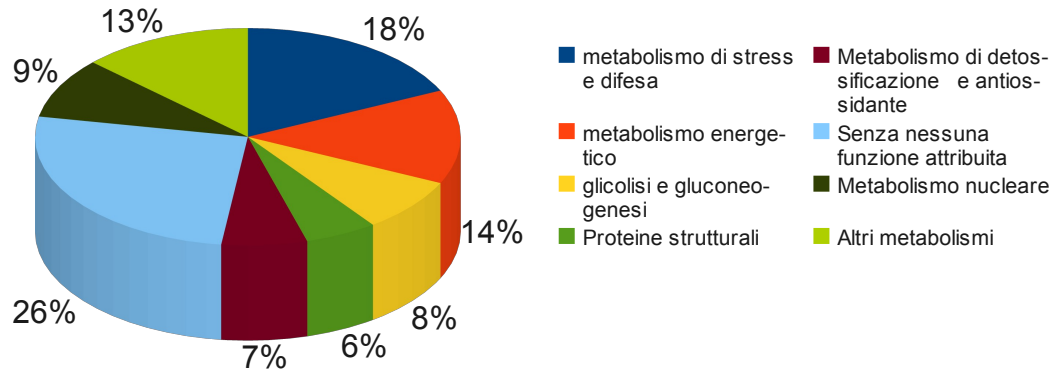
Senza nessuna funzione attribuita

sweet orange fruit, development stadium (3 of 6); Citrus sinensis
CS00-C1-102-003-B02-CT.F Sweet Orange Leaf
CS00-C2-003-044-E03-CT.F Sweet Orange Bark
CS00-C1-101-029-A10-CT.F Sweet Orange Leaf
Citrus Sinesis Cysteine Protease Cp mRNA
CS00-C2-003-005-D06-CT.F Sweet Orange Bark
sweet orange fruit, development stadium (6 of 6); Citrus sinensis
sweet orange fruit, development stadium (2 of 6); C. sinensis
sweet orange fruit, development stadium (2 of 6); Citrus sinensis
Sweet orange fruit, development stadium (2 of 6); Citrus sinensis
developing fruit con Arabidopsis 24 DAFB, Citrus sinensis
predicted protein XP_002309189.1
sweet orange; GenBank: EY750802 orange
sweet orange protein; Citrus sinensis
KN0AAK3 AF09FM1 AbsC Fruit Citrus Sinensis cDNA 5'
KN0AAM1 BA12RM1 SLH Citrus Sinensis cDNA 5'
KN0AAM1BA12RM1SLH Citrus Sinensis cDNA 5'
unknown
Putative uncharacterized protein At1g22882
Hypothetical protein OJ1005_H01.13
hypothetical protein CAN70122
VV_PEb07d07.b1 Vitis Vinifera cv.
AP000570 NID
Hypothetical protein Q1SCD7_MEDTR

Altri metabolismi e/o attività

Cytokinin synthase	Processamento del tRNA
Major allergen	Trasporto lipidico
Hypothetical protein LOC100216776	Fissazione dell'azoto
Cyclophilin	Ripiegamento delle proteine
Argininosuccinate lyase	Biosintesi degli aminoacidi
Seed maturation protein	Embriogenesi
F-box protein At4g10400	Pathway proteolitico

Funzione assegnata e metabolismi correlati Proteine identificate del flavedo



Il grafico rappresenta la distribuzione percentuale delle proteine identificate nel flavedo di limone, relativamente alla loro funzione e ruolo nei diversi metabolismi.

PROTEINE IDENTIFICATE CON METODO TCA/AC IN FLAVEDO DI LIMONE DI AGRICOLTURA BIOLOGICA
2007

Spot	N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
4	88.6	5.67	-		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Heat Shock Protein
5	66.0	4.0	UniProt: Q9LTX9		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Heat Shock Protein
7	66.0	4.6	UniGene: Ta.54509		<i>Triticum aestivum</i>	Heat Shock Protein
10	62.0	7.44	-		<i>Arabidopsis thaliana</i>	RuBisCo subunit binding
11	54.1	6.37	-		<i>Vitis vinifera</i>	Vacuolar ATP Synthase
15	34.0	4.1	gi AAAY40462.1		<i>C.clementina x C. Reticulata</i>	β -1,3-glucanase class III
16	31.9	5.86	-		<i>Citrus sinensis</i>	CS00-C1-101-029-A10-CT.F
17	50.6	6.44	-		<i>Citrus sinensis</i>	Cysteine Protease CP mRNA
19	22.0	4.1	UniProt: Q9FGM9		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mitochondrial small HSP

Spot

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
20	21.0	6.86	-	Citrus sinensis	CS00-C2-003-044-E03-CT.F
22	66.0	5.2	UniGene: Zm.6945	Zea mays	Vacuolar ATP Synthase
"	-	-	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Heat Shock Protein
25	54.0	5.1	UniProt: Q541w7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mitochondrial ATP synthase
26	37.8	6.37	-	<i>Citrus sinensis</i>	CS00-C1-102-003-B02-CT.F
"	42.8	5.98	-	<i>Vitis vinifera</i>	VV_PEB07d07.b1
27	53.0	5.7	UniProt P42895	Zea mays	Enolase
"	-	-	AT5G17310	<i>Arabidopsis thaliana</i>	UTP—glucose-phosphate
28	43.5	5.1	GENE ID: 830841	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ACT7 (actin 7)

Spot

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
28	-	-	-	-	ATP synthase mitochondrial beta chain urilyltransferase
32	33.5	5.1	-	-	Glyoxalase I
"	-	-	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60S acidic ribosomal protein
35	31.0	7.11	-	<i>Citrus sinensis</i>	UCRCS05_000612_f
"	43.7	5.94	-	<i>Citrus sinensis</i>	KN0AAM1 BA12RM1 SLH
36	24.0	4.8	-	<i>Citrus x paradisi</i>	HSP19 class II Chloroplast
"	-	-	-	<i>Cucurbita maxima</i>	Glyoxalase I
37	43.0	7.20	-	<i>Citrus sinensis</i>	KN0AAM1 BA12RM1 SLH
38	26.0	5.3	-	<i>Arachis hypogaea</i>	Cytosolic Ascorbate Peroxidase

Spot	N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
	39	38.1	6.41	-	<i>Citrus sinensis</i>	KN0AAK3 AF09FM1
	"	34.8	6.38	-	<i>Citrus sinensis</i>	CS00-C2-003-005-D06-CT.F
	40	34.0	6.0	UniProt: Q41772	<i>Zea mays</i>	Ascorbate peroxidase
	41	20.0	4.9	GI: 30575570	<i>Citrus x paradisi</i>	HSP19 class II
	42	21.5	5.0	UniProt: Q9XEX2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thioredoxin-dependent Peroxidase I
	"			-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CYN Cyanate hydratase
	42			-	<i>Citrus x paradisi</i>	HSP19 class II
	49	34.0	6.2	-	<i>Vitis vinifera</i>	Isoflavone reductase-like protein 5

Spot

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
51	35.0	6.7	UniProt: Q9ZP06	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Malate dehydrogenase (NAD) mitochondrial
57	50.0	9.5	UniProt: O64937	<i>Oryza sativa Japonica group</i>	Elongation factor 1-alpha
58	36.0	8.5	GI: 85720768	<i>Glycine max</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
60	36.0	8.9	GI: 85720768	<i>Glycine max</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
62	46.5	8.80	S41596	<i>Arabidopsis thaliana</i>	protein kinase ASK-alpha (EC 2.7.1.-) [similarity]

PROTEINE IDENTIFICATE CON METODO TCA/AC IN FLAVEDO DI LIMONE DI AGRICOLTURA BIOLOGICA
2008

Spot	N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
	24	52.3	5.85	CAA09001	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Argininosuccinate lyase
	40	80.9	5.55	gi 34452231	<i>Pisum sativum</i>	mini-chromosome maintenance 7
	41	61.7	9.38	gi 19920135	<i>Oryza sativa</i>	Putative retroelement
	44	51.4	10.41	gi 20270854	<i>Schizocodon soldanelloides</i>	maturase
	45	14.5	9.07	Q2XSE5_GLYTO	<i>Glycine tomentella</i>	Seed maturation protein
	51	110.9	9.04	gi 50511382	<i>Oryza sativa</i>	putative polyprotein
	57	48.3	5.41	Q8H135_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hypothetical protein
	58	45.3	5.26	Q5N7P8_ORYSA	<i>Oryza sativa</i>	Putative ATP synthase beta subunit

Spot

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
60	71.4	9.21	gi 119358834	Ostreococcus tauri	Abc1 Yeast ABC1-like protein (IC)
62	46.5	8.80	S41596	Arabidopsis thaliana	protein kinase ASK-alpha (EC 2.7.1.1.-)

PROTEINE IDENTIFICATE CON METODO TCA/AC IN FLAVEDO DI LIMONE CONVENZIONALE
2008**Spot**

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
9	40.9	9.30	Q94ID3_ARATH	Arabidopsis thaliana	Cytokinin synthase
14	19.4	8.98	gi 147790168	Vitis vinifera	hypothetical protein
19	39.0	10.4	gi 224091128	Populus trichocarpa	predicted protein

PROTEINE IDENTIFICATE CON METODO US IN FLAVEDO DI LIMONE CONVENZIONALE
2008

Spot	N°	PM	pl	Accession Num.	Database	Proteina
1	75.5	5.18		gi 124245039	Cucumis sativus	chloroplast HSP70
21	37.1	7.12		gi 157337895	Vitis vinifera	unnamed protein product
26	41.3	5.71		gi 219363037	Zea mays	hypothetical protein LOC100216776
28	17.4	5.68		gi 22686	Corylus avellana	major allergen
29	24.2	6.82		gi 241993370	Pimpinella saxifraga	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
30	68.3	9.87		BAA85217	Oryza sativa	AP000570 NID
31	26.5	8.47		gi 220061235	Pogostemon cablin	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
32	18.3	8.70		gi 260401128	Citrus sinensis	cyclophilin

Spot

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
33	20.5	10.16	gi 255072973	Micromonas sp. RCC299	ribosomal protein L21
34	16.9	7.85	Q9MBF3_CITUN	Citrus unshiu	Glycine-rich RNA-binding protein
35	64.3	<u>6.75</u>	gi 242068905	Sorghum bicolor	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g022240.
39	12.9	7.03	Q1SCD7_MEDTR	Medicago truncatula	Hypothetical protein
59.9	5.95		ATPBM_NICPL	Nicotiana plumbaginifolia	ATP synthase subunit beta, mitochondrial

PROTEINE IDENTIFICATE CON METODO US IN FLAVEDO DI LIMONE DI AGRICOLTURA BIOLOGICA
2008

Spot	N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
	9	36.5	6.97	G3PC_PETCR	<i>Petroselinum crispum</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	10	29.3	7.23	HIS7A_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
	11	97.8	5.42	gi 116059765	<i>Ostreococcus tauri</i>	Gamma-tubulin complex
	17	40.2	9.98	RPOC2_PSEAK	<i>Pseudodoclonium akinetum</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
	22	47.5	9.05	FB228_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	F-box protein At4g10400
	23	53.4	5.90	gi 224128231	<i>Populus trichocarpa</i>	Predicted protein
	27	26.5	8.47	gi 220061235	<i>Pogostemon cablin</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit

Spot

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
28	48.5	6.23	003059_9MAGN	Peltoboykinia tellimoides	Ribulose biphosphate carboxylase large subunit (Frag.)
29	29.8	9.85	gi 125599895	Oryza sativa	hypothetical protein OsJ_23900
30	59.6	6.13	gi 186521400	A. thaliana	ATP binding / hydrogen ion transporting ATP synthase, rotational mechanism
31	59.1	6.01	ATPBM_MAIZE	Zea mays	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
32	35.2	8.68	gi 18312373	Pyrobaculum aerophilum	pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit
36	88.9	4.85	gi 255561383	Ricinus communis	GTP binding protein, putative
39	143.2	9.85	gi 38345965	Oryza sativa	OSJNBb0062B06.6

Spot

N°	PM	pI	Accession Num.	Database	Proteina
49	156.6	5.90	R1B12_SOLDE	Solanum demissum	Putative late blight resistance protein homolog R1B-12
53	74.4	5.07	Q8GX04_ARATH	Arabidopsis thaliana	Hypothetical protein At1g22882
55	24.9	11.14	Q6ZLE3_ORYSA	Oryza sativa	Hypothetical protein OJ1005_H01.13
59	31.24	5.24	gi 194698182	Zea mays	unknown

Questo lavoro è il frutto dell'interazione fra diversi Enti e persone, che assieme hanno collaborato affinché ciò si realizzasse. Primo fra tutti il laboratorio di Cito-fisiologia vegetale del Dipartimento di Ecologia dell' Università della Calabria, dove è stato possibile svolgere la gran parte della ricerca, grazie anche alle numerose apparecchiature presenti. La volontà, la partecipazione e l'impegno delle figure professionali, che in maniera differente hanno contribuito alla sua realizzazione, sono state preziosissime. La guida ed il costante supporto scientifico della Prof.ssa Silvia Mazzuca sono stati di incommensurabile valore, nonché sostanziali per la buona riuscita del lavoro di questi anni.



Il principale ringraziamento va al Consorzio di Tutela e Valorizzazione del Limone di Rocca Imperiale che, sin dall'inizio del Dottorato ha mostrato pieno interesse, nonché supporto materiale e stimoli. In particolare, un grande riconoscimento va all'instancabile lavoro svolto dal già presidente Dr. Agr. Gaetano Di Leo, per la sua forte convinzione nella necessità di valorizzazione tecnico-scientifica del limone di Rocca Imperiale. Grazie anche a tutte le aziende che hanno contribuito in vario modo, dalla fornitura dei campioni al supporto tecnico.



CONSORZIO DI TUTELA E VALORIZZAZIONE



L' anno di lavoro 2007-2008 è stato realizzato con il contributo della Regione Calabria, attraverso il finanziamento di una borsa di studio attinta dal P.O.R. CALABRIA 2000/2006.



REGIONE CALABRIA



programma
operativo
regionale

Durante il corso dell' ultimo anno di Dottorato è stato possibile attivare una collaborazione con l' università di Vigo (Spagna), dove è stato svolto uno stage di sei mesi, presso il BIOSCOPE group della Facoltà di Scienze di Orense e della Facoltà di Scienza e Tecnologia di Caparica, Lisbona, sotto la supervisione del Dr José Luis Capelo-Martinez cui va un profondo e sincero ringraziamento, come ai suoi collaboratori.

