

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA



Dipartimento di Scienze Ambientali
Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie
XX° Ciclo
2005 - 2007

**Sviluppo di metodi per l'applicazione della
Food Genomics.**

**Tracciabilità molecolare nella filiera
vitivinicola.**

Tutori:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli
Dott.ssa Caterina Agrimonti
Chiar.ma Prof.ssa Elena Maestri

Coordinatore del Dottorato:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Dottorando: Dott. Damiano Loi

INDICE

INDICE	1
INTRODUZIONE	4
1. Il settore vitivinicolo	4
1.1 Vitis vinifera	4
1.2 Il mosto	6
1.3 Composizione del mosto	7
1.3.1 Zuccheri	7
1.3.2 Acidi	7
1.3.3 Polifenoli	8
1.3.4 Sostanze azotate.....	8
1.3.5 Sostanze aromatiche	8
1.3.6 Enzimi.....	9
1.3.7 Vitamine, lipidi, alcoli, elementi minerali.....	9
1.4 I microrganismi del mosto	9
1.4.1 Lieviti	10
<i>Generalità e classificazione</i>	10
<i>Caratteristiche morfologiche e fisiologiche dei lieviti</i>	10
<i>Fattori necessari allo sviluppo dei lieviti</i>	11
<i>Successione dei vari tipi di lievito durante la fermentazione</i>	12
1.4.2 Batteri, muffe.....	13
1.5 La vinificazione	14
1.5.1 Sfecciatura del mosto	14
1.5.2 Fermentazione alcolica	14
<i>Prodotti principali della fermentazione alcolica</i>	15
<i>Tecnica della fermentazione alcolica</i>	16
1.5.3 Vinificazione con macerazione delle vinacce o “in rosso”	16
1.5.4 Vinificazione in bianco.....	17
1.5.5 Produzione di vino rosato	18
1.5.6 Altre fermentazioni.....	18
<i>Fermentazione malolattica</i>	18
<i>Fermentazione maloalcolica</i>	20
1.6 La limpidezza del vino: intorbidamenti, precipitazioni. Stabilizzazione	20
1.6.1 Precipitazioni	20
1.6.2 Intorbidamenti	20
1.6.3 Stabilizzazione.....	21
1.6.4 Prevenzione e cura dell’intorbidamento colloidale proteico e polifenolico	21
1.6.5 Prevenzione e cura dell’intorbidamento biologico.....	22
1.6.6 Risoluzione di tutti i tipi di intorbidamento	22
<i>Filtrazione</i>	22
Centrifugazione	23
1.7 Genuinità e contenuto del vino	23
2. Disciplinari di produzione, etichettatura e frodi	25
2.1 La classificazione dei vini	25
2.2 Etichettatura dei vini	26
2.3 Certificazione di Prodotto	27

2.4 Le adulterazioni	29
3. Tracciabilità e metodi di analisi nel settore vitivinicolo	30
3.1 Tracciabilità	30
3.3 Metodi di analisi	32
3.3.1 Metodi chimici.....	32
3.3.2 Metodi molecolari	34
4. Food genomics e marcatori molecolari.....	34
4.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	35
4.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	35
4.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions).....	36
4.4 STR (Short Tandem Repeat).....	36
4.5 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	37
5. Estrazione di DNA da matrici complesse	38
5.1 La degradazione del DNA	38
5.2 Presenza di inibitori	39
5.3 Marcatori molecolari più utilizzati	39
5.4 Errori ricorrenti nell'analisi di LCN DNA	39
6. Il genoma nucleare di <i>Vitis vinifera</i>.....	40
7. Il genoma cloroplastico di <i>Vitis vinifera</i>	40
8. Scopo del lavoro.....	41
Materiali e metodi.....	42
1. Materiale vegetale, vini sperimentali e commerciali	42
2. Estrazione di DNA da foglie	43
3. Estrazione di DNA da vini sperimentali e commerciali.....	43
4. Amplificazione mediante PCR	46
5. Purificazione dei prodotti di PCR e sequenziamento.....	47
6. Analisi mediante Sybr Green® Real Time PCR degli estratti.....	47
7. Analisi del DNA mediante marcatori microsatelliti.....	48
8. Ricerca di nuovi marcatori microsatelliti nucleari e cloroplastici.....	49
9. Ricerca di nuovi marcatori SNP cloroplastici	49
RISULTATI	51
1. Estrazione di DNA da foglie	51
2. Estrazione di DNA da vini sperimentali.....	52
3. Estrazione di DNA da vini commerciali	55
4. Amplificazione di DNA di lievito.....	62
4.1 PCR singola.....	62
4.2 PCR duplex	62
5. Amplificazione mediante la tecnica Sybr Green Real Time PCR	63
5.1 Amplificazione del DNA cloroplastico di <i>Vitis vinifera</i>	63
5.2 Amplificazione del DNA nucleare di <i>Vitis vinifera</i>	64
5.3 Amplificazione del DNA di lievito.....	65
5.4 Costruzione retta di taratura e quantificazione del DNA di <i>Vitis vinifera</i>	66
5.4 Valutazione dell'effetto matrice sull'amplificabilità del DNA estratto	67
6. Analisi dei marcatori microsatelliti	68
6.1 Applicazione dei microsatelliti su foglie di cultivars	68
6.2 Applicazione dei microsatelliti su vini sperimentali.....	69
6.3 Applicazione dei microsatelliti su vini commerciali.....	73
6.4 Confronto tra vini sperimentali e commerciali.....	74
7. Ricerca nuovi STR.....	75

8. Ricerca nuovi marcatori SNP cloroplastici.....	76
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	78
BIBLIOGRAFIA	81
ALLEGATI.....	85
1. Primer specifici per <i>Maturasi K</i> di <i>Vitis vinifera</i>.....	85
2. Primer specifici per <i>Rasveratrolo Sintasi</i> di <i>Vitis vinifera</i>	85
3. Primer specifici per RNA ribosomale di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
RINGRAZIAMENTI	88

INTRODUZIONE

In tutti i settori della produzione agricola è ormai diventato prioritario assicurare la qualità, la salubrità e la sicurezza dei prodotti. Per questo motivo è nata la tracciabilità alimentare ossia quell'insieme di tecnologie e di metodiche di produzione e controllo che permettono di seguire un prodotto agricolo dal campo alla tavola in ogni suo passaggio di preparazione e trasformazione. Insieme alla tracciabilità nascono nuove discipline scientifiche come la food genomics. Questa nuova disciplina permette di sfruttare le conoscenze genetico-molecolari delle piante di orticoltura per migliorare le qualità organolettiche dei prodotti alimentari e per fornire inoltre dei marcatori molecolari che possano correlare particolari qualità organolettiche con particolari tipologie di specie vegetali e fornire dei potenti strumenti per verificare la veridicità delle etichette dei prodotti alimentari.

Il settore di produzione vitivinicolo italiano è rinomato in tutto il mondo per i suoi prodotti di alta qualità e pregio e necessita quindi di usufruire di tutte le tecnologie più innovative che garantiscano la sua tutela. Ecco quindi che la tracciabilità molecolare e la food genomic possono dimostrarsi la chiave per garantire una precisa e potente metodica per garantire la veridicità delle indicazioni presenti sulle etichette dei prodotti. Recentemente è stato inoltre sequenziato l'intero patrimonio genetico di *Vitis vinifera*, permettendo così di usufruire di una infinita miniera di informazioni riguardanti sia la possibilità di migliorare geneticamente questa importante pianta da frutto sia la disponibilità di una infinita quantità di marcatori utili alla tracciabilità molecolare.

Ai fini della comprensione di quanto possa essere complicato e difficile sviluppare un progetto di tracciabilità nel settore vitivinicolo è importante comprendere la grande complessità ed eterogeneità dei prodotti che ne derivano, l'alto numero di passaggi tecnologici che vengono effettuati per la produzione del vino e conoscere la legislazione e i marchi di denominazione che proteggono i prodotti vinosi.

1. Il settore vitivinicolo

1.1 *Vitis vinifera*

Il genere *Vitis* comprende 40-60 specie in Asia, 25 nel Nord America e una sola specie Europea: *Vitis vinifera* chiamata appunto anche *europaea*. Quest'ultima è la principale specie

coltivata oggi mentre le altre specie sono usate soprattutto per le tecniche di breeding finalizzate alla resistenza alle malattie.

Vitis vinifera viene coltivata da almeno 5000 anni (Zohary, 1975) ed è quindi una delle colture più antiche utilizzate dall'uomo.

La coltivazione della vite trova la sua origine in Armenia, da qui si diffuse in Siria e poi in Grecia; i Fenici, con i loro continui scambi commerciali, contribuirono alla costante espansione di questa pianta e del vino con essa prodotto.

I Greci poi la importarono in Italia, anche se alcuni esperti affermano che furono invece gli Etruschi a portarla dall'Asia Minore, di cui erano originari.



In Italia si ritiene essersi sviluppata in Sicilia, per diffondersi poi in Lazio e Toscana, anche se filosofi, storici e scrittori come Sofocle, Marziale e Strobone non sono concordi al cento per cento.

La cultura della vite cominciò così a seguire il suo corso e ad espandersi, creando una vera e propria disciplina; da Teofrasto, che affermava che ogni 10 anni era necessario sostituire il terreno a piè della vite, a Plinio il Vecchio, che consigliava di lasciare uno sperone alla vite potata per poter avere l'anno successivo un tralcio con frutto.

È da ricordare anche l'opera dei monaci Benedettini, che con indefessa attenzione e cura seguirono la diffusione della vite dall'Agro Pontino al Reno, insegnandone la coltivazione anche alle popolazioni contadine che andavano via via incontrando.

Si stima che esistano 6000 cultivars di *Vitis vinifera* (Alleweldt e Dettweiler, 1994) e che di queste meno di 400 siano effettivamente di importanza commerciale per la produzione di vini (Galet, 2000).

Riguardo alla viticoltura italiana possiamo senza dubbio sottolineare la sua importanza a livello mondiale, dovuta soprattutto al territorio particolarmente ideale alla coltivazione della vite e alle raffinate tecniche vinicole sviluppate nel tempo permettendo quindi la produzione di vini di eccellente qualità apprezzati in tutto il mondo.

Viviamo, spesso senza rendercene conto, in un Paese che si può dire non abbia eguali; la sua posizione come latitudine ed in special modo nel Mediterraneo ne fa un territorio a clima particolarmente temperato ed idoneo ad una proficua coltivazione della vite.

Il clima italiano è fra i più adatti allo sviluppo della vite, inoltre la differente morfologia del terreno fa sì che si creino aree con differenti caratteristiche di produzione, per cui è importante per i viticoltori scegliere il vitigno più idoneo al terreno in cui va impiantato e coltivato.

I vini italiani hanno una prerogativa regionale, da cui nasce un perfetto abbinamento con la cucina di ciascuna regione di appartenenza del vino.

Gli elementi climatici fondamentali per la crescita e la produttività della vite sono la luce, il calore, l'esposizione e la giusta quantità di umidità nell'ambiente (derivante da pioggia, neve, nebbia e rugiada).

Nel contesto viticolo italiano sono più di 200 le varietà di uve da vino: alcune hanno grande diffusione, altre sono limitate a territori più ristretti. Tra i vitigni da uve bianche ricordiamo: Albana, Bombino Bianco, Catarratto, Insolia Bianca, Malvasie, Moscato, Pinots, Prosecco, Rieslings, Tocai Friulano, Trebbiani, Vernacce. Tra i vitigni da uve rosse ricordiamo invece: Aglianico, Barbera, Cabernets, Canaiolo, Cannonau, Dolcetto, Lambruschi, Marzemino, Merlot, Nebbiolo, Pinot Nero, Sangiovese.

I restanti vitigni non citati con cui vengono prodotti vini italiani sono elencati nel sito del Ministero delle Politiche Agricole all'indirizzo: <http://www.politicheagricole.it/db-scripts/VinoVite.idc>.

1.2 Il mosto

E' il prodotto derivato dall'uva che, in seguito a fermentazione, dà origine al vino. Esistono vari tipi di mosto:

- **mosto di uve:** è il prodotto liquido ottenuto naturalmente o con procedimenti fisici da uve fresche; per il mosto di uva è ammesso un titolo alcolometrico volumico (t.a.v.) effettivo pari o inferiore al 1% in volume;
- **mosto di uve parzialmente fermentato:** è introdotto proveniente dalla fermentazione del mosto avente un t.a.v. superiore al 1% in volume e inferiore a 3/5 del suo titolo alcolometrico volumico totale;
- **mosto di uve concentrato:** è ottenuto mediante disidratazione parziale del mosto di uva effettuata con qualsiasi metodo autorizzato (bassa o alta temperatura), finché la sua massa comunicata (densità) non sia inferiore a 1,240 g/mL (a 20 °C);
- **mosto di uve concentrato rettificato:** è il prodotto liquido non caramellizzato, ottenuto per disidratazione parziale del mosto (con qualsiasi metodo autorizzato escluso il fuoco diretto) e che abbia il valore al refrattometro (a 20 °C) non inferiore al 70,5%;
- **mosto muto:** è il mosto di uve fresche mutizzato con alcol avente un t.a.v. effettivo pari o superiore al 12% in volume e inferiore al 15% in volume (per aggiunta di alcol



di origine vinica), oppure reso muto anche mediante aggiunta di elevate dosi di anidride solforosa (500-1000mg/L);

- **filtrato dolce**: mosto che si ottiene per successive filtrazioni, che comportano la separazione dei lieviti e delle sostanze azotate;
- **mosto cotto**: cotto a fiamma diretta, consentito per l'elaborazione del vino Marsala.

1.3 Composizione del mosto

Ogni tipologia di vino è unica proprio perché ogni vitigno produce un mosto caratterizzato da quantità e proporzioni particolari delle sostanze che lo compongono. Questo influisce ovviamente sulle proprietà organolettiche e qualità finali di un particolare vino e sono appunto queste le caratteristiche dei vini di qualità da proteggere e tutelare.

1.3.1 Zuccheri

Glucosio e **fruttosio** sono presenti ciascuno in quantità variabile, con il vitigno, l'annata e la zona, dal 7-8 al 14-15%. Sono questi due zuccheri che fermenteranno ad opera dei lieviti originando alcol etilico e determinando così la trasformazione del mosto (o dell'uva) in vino.

Altri zuccheri presenti, ma non interessanti dal punto di vista tecnologico (in quanto non fermentano e non sono dolci), sono i **pentosi**: **arabinosio**, **xilosio** e **ramnosio**, per un quantitativo massimo del 2%; nell'uva appena colta sono presenti anche tracce di **saccarosio**, che viene rapidamente scisso dagli enzimi dell'uva in glucosio e fruttosio.

Nel mosto ritrovano anche sostanze derivate dagli zuccheri:

- le **pectine** derivate dal **galattosio**;
- le **gomme** e le **mucillagini**, derivate dai pentosi;
- la **destrana**, presente nei mosti ottenuti da uve colpite da Botrytis, che provoca seri problemi nell'illimpidimento del vino.

1.3.2 Acidi

Si trovano nel mosto in quantità variabile fra i 10 e 15 g/L in relazione al vitigno, alla zona e all'annata. Gli acidi più importanti e abbondanti del mosto sono l'**acido tartarico** (L+), l'**acido malico** (L-), l'**acido citrico**.

Nei mosti ottenuti da uve colpite da Botrytis si trovano anche in abbondanza **acido galatturonico** e **acido gluconico**.

Sono inoltre presenti:

- **acidi aromatici**: caffeico, cumarico, ferulico, ecc. per un totale di 20 mg/L;
- **acidi inorganici**: fosforico, solforico, cloridrico, ecc. per un totale di 1,5 g/L.

1.3.3 Polifenoli

Sono colloidali con carica negativa. Si tratta di un gruppo di sostanze presenti nell'uva in quantità di 1-3 g/L, che rivestono differente interesse dal punto di vista tecnologico:

- **flavonoli**;
- **antociani**;
- **procianidine e leucoantociani**;
- **tannini o catechine**;
- **rasveratrolo**.

I pigmenti sono localizzati nella buccia, ma in alcuni vitigni se ne trovano anche nella polpa.

Nel mosto i pigmenti si trovano allo stato di **glucosidi**, cioè legati a uno zucchero (glucosio in posizione 3), e in una certa percentuale sono anche **esterificati** da un acido (acetico, cumarico, caffeico).

1.3.4 Sostanze azotate

Nel mosto si trova azoto sotto le forme:

- **inorganica** (NH_3 e meno NO_3^- e NO_2^-) per un massimo di 0,4 g/L;
- **organica** (amminoacidi e proteine) per un totale di 0,5-1 g/L.

I lieviti, operatori della fermentazione alcalina, assimilano l'azoto ammoniacale assai rapidamente, dopo di che si adattano a consumare l'azoto organico (soprattutto quello amminoacidico).

Se il mosto in partenza è povero di azoto si rende necessario aggiungerlo in modo da alimentare i lieviti che devono sempre essere attivi ai fini di un buon decorso della fermentazione. L'azoto del mosto svolge dunque un'azione plastica per il lievito per un valore del 30%, mentre il restante fabbisogno è ricavato dagli zuccheri (che formano acido piruvico) e dalla lisi delle cellule lievito morte.

1.3.5 Sostanze aromatiche

Tutte le uve contengono terpeni, ma alcune (per esempio Barbera e Nebbiolo) ne contengono quantità minime, tanto da essere definite "non aromatiche" o "a gusto neutro", mentre altre (per esempio Moscato, Traminer, Brachetto) che ne contengono quantità considerevoli sono dette appunto "aromatiche".

Le sostanze aromatiche più tipiche sono il **linalolo**, prevalente nel Moscato, e il **geraniolo**, prevalente nella Malvasia.

In parte sono presenti allo stato libero e in parte glucosidati. L'aroma caratteristico del Cabernet Sauvignon è dato da **pirazine**.

1.3.6 Enzimi

Nel mosto si trova il complesso enzimatico noto come **zimasi alcolica**, l'insieme degli enzimi che intervengono durante la fermentazione alcolica:

- **enzimi pectolici (pectasi e pectinasi)**, che degradano le pectine;
- **enzimi ossidatici (polifenolossidasi o tirosinasi)**, che ossidano parzialmente i polifenoli.

Sull'uva colpita dalla *Botrytis* (muffa grigia) si trova anche la laccasi, che ossida i polifenoli con azione molto intensa, tanto che passando nel vino provocano un inscurimento rapido e intenso del colore del vino bianco.

1.3.7 Vitamine, lipidi, alcoli, elementi minerali

Nel mosto sono presenti quasi tutte le vitamine, con una certa abbondanza di vitamina A, C e PP (polifenoli). Sono fattori di crescita per i lieviti. L'**inosite** e la **sorbite** sono polialcoli presenti in minime quantità. Gli elementi più abbondanti sono **K, Ca, Mg**, e meno **Na, Mn, Fe, Cu**, ecc. Sono presenti **lipidi** di vario tipo specialmente nelle bucce.

1.4 I microrganismi del mosto

La produzione del vino dal mosto avviene ad opera dei microrganismi presenti sulle bucce dell'uva. Le caratteristiche organolettiche del mosto possono essere quindi ottimali per un buon vino, ma queste non possono prescindere dalla verifica della composizione del consorzio microbico che permette la fermentazione. Addirittura spesso è necessario avere maggiore cura proprio nella preparazione del mosto perché sia terreno fertile per i microrganismi fermentatori o si preferisce inserire ceppi di microrganismi selezionati per procedere con la fermentazione.

La produzione di un vino di qualità si ottiene quindi dal connubio inscindibile di uve di ottime qualità con un consorzio microbico appropriato alla produzione del particolare vino.

1.4.1 Lieviti

Generalità e classificazione

Sulle bucce e sui grappoli dell'uva sono presenti i microrganismi più svariati che, dopo aver svernato sulle piante e nel terreno, sono trasportati ovunque dal vento e dagli insetti.

La pruina, lo strato ceroso che ricopre gli acini d'uva, trattiene molto bene i lieviti. Alla pigiatura, 1 mL di mosto contiene 2000-100000 cellule di lievito, mentre in piena fermentazione se ne ritrovano fino a 1 milione e più per millilitro.

I lieviti sono funghi unicellulari, appartenenti alle classi ascomiceti e deuteromiceti.

Classe:	<i>Ascomyces</i>
Sottoclasse:	<i>Protoascomyces</i>
Ordine:	<i>Endomycetales</i>
Famiglia:	<i>Saccharomycetaceae</i> (possono formare spore)
Generi:	<i>Saccharomyces</i> specie: <i>cerevisiae</i> (o <i>ellipsoideus</i>), <i>rosei</i> , <i>uvarum</i> , <i>bayanus</i> (o <i>oviformis</i>), <i>chevalieri</i>
	<i>Schyzosaccharomyces pombe</i>
	<i>Hansenula</i>
	<i>Pichia</i>
	<i>Hanseniaspora</i>
	<i>Saccharomycodes</i>
Classe:	<i>Deuteromycetes</i>
Famiglia:	<i>Criptococcaceae</i>
Generi:	<i>Candida</i> specie: <i>vini</i> (o <i>mycoderma</i>)
	<i>Kloeckera</i> specie: <i>apiculata</i>
	<i>Torulopsis</i> specie: <i>stellata</i>

Caratteristiche morfologiche e fisiologiche dei lieviti

I lieviti possono essere suddivisi in sette tipi a seconda della forma, ma, per quanto attiene l'enologia, risultano interessanti solo tre categorie:

- **ellittici** (con forma di ellisse): per esempio *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1a);
- **apiculati** (con forma di limone): per esempio *Kloeckera apiculata* (Figura 1b);

- **cocchi** o torule (con forma tondeggiante): per esempio *Torulopsis stellata*.

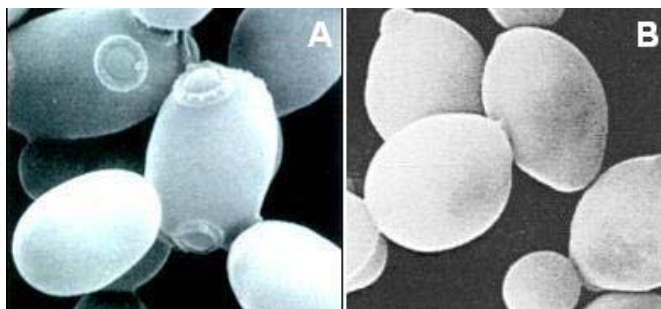


Figura 1. a) *Saccharomyces cerevisiae*. b) *Klöckera apiculata*.

A fine vendemmia, in 100 g di uva si ritrovano in media 20000 cellule ellittiche, 30000 apiculate e 50000 di altri tipi.

Fattori necessari allo sviluppo dei lieviti

Per il **nutrimento** i lieviti necessitano di:

- **carbonio**, che è utilizzato preferibilmente sotto forma di zuccheri (specialmente esosi): la maggior parte dei lieviti è glucosofila, cioè utilizza di preferenza il glucosio rispetto al fruttosio; sono utilizzabili anche gli alcoli (in particolare mannite, glicerina e, a volte, anche alcol etilico); specialmente i lieviti apiculati utilizzano, in determinate circostanze, anche gli acidi organici (per lo più malico e citrico);
- **azoto**, la cui forma più facilmente assimilabile è quella ammoniacale, seguita dalla forma amminoacidica e proteica (alcune specie possono utilizzare anche i nitrati); non tutti gli amminoacidi sono però utilizzati allo stesso modo: per esempio la prolina è utilizzata solo in aerobiosi, tanto che la si trova pressoché ancora tutta nel vino;
- **Sali minerali**, fra i quali sono particolarmente importanti quelli di fosforo, potassio, zolfo, calcio;
- **Vitamine o fattori di crescita**, non necessarie per alcune specie auxoautotrofe, che possono cioè moltiplicarsi in assenza di qualsiasi vitamina essendo in grado di sintetizzarle; ma le specie di lieviti auxoeterotrofe richiedono uno o più fattori di crescita quali le vitamine B₁, B₂, B₆, PP, biotina, acido pantotenico, acido *p*-amminobenzoico, mesoinositolo;
- **Ossigeno**, che è indispensabile per la riproduzione e la respirazione; la sua assenza arresta la crescita e la respirazione è sostituita dalla fermentazione; tuttavia all'inizio del processo fermentativo un'aerazione del mosto provoca un'attivazione della fermentazione stessa;

- **ATP o Adenosinatrifosfato**, che fornisce alla cellula lievito l'energia chimica per utilizzare le sostanze nutritive per formare sostanze specifiche proprie; l'ATP è prodotto in abbondanza tramite la respirazione e in minore quantità tramite la fermentazione; essendo quindi, a tale riguardo, poco redditizio il processo fermentativo, i lieviti devono demolire molto zucchero per ricavare abbastanza ATP quando fermentano;
- **Ambiente acido**: i lieviti fermentano meglio a pH 4 che a pH 3; tuttavia è meglio che il mosto abbia un pH basso per ostacolare lo sviluppo dei batteri; gli acidi a catena corta sono fungistatici e quindi bloccano l'attività dei lieviti;
- **Temperatura**: influenza tutta l'attività metabolica dei lieviti, condizionandone sia la velocità di fermentazione sia la capacità fermentativa. La temperatura che permette la massima velocità è di 30 °C circa, ma al di sopra di questa la fermentazione rallenta fino a essere inibita sopra ai 35 °C. Per i lieviti ellittici, alle basse temperature (15-17 °C) la fermentazione ha un decorso lento, ma con elevata produzione di alcol etilico, mentre a temperature superiori aumenta la quantità di acido acetico prodotto; i lieviti apiculati producono invece meno acido acetico a temperature superiori a 17 °C. Alle basse temperature (comunque superiori a 10-14 °C) la fermentazione esaurisce più facilmente tutto lo zucchero e permette di ottenere vini più fini. La temperatura ottimale di vinificazione per i vini rossi è di 22-30 °C, mentre per quelli bianchi è di 17-20 °C.

Nelle cantine ove si produce l'Asti spumante si constata la presenza di lieviti criofili (o psicrofili) in grado di svilupparsi a -1/-2 °C; essi appartengono alla specie *Saccharomyces uvarum* e *S. coreanus*.

L'**anidride solforosa** ha un effetto selettivo su tutti i microrganismi e anche sui diversi tipi di lieviti e, conseguentemente, assume una funzione regolatrice della fermentazione alcolica. A dosi moderate di anidride solforosa i lieviti sono stimolati nel loro metabolismo e la fermentazione risulta attivata; a dosi medie sono inibiti specialmente i lieviti apiculati, e di conseguenza si sviluppano bene i lieviti ellittici; a dosi elevate tutti i lieviti sono inibiti come lo sono (ancor più) tutti gli altri microrganismi.

Alcuni lieviti producono essi stessi anidride solforosa e acido solfidrico.

Successione dei vari tipi di lievito durante la fermentazione

I lieviti apiculati, essendo dotati di maggior velocità di moltiplicazione, sono in breve tempo prevalenti. Bastano due ore affinché sia raddoppiata per moltiplicazione la popolazione dei lieviti, che, a questo punto, prevalgono sugli altri microrganismi. Essi sono poco resistenti

all'alcol, per cui, quando si trovano in presenza del 4-5% di alcol, sono inibiti e il loro metabolismo si arresta. E' questo un tipo di selezione naturale che favorisce i lieviti ellittici i quali, a questo punto, iniziano a prendere il sopravvento e portano a termine la fermentazione, esaurendo, o quasi, tutti gli zuccheri presenti nel mosto.

Terminata la fermentazione, il lievito si deposita sul fondo del recipiente insieme all'altro materiale solido (feccia) e sarà poi separato dal vino mediante un travaso.

1.4.2 Batteri, muffe

I **batteri** (o schizomiceti) sono microrganismi unicellulari, privi di clorofilla e senza nucleo ben differenziato. Appartengono all'ordine *Eubacteriales* e comprendono molte famiglie tra le quali le più importanti sono le *Acetobacteriaceae* e le *Lactobacillaceae*.

L'ossigeno non è indispensabile ai batteri, essendo quasi tutti i batteri del vino anaerobi facoltativi, che si adattano cioè con facilità sia al metabolismo aerobico sia a quello anaerobico.

A proposito di pH i batteri preferiscono un ambiente neutro o leggermente acido; l'ambiente molto acido li inibisce. Per esempio, l'acido malico è demolito solo a pH superiore a 3, l'acido tartarico solo a pH superiore a 3,6, gli zuccheri e la glicerina a pH intermedio.

I batteri del vino possono essere divisi in due grandi categorie:

- batteri che sono in grado di demolire acido malico, zuccheri, acido citrico; sono attivi e pericolosi solo in presenza di zuccheri e a pH piuttosto alto; ne sono esempio i batteri lattici (responsabili della fermentazione malolattica, un fenomeno molte volte utile al vino), che sono a loro volta suddivisibili in *omofermentanti* (demoliscono l'acido malico, producendo quasi esclusivamente acido lattico) ed *eterofermentanti* (demoliscono l'acido malico producendo acido lattico, acido acetico, acido succinico, glicerina, etanolo, mannite, ecc.).
- batteri che sono in grado di demolire acido tartarico e glicerina; sono i batteri che possono provocare le malattie più temibili dei vini.

Il controllo dei batteri è indispensabile ai fini della prevenzione delle malattie e si esplica ponendo cura nella pulizia dei locali, dei vasi vinari e delle attrezzature; è inoltre sempre prudente l'uso oculato e pronto dell'anidride solforosa che li inibisce fortemente.

Le **muffe** sono microrganismi pluricellulari; più esattamente *eumiceti*, costituiti da filamenti, dette ife, e da micelio. Sono strettamente aerobiche e particolarmente dannose quando attaccano l'uva e quando s'insediano sui contenitori vinari. Vale la pena ricordare che in determinate regioni in cui all'epoca della maturazione dell'uva il clima è particolarmente

asciutto, la cosiddetta *muffa grigia* consuma molta acqua e molto acido tartarico e, pur consumando anche un po' di zucchero, lo concentra indirettamente e produce glicerina, acido gluconico, polialcoli, acido acetico, una sostanza antibiotica (bottricina) e altre sostanze che conferiscono graditi caratteri organolettici. Per tale motivo la muffa è detta, in questo caso, “muffa nobile” o “marciume nobile”; vi è infine da rilevare che la “muffa nobile” non raggiunge mai la fase riproduttiva e si sviluppa sull’uva già matura.

1.5 La vinificazione

La vinificazione consta di diverse fasi: dopo l'**ammostamento**, la **correzione del mosto** e l'**aggiunta di anidride solforosa** seguono la **sfecchiatura** e la **fermentazione alcolica**. A questo punto la vinificazione è avvenuta; occorrerà affinare il vino e, secondo il caso, correggerne difetti, alterazioni o carenze compositive.

La descrizione di ogni passaggio del processo di produzione del vino ci permette di realizzare quanto sia complesso e complicato il processo produttivo e quanto tali procedimenti e metodiche siano spesso legate alla tradizione e alle usanze di ogni singolo territorio di produzione. Quindi la tutela e protezione di un prodotto agricolo come il vino è importante non solo per difendere il consumatore finale ma anche l’importanza delle tradizioni e usanze tramandate da generazioni e generazioni.

1.5.1 Sfecchiatura del mosto

Questa pratica, detta anche “pulizia” o “defecazione”, consiste nell’eliminare la maggior quantità possibile di sostanze solide o pesanti, cioè la feccia del mosto. Questa è costituita dai materiali più vari: corpi e sostanze estranee (terra, prodotti anticrittogamici, ecc.) frammenti vegetali; ma anche nel migliore dei casi il mosto è torbido a causa delle sostanze colloidali dell’acino che vi stanno in sospensione. I colloidali di carica elettrica fra loro opposta tendono ad attrarsi reciprocamente (per esempio le proteine sono positive e i tannini sono negativi), formando aggregati, cioè complessi di notevole dimensione e peso che depositano facilmente insieme alle sostanze aventi densità superiore a quella del mosto.

1.5.2 Fermentazione alcolica

La trasformazione del mosto in vino consiste essenzialmente nella trasformazione degli zuccheri (glucosio e fruttosio) in alcol etilico. Questa trasformazione, che avviene ad opera dei lieviti, comporta anche lo sviluppo di calore, la produzione di anidride carbonica e di molti altri prodotti detti secondari (in quanto nel loro insieme costituiscono al massimo l’8% del totale).

L'equazione generale della fermentazione alcolica è quella indicata all'inizio del XIX secolo da Gay-Lussac:



I lieviti attaccano lo zucchero trasformandolo prima in acido piruvico (questo processo è detto glicolisi), che subisce una decarbossilazione con formazione di aldeide acetica, la quale è ridotta ad alcol etilico. I lieviti respirano bene a 22-30 °C e fermentano meglio a 30-35 °C, tuttavia per ottenere maggiore finezza nei vini bianchi la temperatura di fermentazione non deve superare i 20-22 °C.

Prodotti principali della fermentazione alcolica

Alcol etilico. E' questo il composto finale qualificante il vino e si presenta come liquido incolore, con densità 0,793 g/mL a 15 °C; il vino è quindi meno denso del mosto. L'alcol etilico conferisce al vino una sensazione bruciante e una nota dolce ed è il composto più importante ai fini di serbevolezza, robustezza e corpo del vino stesso.

L'alcol è facilmente ossidato dai batteri con formazione di acido acetico, mentre alcuni lieviti (*Candida mycoderma*) lo scindono in acqua e anidride carbonica; combinandosi con gli acidi origina esteri e con gli altri alcoli origina eteri; esteri ed eteri sono entrambi sostanze molto profumate.

Il **grado alcolico** è la percentuale in volume di alcol etilico determinata a 20 °C; quindi 1 litro di vino di 10° contiene il 10% di alcol etilico, cioè 1000 mL di vino contengono 100 mL di alcol. Il titolo alcolometrico volumico effettivo (cioè quello che si chiama anche *grado effettivo* o *svolto*) deve essere almeno il 9% nei vini da tavola.

Per i vini DOC spumanti questo valore minimo è elevato a 10%, per gli spumanti non DOC è 9,5%, per gli spumanti aromatici è 6%, per i vini frizzanti è 7%, per quelli liquorosi è 15%.

Durante l'invecchiamento del vino l'alcol può essere metabolizzato e ossidato dai batteri con produzione di acido acetico; ciò segna la morte naturale del vino e l'inizio della formazione di **aceto**.

Anidride carbonica. E' un gas molto tossico che non permette la respirazione degli organismi aerobi; è perciò molto importante che nelle cantine ci sia la possibilità di ben arieggiare, in modo da disperdere e allontanare questo gas che può essere mortale per l'uomo. La CO₂ uscendo dal mosto in fermentazione trascina con sé molti composti odorosi volatili.

Una parte dell'anidride carbonica resta disciolta nel vino, cui conferisce freschezza e vivacità, e può anche esservi addizionata perché sia dichiarato sull'etichetta se la dose supera i 2 g/L.

Calore. La quantità di calore sviluppata nella fermentazione alcolica è difficile da definire, in quanto dipende dal tipo di lievito. Comunque il calore medio è 24 kcal per ogni mole di zucchero (180 g); quindi un mosto con il 18% di zucchero, fermentando aumenta la sua temperatura iniziale di 24 °C. Praticamente però ciò non avviene, in quanto il mosto non è, e non deve essere, completamente isolato dall'esterno; anzi vi sono diverse dispersioni di calore provocate dal cantiniere mediante varie operazioni (follature, rimontaggi e se necessario mediante refrigerazione).

Tecnica della fermentazione alcolica

Appena ottenuto il mosto, è bene far avviare (entro 24-36 ore al massimo) la fermentazione alcolica; ove ciò non fosse possibile, occorre proteggere il mosto mediante solfitazione energica ed eventualmente anche refrigerazione. Una modesta solfitazione è comunque sempre opportuna per motivi precauzionali. Il recipiente di vinificazione (vinificatore o fermentino) va riempito solo per i 2/3 e, nel caso di fermentazione senza vinacce, per i 4/5; ciò è necessario perché la massa in fermentazione aumenta di volume e inoltre libera anidride carbonica. Dopo poche ore i lieviti ellittici superano l'inibizione dell'anidride solforosa e iniziano a metabolizzare lo zucchero; dapprima lo respirano, essendo il recipiente ricco in ossigeno, poi, a mano a mano che l'ossigeno è consumato, si accumula anidride carbonica e il lievito ripiega, per adattamento, alla fermentazione.

Se al mosto non è stata addizionata anidride solforosa, iniziano a fermentare i lieviti apiculati fino a produrre il 4-5% di alcol che li inibisce, per cui i lieviti ellittici prendono il sopravvento e continuano la fermentazione.

1.5.3 Vinificazione con macerazione delle vinacce o “in rosso”

Il vino rosso deriva dalla fermentazione in presenza di vinacce, vale a dire che proviene dalla macerazione delle vinacce le cedono le proprie sostanze alla fase liquida. La dissoluzione e l'estrazione di sostanze durante la macerazione deve interessare solo quelle che apportano colore, tannini, aromi e sapori utili al vino e sostanze azotate e Sali minerali utili ai lieviti.

Anche alcuni vini bianchi subiscono una breve macerazione delle vinacce (macerazione pellicolare) per 15-20 ore con lo scopo di estrarre una buona dose di sostanze aromatiche le quali, essendo caratteristiche del vitigno, conferiscono al vino maggiore tipicità (in questo caso si impiegano uve bianche).

La **dissoluzione** delle sostanze delle vinacce è provocata dallo schiacciamento cui sono sottoposte le vinacce e dall'anidride solforosa, che si combina con alcuni composti, specialmente con i polifenoli. Inoltre l'alcol dissolve facilmente le sostanze odorose e polifenoliche, e a questo contribuisce anche la temperatura elevata che si raggiunge durante la fermentazione. Con il prolungarsi della macerazione aumenta la dissoluzione.

Alla dissoluzione fa seguito la **diffusione** nella fase liquida grazie ai movimenti della massa in fermentazione e alle operazioni di disperdimento della vinaccia nella massa liquida.

In particolare la vinificazione sarà breve (3-4 giorni) per ottenere vini di consumo corrente che, dovendo essere consumati entro breve tempo, devono essere leggeri, con un certo residuo zuccherino. I vini di qualità si avvantaggiano invece di una macerazione protratta fino all'esaurimento o quasi degli zuccheri, che può durare 15-20 giorni.

1.5.4 Vinificazione in bianco

Quando il mosto viene sgrondato, cioè separato dalle parti solide prima di essere posto nel recipiente di fermentazione, si ha anche, ovviamente, assenza delle vinacce dal mosto in fermentazione e si dice che si opera la vinificazione in bianco: l'avvio del processo fermentativo è piuttosto lento, poiché la maggior parte dei lieviti è rimasta sulle bucce e sui grappi; è quindi utile ricorrere al lievito di avviamento. Inoltre il mosto, appena tolto dal torchio, deve essere immediatamente solfitato, in quanto una minima, eventuale, ossidazione è subito evidente nel vino bianco che si otterrà.

La vinificazione in bianco comporta la formazione di vino senza antociani e comunque poco colorato, poco tannico e poco corposo, poiché i polifenoli sono contenuti nelle bucce e nei vinaccioli. Evidentemente l'ammestamento (lo schiacciamento degli acini) comporta una certa fuoriuscita dei pigmenti coloranti e mentre ciò non genera problemi nel caso di uve bianche, può provocarne nel caso di uve rosse. E' necessario perciò effettuare la sgrondatura subito dopo la torchiatura e procedere immediatamente alla eliminazione delle tracce di antociani, trattando il mosto con apposito carbone decolorante.

La temperatura di fermentazione non deve superare i 20°C; temperature maggiori favoriscono la tumultuosità della fermentazione e un grande sviluppo di anidride carbonica, che trascina e allontana molte sostanze aromatiche; inoltre, alle basse temperature, i lieviti producono sostanze più fini e delicate.

E' bene vinificare separatamente il primo mosto torchiato dal mosto derivante dalle successive torchiature, specialmente nelle annate in cui l'uva risulta ammuffita; le torchiature successive alla prima forniscono un mosto molto ricco di enzimi ossidanti (derivanti dalle muffe) che provocherebbero inscurimento del colore ed eventuale intorbidamento.

1.5.5 Produzione di vino rosato

Il vino rosato si ottiene:

- da uve rosse poco macerate;
- da una mescolanza di uve bianche e rosse;
- da uve “rosate”, cioè con scarso contenuto di pigmenti coloranti.

Nel primo caso le bucce vengono lasciate poche ore (non più di 24) a macerare nel mosto in modo che venga ceduta una modesta quantità di sostanze coloranti (antociani).

Nel secondo caso si tratta di fare un uvaggio con prevalenza di uve bianche in modo che la sostanza colorante rossa non incida eccessivamente.

Nel terzo caso si parte da uve poco colorate come il Moscato, dal quale si ottiene il Moscato rosa del Trentino, oppure come il Grignolino vendemmiato a maturazione non completa.

Una recente tecnica di produzione di vino rosato consiste nel suddividere le uve rosse in due parti: la parte più abbondante è pressata direttamente e l'altra è pressata, diraspata, privata delle vinacce e mescolata al mosto precedente. Il tutto è posto a fermentare insieme; in sostanza si tratta di una vinificazione in rosso, con macerazione di una piccola parte delle vinacce.

1.5.6 Altre fermentazioni

Fermentazione malolattica

E' questa una fermentazione batterica, a carico dell'acido malico, i cui agenti sono batteri lattici che sopportano abbastanza bene l'elevata acidità, contrariamente ai batteri che provocano malattie. Sono stati isolati quasi 1000 ceppi di batteri che metabolizzano l'acido malico, che si possono suddividere come segue:

- **batteri omofermentanti**, appartenenti al genere *Lactobacillus* e *Pediococcus*, che producono quasi esclusivamente acido lattico e operano a $\text{pH} > 3,4$; è stato selezionato un ceppo di *Lactobacillus plantarum* che si presta a essere addizionato al mosto in prefermentazione;
- **batteri eterofermentanti**, appartenenti al genere *Leuconostoc*, che, oltre ad acido lattico, prodotto prevalente, producono acido acetico e succinico, glicerina, mannite, alcol etilico, acetilmetilcarbinolo, 2-3-butilenglicole.

In ogni modo l'acido lattico è di gran lunga il più abbondante fra i prodotti derivanti dall'acido malico: se ne formano 0,67 g a partire da 1 g di acido malico. Il principale risultato

della fermentazione malolattica è la diminuzione dell'acidità fissa (disacidificazione biologica) di 0,1-0,2 unità di pH; infatti, l'acido lattico è più debole dell'acido malico, si formano prodotti secondari poco o punto acidi, sono demoliti anche i malati di potassio e di calcio, per cui questi metalli si rendono liberi e salificano l'acido tartarico che, in parte, precipiterà; la diminuzione di acidità comporta una maggiore insolubilità dei Sali dell'acido tartarico, che precipitano ulteriormente.

La diminuzione (e a volte la scomparsa) dell'acido malico significa l'eliminazione del gusto aspro conferito da questo acido; inoltre l'acido lattico conferisce sapore morbido, rotondo; la diminuzione di acidità fissa modifica il colore, che diviene meno vivace. In sostanza il vino consegue stabilità biologica, maturità, completezza.

Per favorire la fermentazione malolattica occorre:

- non travasare o ritardare i travasi in modo che i batteri possano trarre gli alimenti dalla feccia, specialmente gli amminoacidi liberati dai lieviti per autolisi;
- mantenere la temperatura di cantina superiore ai 15°C (mediante stufe, diffusori di aria calda o resistenze elettriche poste nel vino); quando la fermentazione è avviata può proseguire anche a temperatura inferiore a 10°C;
- mantenere bassa l'anidride solforosa, dato che circa 30 mg/L di anidride solforosa libera sono in grado di inibire i batteri;
- ricordare che la fermentazione malolattica è inibita dall'elevata acidità (il pH inferiore a 2,9 è di per sé fattore inibente, perciò fermentano più facilmente vini poco acidi, ove è meno desiderata) quindi si potrebbe disacidificare fino a pH 3,5-4 per favorire questa fermentazione (e poi riacidificare);
- ricordare che si è rivelata utile l'aggiunta al vino nuovo di una parte del primo torchiato, in quanto questo contiene principi nutritivi utili ai batteri.

L'impiego dei batteri lattici liofilizzati (*Leuconostoc oenos*) è disciplinato dal regolamento CEE n. 822/87; per realizzare la fermentazione malolattica occorre aggiungere almeno 10⁸ cellule per mL alla fine della fermentazione alcolica (in assenza di zuccheri, che potrebbero provocare deviazioni metaboliche). I batteri immobilizzati in sfere di alginati trasformano tutto l'acido malico nel corso di 24 ore; le sfere possono essere reimpiegate fino a sette volte.

L'elevato grado alcolico (14-15°) costituisce un ostacolo ai batteri lattici, ma da solo non è in grado di inibire questa fermentazione; così pure avviene con un elevato tenore di tannini.

Fermentazione maloalcolica

Anche questa fermentazione provoca una disacidificazione. L'agente della fermentazione dell'acido malico in alcol etilico e anidride carbonica è il lievito *Schizosaccharomyces pombe*, che ha temperatura ottimale molto elevata, circa 30°C e non demolisce mai completamente l'acido malico; inoltre è poco inibito dall'anidride solforosa.

Questa disacidificazione biologica comporta una forte diminuzione di acidità fissa, tanto che il pH aumenta di 0,3-0,8 unità, per cui la disacidificazione risulta a volte eccessiva e comporta uno squilibrio fra gli acidi e i Sali che si ripercuote negativamente sia sulla conservabilità sia sui caratteri organolettici del vino.

La fermentazione in oggetto avviene raramente, in quanto i suoi agenti sono facilmente sopraffatti dai lieviti ellittici. Si fa notare che la demolizione di acido malico in alcol etilico non è una esclusiva prerogativa dello *S. pombe* benché questo lievito ne demolisca la quasi totalità, mentre gli altri lieviti ne possono demolire, al massimo, un terzo.

1.6 La limpidezza del vino: intorbidamenti, precipitazioni. Stabilizzazione

Il vino è soggetto a intorbidamenti di varia natura che devono essere prevenuti o rimossi prima dell'imbottigliamento, in modo che il consumatore possa disporre di un vino limpido. Alcuni intorbidamenti sono accompagnati da odori e sapori sgradevoli.

1.6.1 Precipitazioni

Le precipitazioni possibili sono le seguenti:

- Dovute all'acido tartarico;
- Metalliche:
 - Dovute al calcio;
 - Dovute al ferro;
 - Dovute al rame.

1.6.2 Intorbidamenti

Gli eventuali intorbidamenti si catalogano in questo modo:

- Intorbidamento enzimatico o *cassee* ossidasica o *cassee* bruna;
- Intorbidamento di natura colloidale e biologico;
- Intorbidamento proteico;
- Intorbidamento polifenolico;
- Intorbidamento biologico;

1.6.3 Stabilizzazione

Ogni particolare tipo di intorbidamento può essere risolto con precise metodiche di stabilizzazione. Le stabilizzazioni più comuni sono le seguenti:

- **Refrigerazione;**
- **Acido L tartarico;**
- **Acido tartarico racemico;**
- **Acido metatartarico;**
- **Bitartrato di potassio;**
- **Ossidazione e riduzione;**
- **Acido citrico;**
- **Ferrocianuro potassico;**
- **Fitato di calcio.**

1.6.4 Prevenzione e cura dell'intorbidamento colloidale proteico e polifenolico

Collaggio e chiarificazione. Il termine collaggio deriva dal francese collage, che significa aggiungere una sostanza di natura collosa, cioè colloidale; chiarificazione significa rendere il vino chiaro cioè limpido. I due termini sono tuttavia usati come sinonimi, poiché il collaggio ha lo scopo di chiarificare il vino. Questa pratica consiste quindi nell'immettere nel vino una sostanza colloidale di segno opposto a quella che ha causato l'intorbidamento, in modo da provocare un'attrazione elettrostatica fra i due colloidali con reciproca flocculazione e precipitazione. Le sostanze chiarificanti sono: **inorganiche** e **organiche**.

Fra le prime vi sono le seguenti:

- La **bentonite**;
- Il **caolino**;
- Il **diossido di silicio**.

Fra le sostanze chiarificanti organiche vi sono le seguenti.

- I **tannini**;
- La **gomma arabica**;
- La **colla di pesce**;
- La **caseina**;
- L'**albumina**;
- La **gelatina alimentare**;
- L'**albumina animale**;

- Il **polivinil pirrolidone**;
- L'**alginato di calcio** o di **potassio**;
- La **beta glucanasi**;
- **Surcollaggio** o **ipercollatura**.

1.6.5 Prevenzione e cura dell'intorbidamento biologico

Pastorizzazione. Per quanto riguarda l'enologia, i batteri sono distrutti a 60°C per 45 s, i lieviti a 60°C per 10 min, gli enzimi a 70°C per 2 minuti. L'effetto pastorizzante è sicuro, occorre tuttavia stare attenti ai pericoli di reinquinamento derivato dalle attrezzature e dall'atmosfera stessa della cantina. La pastorizzazione può essere effettuata in massa, a caldo (o imbottigliamento termosterile), in bottiglia.

Gli eventuali inconvenienti derivanti dalla pastorizzazione sono:

- la **denaturazione delle proteine**, che sono poi facile causa di intorbidamento; quindi la pastorizzazione va praticata su vino preventivamente stabilizzato sotto l'aspetto colloidale proteico;
- la **formazione di colloidali protettori**, per cui alla pastorizzazione si fa seguire un trattamento con bentonite e poi una filtrazione;
- l'**incipimento del colore**: l'anidride solforosa si oppone a questo inconveniente;
- la **formazione di rame colloidale**: occorre perciò poi filtrare a maglie molto strette;
- il **gusto di cotto**, specialmente nei vini dolci: l'anidride solforosa si oppone a questo inconveniente;
- la **formazione di furfuroli**, specialmente nei vini dolci e in quelli addizionati di vitamina C.

1.6.6 Risoluzione di tutti i tipi di intorbidamento

Filtrazione

E' una pratica che mira a illimpidire rapidamente il vino; tuttavia pur fornendo velocemente la limpidezza, questa non sarà stabile definitivamente. La filtrazione si rivela comunque utile per commerciare precocemente il vino e inoltre serve per preparare filtrati dolci e vini dolci (separando lieviti e sostanze azotate), per recuperare vino dalle fecce, stabilizzare biologicamente il vino, separare il deposito conseguente alla chiarificazione.

Centrifugazione

Questa operazione non separa le particelle che hanno lo stesso peso specifico del vino e, per rimediare a questa limitazione, occorre miscelare al vino un chiarificante prima di centrifugare. Questa pratica può sostituire la filtrazione nel caso dei vini giovani; è più impiegata per la pulizia del mosto che per l'illimpidimento del vino.

1.7 Genuinità e contenuto del vino

Secondo l'Istituto Superiore di Sanità i componenti del vino ritenuti più significativi al fine della valutazione della genuinità sono:

- **prolina:** minimo 100 mg/L
- **fenoli totali:** minimo 200 mg/L
- **potassio:** minimo 300 mg/L
- **magnesio:** minimo 80 mg/L
- **azoto totale:** minimo 100 mg/L
- **nitrati:** massimo 5 mg/L

Inoltre la legislatura predispone che debbano essere rispettate le seguenti caratteristiche e i sottoindicati limiti:

- **Zn:** massimo 5 mg/L, **Cu:** massimo 1 mg/L, **Pb:** massimo 0,3 mg/L, **Br inorganico:** massimo 1 mg/L, **H₃BO₃:** massimo 60 mg/L, **sorbite** (o sorbitolo): massimo 70 mg/L, **fluoro:** massimo 1 mg/L;
- **estratto secco** (detratti gli zuccheri): non meno di 14 g/L per i vini bianchi; non meno di 15 g/L per i vini rosati; non meno di 18 g/L per i vini rossi; non meno di 13 g/L per spumanti bianchi e rosati; non meno di 17 g/L per spumanti rossi; non meno di 10,5 g/L per vini aromatizzati;
- **ceneri:** non meno di 1 g/L per i vini bianchi, spumanti bianchi e rosati; non meno di 1,2 g/L per i vini rosati e spumanti aromatici; non meno di 1,5 g/L per vini rossi; non meno di 1,4 g/L per vini spumanti rossi; non meno di 0,8 g/L per i vini aromatizzati.

Introduzione

Alla fine del processo produttivo la composizione del vino può essere così riassunta (Dati del Dipartimento di Chimica e Biochimica - Università della California - Santa Cruz):

Volume Percentuale	Componente	
86%	Acqua	
12%	Alcol (etanolo)	
1%	Glicerolo	
0,4%	Acidi organici, dei quali:	
	0,2%	Acido tartarico
	0,15%	Acido lattico
	0,05%	Acido succinico
	Tracce	Acido malico e citrico
0,2%	Carboidrati (zuccheri non fermentabili)	
0,2%	Minerali, dei quali:	
	0,02%	Calcio
	0,01%	Cloro
	0,02%	Magnesio
	0,075%	Potassio
	0,05%	Fosfato
	0,005%	Acido silicico
	0,02%	Solfato
	Tracce	Alluminio, boro, zinco, ferro, molibdeno, rubidio, sodio, zinco
0,1%	Tannini e pigmenti	
0,025%	Materia azotata, di cui:	
	0,01%	Aminoacidi
	0,015%	Proteine e altro
0,045%	Acidi volatili (principalmente acido acetico)	
0,025%	Esteri (principalmente etil acetato)	
0,004%	Aldeidi (acetaldeide e vanillina)	
0,001%	Alcoli superiori (amil, isoamil, butil, isobutil, propil e metil alcol)	
Tracce	Vitamine (tiamina, riboflavina, piridossina, acido pantotenico, acido nicotinico, acido scorbico)	

(Sicheri, 1999 e 2003)

2. Disciplinari di produzione, etichettatura e frodi

Nel capitolo precedente è stato descritto il processo di produzione del vino. Di seguito vediamo le caratteristiche dei diversi tipi di vini, la loro etichettatura e le precise norme che indicano le metodologie di produzione per ciascun tipo di vino.

2.1 La classificazione dei vini

I vini sono ufficialmente divisi nelle seguenti categorie:

vini da tavola

- senz'altra indicazione;
- con indicazione geografica tipica (IGT);
- con indicazione geografica tipica e di vitigno;

vini di qualità prodotti in regione determinata (VQPRD)

- vini a denominazione di origine controllata (DOC);
- vini a denominazione di origine controllata e garantita (DOCG);

vini speciali

- mistelle;
- vini liquorosi;
- vini aromatizzati;
- vini spumanti.

Il vino da tavola posto al consumo deve possedere le seguenti caratteristiche:

- deve provenire da *Vitis vinifera* (vite europea);
- avere un t.a.v. effettivo di almeno 9° e un t.a.v. complessivo non superiore a 15°;
- deve avere un'acidità totale non inferiore a 4,5 g/L.

I VQPRD (vini di qualità prodotti in regione determinata) devono rispondere ai seguenti requisiti:

- delimitazione della zona di produzione;
- tipi di vitigno; solo varietà raccomandate e autorizzate di *Vitis vinifera*;

- pratiche colturali;
- metodi di vinificazione;
- titolo alcolometrico volumico minimo naturale;
- rendimento per ettaro;
- analisi e valutazione delle caratteristiche organolettiche;
- condizioni particolari fissate dagli stati membri;
- le caratteristiche organolettiche, il grado alcolico e l'acidità totale sono fissate da ogni singolo disciplinare di produzione. Alcune DOC comprendono più vini.

Per regione determinata s'intende l'area o il complesso di aree viticole (con delimitazione precisa) che producono vini con caratteristiche qualitative particolari.

2.2 Etichettatura dei vini

L'etichettatura dei vini sottosta a precise norme comunitarie. Sull'etichetta dei recipienti con volume nominale inferiore o uguale a 60 L, devono infatti comparire (in determinate dimensioni) alcune diciture che si distinguono in menzioni obbligatorie e menzioni facoltative.

Secondo i regolamenti CEE le indicazioni obbligatorie devono essere raggruppate in un unico *campo visivo*, quindi non è detto che debbano comparire su un'unica etichetta, ma possono essere scritte su varie etichette apposte sul recipiente o direttamente sul recipiente stesso (Figura 2).

Le menzioni obbligatorie sono di seguito riportate:

- menzione “vino da tavola”; vino da tavola con indicazione geografica, DOC o DOCG, nome del vino;
- nome o ragione sociale dell'imbottigliatore, completata da una delle seguenti indicazioni: “imbottigliatore”, “imbottigliata da” (o, se si tratta di recipienti diversi dalla bottiglia: “confezionatore” o “confezionato da”, “condizionatore” o “condizionato da”); se l'imbottigliamento è avvenuto per conto terzi: “imbottigliato per” (o “confezionato per”); “imbottigliato dal viticoltore” o “imbottigliato all'origine” o “imbottigliato dalla Cantina sociale” o “imbottigliato dai produttori riuniti”;

- comune o frazione sede dell'imbottigliatore; se l'imbottigliamento è stato effettuato in un comune diverso da quello diverso da quello corrispondente alla sede dell'imbottigliatore, deve essere indicato;
- numero di codice: n. ... R.I. (cioè Registro Imbottigliatore), con sigla della provincia;
- volume nominale del vino, in ettolitri (hL), litri (L), centilitri (cL), millilitri (mL);
- nome dello Stato (per esteso o come sigla postale, subito dopo il nome del Comune eventualmente col codice postale), in caso di esportazione;
- gradazione alcolica effettiva;
- numero del lotto a cui appartiene la bottiglia (identificato con la lettera L seguita da lettere o numeri indicanti il giorno dell'imbottigliamento);
- scritta o disegno che inviti a non disperdere il vetro nell'ambiente;
- annata di vendemmia, limitatamente per i vini DOCG, per i vini DOC il cui disciplinare di produzione lo prevede e per i vini novelli.



Figura 2. Esempio di etichetta. Fonte: www.torrechiavarvini.it

2.3 Certificazione di Prodotto

Per quanto riguarda la tracciabilità alimentare e la tutela dei prodotti agricoli già da tempo esistono diversi sistemi di certificazione che tutelano la qualità dei prodotti immessi sul mercato e provvedono quindi a garantirne la provenienza e origine.

Nell'ambito del settore agroalimentare di particolare rilievo è il sistema di certificazione dei cosiddetti marchi di origine che garantiscono la qualità di determinati prodotti alimentari:



DOP (Denominazione di Origine Protetta): denominazione attribuita per identificare un prodotto la cui produzione, trasformazione ed elaborazione hanno luogo in un'area geografica ben delimitata, in base ad un'esperienza riconosciuta e constatata e secondo un determinato processo produttivo (disciplinare di produzione).



IGP (Indicazione Geografica Protetta): viene attribuita a quei prodotti il cui legame con una specifica area geografica è rappresentato da almeno uno delle fasi della sua preparazione.



STG (Specialità Tradizionale Garantita): questa dicitura non fa riferimento ad un'origine ma ha per oggetto la valorizzazione di una composizione o di un metodo di produzione tradizionale.

Per quanto riguarda il settore vitivinicolo esistono marchi di origine specifici istituiti dalla Comunità Europea con il Regolamento 823/87:

DOC (Denominazione d'Origine Controllata): riconoscimento di qualità attribuito a vini prodotti in zone limitate di solito di piccole/medie dimensioni, recanti il loro nome geografico e rispondenti a determinati Disciplinari di Produzione. I vini protetti da questo marchio sono quindi dei prodotti rinomati e di alta qualità, le cui caratteristiche sono connesse all'ambiente naturale e ai fattori umani. Tali vini sono ammessi al consumo solo dopo accurate analisi chimiche e sensoriali.

La legislatura che regola i prodotti vinicoli aventi marchio DOC è la seguente: Regolamento CEE 1493/1999, Legge n. 164/92, D.P.R. n. 348/94 e relativi "Disciplinari di produzione".

DOCG (Denominazione d'Origine Controllata e Garantita): riconoscimento di qualità attribuito ai vini già riconosciuti DOC da almeno 5 anni, che siano ritenuti di particolare pregio, in relazione a caratteristiche qualitative intrinseche, per effetto dell'incidenza di tradizionali fattori naturali, umani e storici, e che abbiano acquisito rinomanza e valorizzazione commerciale a livello nazionale e internazionale.

Tali prodotti hanno quindi rispetto agli altri un valore aggiunto sia in termini di sicurezza che di qualità e si necessita quindi la loro tutela. Questi vini vengono sottoposti a controlli più severi, debbono essere commercializzati in recipienti di capacità inferiore a cinque litri e portare un contrassegno dello Stato che dia la garanzia dell'origine, della qualità e che consenta la numerazione delle bottiglie prodotte.

Presso il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali è insediato il "Comitato nazionale per la tutela e la valorizzazione delle denominazioni di origine e delle indicazioni geografiche tipiche dei vini". Oltre alle condizioni previste per la certificazione DOC è obbligatorio l'imbottigliamento nella zona di produzione ed altre condizioni più restrittive.

La legislatura che regola i prodotti vinicoli aventi marchio DOCG è la seguente: Regolamento CEE 1493/1999, Legge n. 164/92, D.P.R. n. 348/94 e relativi “Disciplinari di produzione”.

IGT (Indicazione Geografica Tipica): riconoscimento di qualità attribuita ai vini da tavola caratterizzati da aree di produzione generalmente ampie e con disciplinare produttivo meno restrittivo di quello dei vini DOC. Anche la delimitazione della zona di produzione è più ampia rispetto ai DOC e a volte comprendono più regioni.

La legislatura che regola i prodotti vinicoli aventi marchio IGT è la seguente: legge 164/92 , prima della quale tali vini si chiamavano ad Indicazione Geografica ed avevano riconoscimento annuale.

2.4 Le adulterazioni

Nel campo vitivinicolo il valore del prodotto finale parte da pochi euro (2-3 €) a bottiglia per arrivare a centinaia di euro (200-300 €) a bottiglia per i vini più rinomati e di particolari annate di produzione.

La tutela dei vini regionali tipici e aventi marchi di denominazione di origine non è quindi necessaria solamente per motivi di autenticità ma anche per motivi economici visto che sono all’ordine del giorno le speculazioni e le frodi in questo settore di produzione agricola in cui si ha una così ampia variazione di prezzo del prodotto finito.

Il vino è quindi uno dei prodotti alimentari maggiormente soggetti ad adulterazioni nonostante esistano normative puntuali e severe che ne tutelano l’autenticità sia attraverso il controllo documentale (registri, ecc.) sia con la determinazione di parametri chimici, sensoriali, ecc.

Le adulterazioni principali sono le seguenti:

- lo zuccheraggio: l’aggiunta di zuccheri di natura diversa da quelli presenti nell’uva (bietola, canna, mais e loro miscele);
- l’annacquamento: l’addizione illecita di acqua di natura esogena;
- **l’origine varietale;**
- **l’origine geografica.**

Queste adulterazioni sono di difficile rilevazione e prevedono quindi l’uso di strumenti e di tecniche particolarmente complesse (Lo Piparo, 2003).

3. Tracciabilità e metodi di analisi nel settore vitivinicolo

3.1 Tracciabilità

Il tema della sicurezza alimentare e degli strumenti per garantirla sono ormai da tempo al centro del dibattito sia politico sia degli operatori della filiera agroalimentare. È in questo ambiente che si parla di rintracciabilità o tracciabilità di filiera.

La rintracciabilità o tracciabilità di filiera viene definita come la capacità di ricostruire la storia e di seguire l'utilizzo di un prodotto mediante identificazioni documentate relativamente ai flussi materiali ed agli operatori di filiera (Norma UNI 10939).

È l'identificazione delle aziende che hanno contribuito alla formazione di un dato prodotto alimentare, basata sul monitoraggio dei flussi materiali dal produttore della materia prima al consumatore finale.

Inoltre, con il termine di **tracciabilità** si intende il processo informativo che segue il prodotto da monte a valle della filiera produttiva; mentre per **rintracciabilità** si intende il processo inverso che permette di risalire da valle a monte le informazioni distribuite lungo la filiera.

In base alle definizioni sopra citate, il controllo della filiera diventa credibile solo se tracciabile, in pratica documentabile ed esteso a tutta la filiera produttiva, quindi l'elemento indispensabile della filiera è l'insieme delle aziende che contribuiscono alla realizzazione del prodotto.

Ai fini della tracciabilità è fondamentale sia individuare l'origine geografica o il luogo di trasformazione e/o confezionamento del prodotto sia il nome delle aziende che hanno partecipato alla produzione e che ne sono direttamente responsabili.

La tracciabilità deve essere riferita ad ogni singola porzione di prodotto, e deve consentire di risalire ad ogni azienda che ha avuto un ruolo nella formazione di tale porzione.

Esistono due diversi tipi di tracciabilità definiti **rintracciabilità cogente** e **rintracciabilità volontaria**.

La **rintracciabilità cogente**, detta anche rintracciabilità interna, sarà obbligatoria dal 2005 così come previsto dal Reg. CEE 178/2002 il quale prescrive che tutti gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono essere in grado di individuare la provenienza di tutti gli elementi utilizzati in un determinato processo produttivo e la relativa destinazione del prodotto finito. A tal fine tali operatori devono adottare sistemi e procedure che consentano di mettere a disposizione delle autorità competenti le informazioni inerenti tutta la filiera.

Per quanto concerne la **rintracciabilità volontaria** detta anche rintracciabilità interna o tracciabilità di filiera non esiste una normativa cogente, ma solo un richiamo nella legge

d'orientamento (Dec. Lgs 228/2001) riguardante la promozione da parte dello Stato dei sistemi di rintracciabilità. Essenzialmente la rintracciabilità volontaria si basa sulla norma di riferimento UNI 10939: 2001, che definisce i principi e specifica i requisiti per adottare un sistema di tracciabilità in cui si possa documentare la storia del prodotto e individuare le relative responsabilità.

I benefici derivanti dall'adozione di un sistema di rintracciabilità sono molteplici e riguardano sia i consumatori e sia le imprese. Tali benefici possono essere sintetizzati nel seguente modo:

Rintracciabilità cogente

- Benefici per i consumatori:
 - protezione della sicurezza alimentare attraverso il ritiro dei prodotti in caso di emergenza;
 - protezione della salute pubblica tramite il ritiro delle produzioni alimentari dalla vendita;
 - prevenzione delle frodi;
 - controllo delle malattie trasmissibili dagli animali;
 - controllo della salute degli animali.

- Benefici per le imprese:
 - adeguamento alla legislazione;
 - capacità di adottare azioni rapide per ritirare dal commercio prodotti pericolosi e salvaguardare l'immagine aziendale;
 - riduzione dei costi per un eventuale ritiro di prodotti dal commercio.

Rintracciabilità di filiera o volontaria

- Benefici per i consumatori:
 - aumento delle garanzie sulla identificazione di determinati ingredienti presenti nei vari prodotti alimentari.
 - permette una vasta scelta tra alimenti prodotti in zone e con modalità diverse;
 - disponibilità immediata delle informazioni riguardanti la filiera e semplificazione dei controlli.

- Benefici per le imprese:

- possibilità di differenziarsi sul mercato;
- possibilità di garantire la veridicità delle informazioni;
- diminuzione dei costi dell'organizzazione interna della filiera;
- riduzione delle informazioni da registrare poiché presenti nel sistema informativo di filiera;
- agevola la scelta dei fornitori e il monitoraggio dei clienti.

3.3 Metodi di analisi

In letteratura si ritrovano diversi esempi di metodologie chimiche e molecolari utili a rilevare le adulterazioni dei prodotti vinicoli.

3.3.1 Metodi chimici

Uno dei metodi chimici che ha avuto maggiori risultati nella prevenzione di frodi ed adulterazioni è senz'altro il frazionamento isotopico.

I metodi isotopici sono stati messi a punto a partire dall'inizio degli anni '80 da un gruppo di ricercatori dell'Università di Nantes, tra cui Gerard Martin, e hanno avuto una grande applicazione in tutti i campi della ricerca alimentare, farmaceutica e pure enologica (Martin, 1999). Il loro grande sviluppo è legato anche all'introduzione di apparecchiature sempre più sofisticate e alla quasi totale mancanza di metodiche analitiche alternative.

In enologia tali metodi vengono impiegati per la rilevazione di annacquamento e zuccheraggio (Martinelli, 2003).

Per quanto riguarda queste due diffuse sofisticazioni, i controlli, prima dell'avvento dei metodi isotopici, erano abbastanza inefficaci; il saccarosio, addizionato ai mosti, si idrolizza infatti rapidamente in glucosio e fruttosio, indistinguibili da quelli naturalmente presenti nell'uva e non modifica il valore del rapporto glucosio/fruttosio del mosto. L'unico modo di rivelare la frode era un tempestivo campionamento con addizione di soda per evitare l'inversione del saccarosio.

Negli anni '70 si erano messi a punto alcuni metodi per cromatografia su strato sottile per la ricerca dei trimeri, i cosiddetti chetosi, formati nell'idrolisi rapida del saccarosio, oppure la ricerca dell'inositolo nei Mosti Concentrati Rettificati (M.C.R.), ma senza ottenere risultati di grande rilievo.

L'aggiunta di acqua non sempre veniva individuata con certezza, poiché, pur alterando i valori dei principali parametri chimico fisici del vino, essi generalmente non risultavano

inferiori ai limiti di legge. Anche la ricerca dei nitrati, presenti nelle acque del rubinetto, non dava la certezza dell'avvenuto annacquamento.

Quindi l'introduzione dei metodi isotopici ha fornito un potente strumento per la ricerca delle sofisticazioni, soprattutto perché non è necessario effettuare il controllo a monte della produzione, ma è possibile effettuarlo sul prodotto finito, anche dopo anni.

Nel corso degli anni sono diventati ufficiali i seguenti metodi di analisi:

- “Rivelazione dell'aumento del titolo alcolometrico volumico naturale dei mosti di uve, nei mosti di uve concentrati e nei mosti di uve concentrati rettificati e dei vini, mediante la Risonanza Magnetica Nucleare del Deuterio” che permette di determinare l'addizione fraudolenta di saccarosio nei mosti e nei vini: Reg. CEE 2676/90 che determina i metodi comunitari di analisi da utilizzare nel settore del vino.
- Determinazione del rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ relativo all'alcol di fermentazione in mosti, MC, MCR e da vini tramite spettrometro di massa per la determinazione dei rapporti di isotopi stabili (IRMS) riportata nel DM 16 febbraio 1993: “Integrazione dei metodi ufficiali di analisi per i mosti i vini, gli agri di vino (aceti) e per i sottoprodotti della vinificazione” che permette di identificare addizioni fraudolente di miscele di saccarosio di bietola e canna. La determinazione della frode dello zuccheraggio è possibile poiché i cicli del carbonio delle piante di vite e delle piante di bietola o canna sono differenti e l'aggiunta di zucchero estraneo determina un aumento del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.
- Determinazione del rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ dell'acqua contenuta nei vini riportato nel Reg. CEE 822/97 della commissione del 6 maggio 1997, recante modifica del regolamento (CEE) 2676/90 che determina i metodi di analisi comunitari da utilizzare nel settore del vino, che permette di valutare l'annacquamento di un prodotto.

La rilevazione dell'annacquamento è possibile poiché l'acqua esterna aggiunta al vino ha una quantità in ^{18}O minore dell'acqua presente nel vino.

Inoltre tramite il frazionamento isotopico è possibile stabilire la zona di provenienza di un vino e quindi rilevare le sofisticazioni riguardanti l'origine geografica dei vini.

I metodi isotopici possono essere utili per controllare la tracciabilità territoriale nella filiera vinicola ma i dati presenti oggi in letteratura (Angerosa, 1999; Ogrinc, 2001) indicano che tale tecnica necessita di un significativo miglioramento che può essere ottenuto con l'acquisizione di nuovi dati e anche mediante l'integrazione di questa tecnica con altre metodologie (ad esempio analisi genomiche).

Altri metodi di analisi chimica sono basati sull'analisi dei profili fenolici (Revilla et al., 2001), dei profili aminoacidici (Vasconcellos et al., 1989), degli elementi in tracce, dei terpeni ed altri composti aromatici (Munoz-Organero et al., 1997).

Queste metodologie di tipo chimico richiedono sofisticati e costosi strumenti analitici e non sempre i parametri biochimici sono costanti nel tempo e nel campione in quanto influenzabili da differenti fattori ambientali.

3.3.2 Metodi molecolari

Le analisi di tipo biochimico-molecolare che hanno come oggetto di studio le proteine ed acidi nucleici potrebbero quindi essere maggiormente affidabili rispetto ad analisi chimiche che hanno come oggetto di studio i parametri biochimici.

Uno dei metodi che ha avuto maggiormente successo è l'analisi tramite elettroforesi non denaturante in gel di poliacrilammide (native-PAGE) dell'estratto proteico totale di mosti d'uva (Moreno-Arribas et al., 1999). Purtroppo anche questa metodologia è affetta da un grande difetto: i risultati sono influenzati dalla variabilità dei fattori ambientali.

Un altro interessante metodo di analisi proteomica si sviluppa accoppiando la spettroscopia di massa alla nano HPLC (Kwon, 2004).

L'analisi molecolare che invece ha come oggetto di studio il DNA contenuto nel campione in analisi è invece più affidabile visto che il genoma di un individuo è un parametro invariante al contrario dei parametri chimici e biochimici che sono influenzati da fattori biotici e abiotici.

Risultati estremamente incoraggianti derivano quindi dall'utilizzo di marcatori molecolari basati sull'analisi del DNA in particolar modo quelli che sfruttano la tecnologia della PCR quali: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) (This et al., 1997), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Cervera et al., 1998) e Simple Sequence Repeats (SSR) (Siret et al., 2002).

Questi marcatori sono stati utilizzati con successo nell'analisi di succhi di uva (Faria et al., 2000), mosti, mosti in fermentazione e vini sperimentali ottenuti mediante processo di vinificazione in laboratorio (Siret et al., 2000).

4. Food genomics e marcatori molecolari

Per food genomics si intende l'applicazione degli studi sul genoma degli organismi da cui si ricavano le materie prime per stabilire l'autenticità degli alimenti. Gli sviluppi delle

metodologie molecolari hanno consentito di individuare differenze nel DNA di individui appartenenti a popolazioni, specie o generi diversi che consentono la loro identificazione o classificazione. Tali sequenze identificative sono dette “marcatori molecolari”. Analizzando i residui di DNA presenti nell’alimento finito è possibile risalire all’organismo che ha fornito la materia prima e stabilire la conformità con quanto dichiarato dal produttore. In letteratura esistono quindi diversi esempi di applicazione dei marcatori molecolari alla tracciabilità nel settore vitivinicolo.

L’esperienza accumulata nei nostri laboratori riguardo all’applicazione dei marcatori molecolari nella food genomics e nella tracciabilità nell’ambito di diversi progetti di ricerca internazionali ci ha permesso di entrare nella tracciabilità del settore vitivinicolo senza esitazione.

I marcatori conosciuti e utilizzabili nel campo della tracciabilità sono diversi e presentano caratteristiche diverse.

4.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

I marcatori RAPD sono stati ideati da Welsh et al. (1990) e sono realizzati utilizzando oligonucleotidi random aventi una lunghezza di circa 10 basi. Tali oligonucleotidi vengono impiegati come primers per una reazione di PCR random in cui il profilo degli ampliconi risultanti dipende dai polimorfismi presenti nel DNA genomico analizzato. Questi marcatori sono semplici da usare poiché non richiedono informazioni di sequenza preliminari. Recentemente tali marcatori sono stati anche utilizzati per la discriminazione di una banca di germoplasma d’olivo (Belaj, Trujillo 2000). Nonostante queste buone caratteristiche l’uso di questo tipo di marcatori è stato abbandonato soprattutto nel campo della tracciabilità, poiché la metodologia è di tipo random, i risultati dipendono quindi dalle condizioni di reazione, dall’operatore e dal sistema di analisi e sono quindi poco riproducibili.

4.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

I marcatori AFLP possono essere considerati simili ai RAPD poiché non necessitano informazioni di sequenza preliminari ma hanno un maggior contenuto informativo, cioè consentono di evidenziare un maggior numero di differenze.

Prevedono un primo step di restrizione del DNA seguito dalla ligazione di oligonucleotidi adattatori e dalla successiva analisi mediante reazioni di PCR selettiva e preselettiva. I primers utilizzati per l’amplificazione sono al 5’ specifici per gli adattatori impiegati mentre al 3’ presentano una o due basi casuali che permettono quindi di selezionare e ridurre il numero di frammenti risultanti dall’analisi di restrizione. Tale tecnica è stata utilizzata per la

prima volta nel 1995 da Vos et al. e permette di ottenere dei risultati meglio analizzabili rispetto ai RAPD utilizzando di fatto questa tecnica in combinazione con la tecnica chiamata RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Deve essere comunque utilizzata particolare attenzione durante ogni singolo passaggio della tecnica poiché è anch'essa un'analisi di tipo random ed estremamente influenzata dalle condizioni di reazione, dall'operatore e dal metodo di analisi dei risultati. Anche in questo caso è possibile effettuare un'analisi automatizzata utilizzando l'elettroforesi capillare.

I marcatori AFLP sono stati già utilizzati nel campo della tracciabilità dell'olio d'oliva (Pafundo et al., 2005; Busconi et al., 2003) e hanno dimostrato la loro applicabilità a matrici alimentari in cui il DNA risulta altamente degradato.

4.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

Tali marcatori sono solitamente ricavati da analisi molecolari effettuate mediante RAPDs o AFLPs. Sono costituiti da sequenze di DNA univoche per un singolo individuo o per un gruppo di individui all'interno di una popolazione più ampia. Vengono scoperti individuando durante le analisi AFLP o SCAR dei frammenti caratteristici. Considerando la bassa riproducibilità delle 2 tecniche descritte precedentemente spesso queste vengono considerate utili soprattutto per la ricerca dei marcatori SCAR che risultano essere dei marcatori robusti, a singolo locus e codominanti. Il loro primo utilizzo è stato riscontrato in un lavoro di ricerca in cui è stata caratterizzata una specifica sequenza dimostratasi essere un marcatore indiretto di resistenza ad infezioni fungine in *Oryza sativa* (Navqi et al., 1996).

Nel campo della tracciabilità alimentare troviamo nuovamente l'utilizzo di questo marcatore nell'analisi molecolare dell'olio d'oliva (Pafundo et al., 2007, Busconi et al., 2003).

4.4 STR (Short Tandem Repeat)

Questi marcatori sono il risultato dell'amplificazione mediante PCR di sequenze formate da ripetizioni in tandem di motivi mono-, di-, tri-, tetra- o pentanucleotidici che nella maggior parte dei casi sono: $(A)_n$, $(TC)_n$ e $(GATA)_n$. Queste ripetizioni possono essere di diversi tipi in base alla loro composizione (Thomas et al. 1994). Di conseguenza possiamo trovare microsatelliti composti da ripetizioni perfette $(GA)_{22}$, ripetizioni imperfette $(CAG)_5(CAC)_2(CAG)_7$ o ripetizioni composte $(GTAT)_2(GT)_5$. I microsatelliti sono estremamente interessanti non solo per la loro distribuzione lungo tutto il genoma ma anche per il loro altissimo grado di polimorfismo che corrisponde alla variazione del numero di ripetizioni dei motivi all'interno di diversi individui della stessa specie. Mentre una sequenza di microsatellite non è specifica per un dato locus, le sequenze fiancheggianti lo sono. Quindi

una coppia di specifici primers in queste regioni fiancheggianti amplificheranno quel singolo microsatellite, il cui polimorfismo può essere rilevato mediante elettroforesi capillare.

La tecnica della PCR può essere utilizzata per rilevarli singolarmente, fornendo quindi marcatori locus specifici codominanti e altamente polimorfici. Capita sovente di osservare loci caratterizzati da più di 10 alleli e aventi un'eterozigosità superiore al 60%.

L'alto grado di polimorfismo ottenuto da marcatori SSR è il risultato di alti tassi di mutazione dell'ordine di 10^{-3} - 10^{-5} ed è dovuto a particolari meccanismi di mutazione come lo slippage della polimerasi o crossing-over ineguale durante la meiosi. Sono stati proposti diversi modelli di evoluzione dei microsatelliti per lo studio della loro ereditarietà.

La scoperta dei microsatelliti è piuttosto lunga e difficoltosa in quanto è necessario eseguire lo screening delle librerie genomiche degli organismi d'interesse utilizzando sonde specifiche per il motivo ripetuto da ricercare. In seguito è necessario sequenziare i cloni selezionati mediante Southern Blot per costruire i primer corrispondenti alle regioni fiancheggianti il microsatellite.

Oggi sono disponibili centinaia di microsatelliti di *Vitis vinifera* che sono stati individuati proprio mediante questo screening di librerie genomiche. Ora che tutto il genoma di vite è stato sequenziato è possibile scoprire facilmente nuovi SSR e localizzare nel genoma tutti i microsatelliti finora scoperti con la metodologia classica. Nel campo della food genomics tali marcatori sono già stati sperimentati nella tracciabilità di altri settori di produzione agricola come ad esempio nel settore oleario (Breton et al., 2004; Doveri et al., 2006).

4.5 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Gli SNPs sono mutazioni che avvengono naturalmente e che hanno effetto su di un singolo nucleotide. Essi costituiscono la stragrande maggioranza di tutti i polimorfismi di sequenza nella parte eucromatica di quasi tutti i genomi e sono classificati a seconda della natura del nucleotide coinvolto. Gli SNP non codificanti possono trovarsi nelle regioni non trascritte in 5' o in 3' (NTR), nelle regioni non tradotte in 5' o in 3' (UTR), in un introne, oppure tra un gene ed un altro (SNP intergenici) mentre gli SNP codificanti possono essere polimorfismi di sostituzione (cioè che cambiano l'aminoacido codificato), oppure polimorfismi sinonimi.

I polimorfismi di non sostituzione comprendono polimorfismi sinonimi e non codificanti, molti dei quali possono comunque influenzare le funzioni del gene attraverso effetti sulla regolazione trascrizionale e traduzionale, sullo splicing o sulla stabilità dell'RNA.

Un'altra possibile classificazione degli SNP è in transizioni o trasversioni. Le transizioni trasformano una purina in un'altra purina, o una pirimidina in un'altra pirimidina (es. A⇒G,

C⇒T e viceversa). Le trasversioni invece trasformano una purina in una pirimidina e viceversa A o G ⇒C o T. In pratica le transizioni tendono ad avvenire con una frequenza maggiore (2/3) per via dei diversi meccanismi di riparazione evoluti dai sistemi biologici, e dalle frequenze di deaminazione della 5-metilcitosina (Holliday and Grigg 1993). In più a causa della natura del codice genetico è meno probabile che le transizioni modifichino gli aminoacidi rispetto alle trasversioni; di conseguenza le transizioni sono mantenute nelle regioni codificanti con una probabilità maggiore.

Per quanto riguarda applicazioni in analisi di diversità genetica, gli SNP offrono il vantaggio del loro elevato numero e della possibilità di automatizzare il processo di genotipizzazione. Gli SNP possono altresì venire usati per sviluppare test diagnostici di identificazione varietale dato che hanno il vantaggio di prestarsi in vari modi alla tecnica di PCR. Un altro vantaggio risiede nel fatto che per l'esame degli SNP sono sufficienti frammenti di DNA di limitata lunghezza, come quelli che spesso si ritrovano nei prodotti alimentari altamente trasformati (Consolandi et al., 2007).

5. Estrazione di DNA da matrici complesse

5.1 La degradazione del DNA

La difficoltà principale da affrontare nella tracciabilità molecolare consiste nell'estrarre il DNA da matrici complesse quali sono tutti i cibi e le bevande che necessitano di diversi passaggi di trasformazione delle materie prime. Il DNA è una macromolecola biologica abbastanza resistente rispetto ad altre macromolecole quali ad esempio le proteine.

Durante i processi tecnologici di processamento delle materie prime la temperatura ed il pH sono i principali fattori che influenzano la stabilità del DNA. La struttura primaria del DNA viene modificata a causa delle reazioni chimiche di idrolisi e ossidazione che possono portare alla rottura del filamento. Uno dei processi che porta alla degradazione del DNA è senz'altro la pastorizzazione: alte temperature anche per brevi periodi di tempo determinano la rottura del filamento di DNA.

Un altro fattore importante è il valore del pH. Alimenti acidi, come ad esempio il vino e tutti quegli alimenti che prevedono un passaggio di fermentazione, presentano quindi un'elevata degradazione del DNA a causa della catalisi acida. Tale reazione porta alla depurinazione del DNA che è una delle principali reazioni che portano alla rottura del filamento. Inoltre l'accoppiamento di alte temperature e bassi valori di pH è stato dimostrato essere la principale causa della degradazione degli acidi nucleici nella lavorazione dei cibi (Bauer et al., 2003).

5.2 Presenza di inibitori

Nel caso della tracciabilità di vino e olio di oliva è necessario fare estrema attenzione a purificare gli acidi nucleici eliminando la presenza di inibitori delle reazioni di successiva analisi del DNA. Polifenoli e altre molecole presenti nei prodotti di origine vegetale contaminano inevitabilmente il DNA purificato e spesso le rese dei metodi di estrazione utilizzati sono basse proprio perché si cerca di eliminare queste piccole molecole a scapito della quantità di DNA purificato.

5.3 Marcatori molecolari più utilizzati

La degradazione del DNA durante i processi tecnologici porta quindi alla frammentazione degli acidi nucleici. E' quindi necessario utilizzare particolari marcatori molecolari che permettono di analizzare piccoli frammenti di DNA. I più adatti a questo scopo sono senz'altro gli SSR e gli SNP. Nel campo della biologia forense sono proprio i marcatori più utilizzati perché permettono di analizzare i profili genetici anche in condizioni di DNA degradato e a basso numero di copie. Le tecniche recentemente introdotte a questo scopo sono il minisequenziamento per la genotipizzazione di SNP e i mini-STR per la genotipizzazione di SSR su corti frammenti di DNA.

5.4 Errori ricorrenti nell'analisi di LCN DNA

In condizioni di Low Copy Number DNA sono riscontrabili 3 tipi di errori durante l'analisi con microsatelliti:

1. Allelic Dropout

Solo uno dei due alleli viene rilevato (Falsa Omozigosi) a causa del bassissimo numero di molecole presenti nel campione. E' un errore stocastico: solo un allele su due viene prelevato dall'estratto e quindi rilevato dalla PCR.

2. Artefatti della PCR

Stutter Bands: errore prodotto dallo slittamento della Polimerasi che determina la presenza di picchi corrispondenti ad alleli minori fantasma rispetto all'allele reale.

Shadow Bands: bande fantasma causate dalla ricombinazione dei singoli filamenti in modo erraneo durante la PCR. Fenomeno rilevato soprattutto nelle amplificazioni di sequenze ripetute utilizzando un alto numero di cicli di PCR.

3. Contaminazioni

Errore facilmente evitabile inserendo il controllo dei bianchi di estrazione (Butler, 2005).

6. Il genoma nucleare di *Vitis vinifera*

Il consorzio italo-francese per il sequenziamento del genoma di *Vitis vinifera* ha completato la sua opera recentemente. Questo evento sarà estremamente importante sia per il miglioramento genetico delle piante che per la caratterizzazione dei profili genetici delle diverse cultivar anche ai fini della tracciabilità molecolare. La Food Genomics ha proprio come fine ultimo l'utilizzo delle informazioni genetico-molecolari al fine di migliorare le caratteristiche di qualità, sicurezza ed affidabilità dei prodotti agroalimentare. Anche nel settore vitivinicolo questo è possibile grazie alle numerose informazioni sul genoma di vite che si stanno accumulando in questi anni.

Vitis vinifera è un organismo diploide avente un corredo cromosomico aploide composto da 19 cromosomi (French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, 2007).

7. Il genoma cloroplastico di *Vitis vinifera*

Dei microsatelliti costituiti da ripetizioni mononucleotidiche sono stati riscontrati anche nel genoma del cloroplasto di *Vitis vinifera* (Arroyo-Garcia et al., 2002). Il genoma di cloroplasto di vite è costituito da DNA a doppia elica con struttura circolare ed è presente in un alto numero di copie in un singolo cloroplasto. Unito al fatto che in una cellula vegetale sono presenti un alto numero di cloroplasti, un singolo gene/sequenza di basi è presente perciò in un numero di copie molto elevato in ogni singola cellula.

Il genoma cloroplastico di vite segrega con modalità uniparentale, una forma estrema di eredità non mendeliana, che comporta la generazione di cellule con un solo tipo di genoma cloroplastico derivato da parte materna. Perciò all'interno di una singola cultivar di vite vi può essere un solo tipo di genoma cloroplastico con caratteristiche genetiche sempre uguali; però nello stesso modo, fra cultivar diverse si può notare una certa differenza. Questa caratteristica associata al numero elevato di copie di corte sequenze ripetute di DNA cloroplastico può essere estremamente utile per determinare se un determinato vino è stato ottenuto da una precisa cultivar di *Vitis vinifera*. In questa esperienza sono stati utilizzati due tipi di microsatelliti cloroplastici: **CCMP5** e **CCMP10** (Arroyo-Garcia et al., 2002) (Jansen et al., 2006).

8. Scopo del lavoro

Lo scopo principale di questo lavoro di ricerca è fornire delle metodiche di estrazione del DNA e delle tecniche di analisi molecolare applicabili alla tracciabilità del settore vitivinicolo. I target iniziali di questa ricerca saranno vini prodotti tramite microvinificazione, il cui contenuto è garantito dal produttore. Su questi vini si testeranno le diverse metodiche di estrazione e diversi marcatori SSR per verificare quali siano i più adatti allo scopo. In seguito a questo lavoro di discovery si procederà a testare la funzionalità dei marcatori anche su vini commerciali il cui contenuto è dichiarato dall'etichetta. Dopo aver messo a punto il sistema i primi oggetti di analisi saranno i vini commerciali DOC e DOCG il cui disciplinare di produzione ammette l'utilizzo di uve di un solo tipo di cultivar. Tali vini sono tra i più pregiati e costosi e solo in Italia sono un centinaio tra cui ricordiamo il Brunello di Montalcino, il Barbera d'Alba, il Brachetto, alcuni Cabernet Franc e Sauvignon. In seguito allo sviluppo di nuovi marcatori molecolari applicabili in analisi quantitative (SNPs analizzati tramite Real Time PCR) sarà possibile analizzare anche quei vini il cui disciplinare di produzione prevede miscele di cultivar diverse e verificare quindi che le proporzioni tra cultivar rispettino le regole legislative.

Un'altra applicazione di questa ricerca potrà consistere nella possibilità di tracciare la presenza di microrganismi fermentanti e non all'interno del mosto in fermentazione dopo aver sviluppato appropriati marcatori molecolari dei microrganismi di interesse enologico. In questo modo, oltre alle analisi chimiche che vengono svolte durante la fermentazione, sarà possibile tracciare e seguire in tempo reale la composizione del consorzio microbico della fermentazione ed eventualmente apportare correzioni.

MATERIALI E METODI

1. Materiale vegetale, vini sperimentali e commerciali

Il materiale vegetale (**Tabella 1**) e i vini sperimentali (**Tabella 2**) utilizzati in questo lavoro sono stati forniti da ISVEA (Istituto per lo Sviluppo Viticolo Enologico ed Agroindustriale, Poggibonsi, Siena). I vini monovarietali sperimentali sono stati prodotti seguendo i metodi standard utilizzati dalle aziende vitivinicole. Il processo di chiarificazione è stato eseguito utilizzando gelatina per i vini rossi e bentonite per i vini bianchi. Il processo di filtrazione è stato invece eseguito su una membrana da 1 micron per i vini rossi e 0,45 micron per i vini bianchi.

Nome	Codice	Nome	Codice
Pinot Bianco	9	Cabernet Sauvignon	49
Chardonnay	10	Cabernet Franc	50
Malvasia Candia	18	Merlot AR51	51
Trebbiano Toscano	28	Pinot Nero	56
Dolcetto	38	Sangiovese Brunello	59
Malvasia Nera	46	Sagrantino	213

Tabella 1. Elenco delle varietà di *Vitis vinifera* le cui foglie sono state analizzate nel lavoro.

Nome	Tipo	Colore	Annata	Alcol	Produttore	Cultivar
Pinot Bianco	Sper	Bianco	2005	n.d.	ISVEA	100% Pinot Bianco
Trebbiano Toscano	Sper	Bianco	2005	n.d.	ISVEA	100% Trebbiano Toscano
Chardonnay	Sper	Bianco	2005	n.d.	ISVEA	100% Chardonnay
Sangiovese Brunello	Sper	Rosso	2005	n.d.	ISVEA	100% Sangiovese Brunello
Sagrantino	Sper	Rosso	2005	n.d.	ISVEA	100% Sagrantino
Dolcetto	Sper	Rosso	2005	n.d.	ISVEA	100% Dolcetto
Cabernet Franc	Sper	Rosso	2005	n.d.	ISVEA	100% Cabernet Franc
Cabernet Sauvignon	Sper	Rosso	2005	n.d.	ISVEA	100% Cabernet Sauvignon
Capsula Viola	Comm	Bianco	2005	11,5%	Marchesi Antinori	60% Trebbiano, 40% Chardonnay, Pinot Bianco and others
Barbera d'Alba	Comm	Rosso	2001	12,5%	La Fiammenga	100% Barbera
Pinot Nero	Comm	Rosso	2004	12,5%	Mezzacorona	100% Pinot Nero
Pinot Bianco	Comm	Bianco	2005	11,5%	Il Greto	100% Pinot Bianco

Tabella 2. Vini sperimentali e commerciali analizzati.

Le foglie sono state conservate a -20 °C mentre i vini sperimentali sono stati conservati a 4°C al buio fino all'estrazione del DNA. I vini commerciali (**Tabella 2**) sono stati acquistati in negozi della grande distribuzione e conservati al buio fino all'estrazione del DNA.

2. Estrazione di DNA da foglie

Il DNA genomico è stato estratto dalle foglie utilizzando il metodo descritto da Lodhi et al. (1994). La concentrazione del DNA estratto è stata determinata su gel di agarosio 1% in buffer TAE (40mM Tris Acetato, 1mM EDTA), tramite comparazione con il marcatore DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), colorato con bromuro d'etidid e visualizzato mediante luce UV utilizzando il software Quantity One™ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

3. Estrazione di DNA da vini sperimentali e commerciali

Il DNA è stato estratto dai vini utilizzando quattro differenti metodi: **(i)** il metodo descritto da Siret et al. (2000) con modifiche; **(ii)** il metodo descritto da Lodhi et al. (1994) con modifiche; **(iii)** e **(iv)** Kit Nucleospin® Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany) utilizzando diversi volumi di reagenti.

Le estrazioni di DNA dai vini sperimentali sono state condotte utilizzando il solo metodo **(i)** mentre le estrazioni di DNA dai vini commerciali con i metodi elencati, come descritto nella **Tabella 3**. Tutti i metodi sono stati applicati anche su acqua distillata come controllo negativo di estrazione (bianco di estrazione).

Nome	Tipo	Metodi di estrazione			
		(i)	(ii)	(iii)	(iv)
Capsula Viola	Comm	x	x	x	x
Barbera d'Alba	Comm	x	x	x	x
Pinot Nero	Comm	x	-	x	-
Pinot Bianco	Comm	x	-	x	-

Tabella 3. Metodi di estrazione applicati ai diversi vini commerciali.

Nel **metodo (i)** modificato da Siret et al. (2000) l'estrazione del DNA è stata effettuata su 40 mL di vino. Per separare le parti solide (pellet) dalla soluzione acquosa (surnatante) il vino è stato centrifugato a 8000g per 60 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato trasferito in un nuovo

tubo mentre il pellet è stato conservato a -20°C fino all'utilizzo. Un volume di isopropanolo freddo (-20°C) è stato aggiunto ai surnatante in presenza di sodio acetato 0.3M e il campione è stato incubato overnight a -20°C per precipitare gli acidi nucleici. Il DNA è stato precipitato mediante centrifugazione a 8000g per 30 minuti a 4°C . Gli acidi nucleici ottenuti dal pellet e dal surnatante dei vini sono stati risospesi in 4 mL di TEX buffer (1M Tris-HCl, pH 8, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 3% CTAB, and 1% β -mercaptoetanol). In seguito a omogeneizzazione mediante vortex, i tubi sono stati incubati a 65°C per 60 minuti sotto costante agitazione. Un volume di cloroformio/alcol isoamilico (24:1) è stato aggiunto ai campioni che sono stati mescolati mediante inversione 20-25 volte fino a formare un'emulsione.

Dopo una centrifugazione a 8000g per 10 minuti a temperatura ambiente, la fase acquosa superiore è stata trasferita in un nuovo tubo, è stato aggiunto 1/10 di volume di CTAB 10% ed è stata eseguita una seconda estrazione cloroformio/alcol isoamilico. 2 volumi di etanolo freddo (-20°C) sono stati aggiunti ai campioni che sono stati miscelati invertendo i tubi 2-4 volte e incubati a -20°C overnight. Il DNA è stato poi precipitato mediante centrifugazione a 8000g per 30 minuti a 4°C e risospeso in 200 μl di buffer TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA). In seguito sono stati aggiunti 5 ng di Proteinasi K (Roche Applied Science) e i campioni sono stati incubati sotto costante agitazione a 48°C , per 30 minuti. Dopo un'estrazione fenolo/cloroformio (25:25) e un'estrazione cloroformio/alcol isoamilico (24:1), i surnatanti sono stati trasferiti in nuovi tubi e 5 ng di RNasi sono stati aggiunti ai campioni che sono stati incubati sotto costante agitazione a 37°C per 30 minuti. Quindi il DNA è stato precipitato con 2 volumi di etanolo freddo (-20°C) in presenza di ammonio acetato 2.5M. Dopo la centrifugazione a 14000g per 30 minuti a 4°C , i surnatanti sono stati scartati e i pellet sono stati lavati con etanolo 70% freddo (-20°C). I tubi sono stati centrifugati a 14000g per 10 minuti a 4°C e i surnatanti sono stati scartati. Dopo un secondo passaggio di lavaggio, i pellet sono stati asciugati a temperatura ambiente e risospesi in 50 μl di acqua bidistillata. Il DNA estratto dai vini sperimentali con il metodo (i) è stato quindi processato con il Kit Nucleospin® Plant per pulire il DNA dagli inibitori. In questo caso i pellet ottenuti dopo l'ultima precipitazione sono stati risospesi in 100 μl di acqua bidistillata.

Un volume di 100 μl di buffer C4 e 65 μl di etanolo sono stati aggiunti ai tubi e, dopo omogeneizzazione tramite inversione, i campioni sono stati caricati in una colonnina Nucleospin® Plant e processati secondo il protocollo del kit Nucleospin® Plant. Infine sono stati raccolti 50 μl di soluzione di DNA.

Il **metodo** di estrazione (**ii**), modificato da Lodhi et al. (1994), è stato effettuato su 6 mL di vino. Per separare le parti solide (pellet) dalla soluzione acquosa (surnatante), il vino è stato centrifugato a 8000g per 40 minuti a 4°C. I surnatanti e i pellet sono stati miscelati con 6 mL di buffer di estrazione (20 mM Sodio EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 0,2% β-mercaptoetanol) e rispettivamente 100 e 50 mg di polivinilpolipirrolidone (PVPP). Dopo omogeneizzazione, invertendo i tubi 2-4 volte, i campioni sono stati incubati a 60°C per 30 minuti sotto costante agitazione.

L'estrazione è stata in seguito eseguita su 6 mL di surnatante e su tutto il volume del pellet. Un volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1) è stato aggiunto a tutti i campioni che sono stati miscelati invertendo i tubi 20-25 volte. In seguito ad una centrifugazione a 8000g per 10 minuti a temperatura ambiente, la fase acquosa superiore è stata trasferita in un nuovo tubo, quindi è stata eseguita una seconda estrazione cloroformio/ottanolo. In seguito sono stati aggiunti mezzo volume di NaCl 5M e un volume di etanolo 95% freddo (-20°C) e, dopo aver invertito i tubi 2-4 volte, le soluzioni sono state incubate a -20°C overnight.

Dopo una centrifugazione a 8000g per 30 minuti a 4°C i surnatanti sono stati scartati e i pellet formati sono stati lavati con etanolo 70% freddo (-20°C). I tubi sono stati centrifugati a 8000g per 10 minuti a 4°C e i surnatanti sono stati scartati. Dopo un secondo passaggio di lavaggio i pellet sono stati asciugati a temperatura ambiente e risospesi in 50 µl di acqua bidistillata.

Le estrazioni con i **metodi** (**iii**) e (**iv**) sono state eseguite su 1,5 mL di vino. Il vino è stato centrifugato a 14000g per 30 minuti a 4°C per separare le parti solide (pellet) dalla soluzione acquosa (surnatante). Il pellet e il surnatante sono stati incubati a 37°C per 15 minuti per evaporare parte di etanolo e di acqua. In seguito sono stati aggiunti ai surnatanti e ai pellet 500 µl di buffer C1 per il **metodo** (**iii**) e 500 µl e 800 µl di buffer C1 rispettivamente ai surnatanti e ai pellet per il **metodo** (**iv**).

In seguito a omogeneizzazione mediante vortex, i tubi sono stati incubati per 30 minuti a 60°C sotto costante agitazione. Dopo centrifugazione a 14000g per 10 minuti a temperatura ambiente, nel **metodo** (**iii**) 400 µl di soluzione sono stati trasferiti in nuovi tubi con 400 µl di buffer C4 e 250 µl di etanolo mentre nel **metodo** (**iv**) 800 µl di soluzione sono stati trasferiti in nuovi tubi con 800 µl di buffer C4 e 500 µl di etanolo. In seguito a omogeneizzazione invertendo i tubi 2-4 volte, i campioni sono stati caricati in una colonnina di Nucleospin® Plant e trattati secondo il protocollo del kit Nucleospin® Plant. Quindi un volume finale di 50 µl è stato raccolto dal pellet e dal surnatante. La concentrazione di DNA di tutti i campioni è stato valutato mediante analisi spettrofotometrica con lo spettrofotometro Beckman DU® 640 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) mentre la qualità è stata stimata tramite elettroforesi

su gel di agarosio 0,8% in buffer 1X TAE (40mM Tris Acetato, 1mM EDTA), colorato con bromuro d'etidio e visualizzato mediante luce UV.

4. Amplificazione mediante PCR

Le reazioni di PCR sono state realizzate in stanze dedicate e utilizzando puntali con filtro per evitare contaminazioni. Inoltre per ogni reazione di PCR sono stati realizzati controlli negativi.

Per verificare la presenza di **DNA cloroplastico** di *Vitis vinifera* sono stati disegnati i primer WmtF (5'-CGTTGGCTAAAGCGAGATT-3') e WmtR (5'-CCAAAGTTCGAGCACAAGA-3') sul gene cloroplastico di *Vitis vinifera Maturasi K* (numero di accessione AJ429274). La taglia attesa dei prodotti di PCR è 201 bp.

Per verificare la presenza di **DNA nucleare** sono stati disegnati altri primer RsSyF (5'-GCCATTGCAGGAACTTAC-3') e RsSyR (5'-GCCTGAGTCAAACATTTCTC-3') disegnati sul gene nucleare di *Vitis vinifera Resveratrol Synthase* (numero di accessione DQ459352). La taglia attesa dei prodotti di PCR è di 101 bp.

Per verificare la presenza di DNA di **lievito** sono stati disegnati i primer selettivi per la famiglia dei Saccaromiceti LiF (5'-ACTGCTTACAATACCCCGTTG-3') e LiR (5'-GCAATGTCATTTTGC GTGG-3') sul gene dell'*RNA ribosomale 5S* (numero di accessione DQ130086). La taglia attesa dei prodotti di PCR è di 71 bp.

Per ottimizzare le quantità di reagenti in uso abbiamo inoltre eseguito il controllo di estrazione di DNA cloroplastico di *Vitis* e di DNA di lievito in duplex.

Ogni coppia di primer è stata disegnata utilizzando il programma on line Primer 3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25 µl partendo da 5 µl di soluzione di DNA, in presenza di buffer di PCR 1x (50mM Tris-HCl, 10mM KCl, 5mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,3), 2,5mM MgCl₂, 0,2mM di ogni dNTP, 0,2µM di primer forward e reverse, 0,1 µg/µl BSA (Roche Applied Science), 1U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science).

Le amplificazioni sono state realizzate in un termociclatore TC-512 (Techne, Duxford, Cambridge, UK) nelle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti; 35 cicli a 95°C per 1 minuto, la corrispondente T_a per 1 minuto, 72°C per 1 minuto e 30 secondi; 72°C per 8 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,8% in buffer TAE 1X (40mM Tris Acetato, 1mM EDTA), colorati con bromuro d'etidio e visualizzati mediante luce UV.

5. Purificazione dei prodotti di PCR e sequenziamento

Diversi prodotto di PCR sono stati isolati e sequenziati per testare la loro identità con le sequenze attese. Le reazioni di PCR sono state purificate con il Kit GFXTM PCR DNA and Band Purification (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) e sequenziate con il Kit CEQTM DTCS Quick Start (Beckman-Coulter). Le reazioni di sequenziamento sono state realizzate in un termociclatore Robocycler® (Stratagene, La Jolla, CA, USA) secondo il seguente profilo termico: 40 cicli a 96°C per 40 secondi, 50°C per 40 secondi, 60°C per 40 minuti. I prodotti del sequenziamento sono stati caricati e analizzati utilizzando il sequenziatore (Beckman-Coulter).

6. Analisi mediante Sybr Green® Real Time PCR degli estratti

Per ottenere una migliore sensibilità nell'analisi degli estratti ci siamo avvalsi della tecnica della Sybr Green® Real Time PCR, relativamente economica se paragonata agli ottimi risultati che si possono ottenere. Con questa metodica sono stati analizzati gli stessi target di controllo utilizzati nella PCR classica già descritta prima. L'obiettivo era quindi quello di verificare la presenza di DNA nucleare e cloroplastico di *Vitis vinifera* e l'eventuale presenza di residui di DNA di microrganismi.

Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 50 µl partendo da 5 µl di soluzione di DNA, in presenza di 1x mix Platinum Sybr Green® Real Time PCR 1x (Invitrogen), 0,2µM di primer forward e reverse, 0,1 µg/µl BSA (Roche Applied Science).

Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando uno strumento ABI7000 (Applied Biosystems) seguendo il seguente profilo termico: 95°C per 2 minuti; 50 cicli a 95°C per 15 secondi, la corrispondente T_a per 30 secondi, 72°C per 30 secondi. In seguito alla amplificazione è stata eseguita un'analisi delle temperature di melting degli ampliconi ottenuti in modo da verificare che il plot di amplificazione ottenuto derivasse effettivamente dall'amplicone atteso.

Inoltre la tecnica della Real Time è stata utilizzata anche per quantificare il DNA estratto da vini sia sperimentali che commerciali e per studiare l'effetto matrice nell'analisi dei marcatori

molecolari su estratti da vini. La retta di taratura è stata realizzata un range di quantità di DNA molto ampio da 10^3 ng a 10^{-7} ng. Per studiare l'effetto matrice sono state aggiunte quantità di DNA note ad un vino da estrarre eseguendo diluizioni seriali 1:2 partendo da una concentrazione di DNA di 1 $\mu\text{g/mL}$ e arrivando ad una concentrazione finale di 0,125 $\mu\text{g/mL}$.

7. Analisi del DNA mediante marcatori microsatelliti

I microsatelliti utilizzati per la genotipizzazione di 12 cultivar, 6 vini sperimentali e 2 vini commerciali sono stati scelti seguendo le informazioni già presenti in letteratura. 6 SSR nucleari (This et al., 2004) e 2 SSR cloroplastici (Arroyo-Garcia et al., 2002) (Tabella 4) sono quindi stati utilizzati per determinare l'identità del contenuto dei vini sperimentali rispetto alle corrispettive cultivars e per verificare l'applicabilità dei marcatori molecolari a vini commerciali. Abbiamo utilizzato anche marcatori cloroplastici perché risulta dalla letteratura (Arroyo-Garcia et al., 2002) che il genoma cloroplastico di vite sia in condizioni di omoplasma e quindi possiamo ottenere risultati univoci dai marcatori molecolari utilizzati nella determinazione del profilo genetico di un individuo senza rischiare di trovare dati discordanti o situazioni in cui un unico individuo presentasse diversi alleli per uno stesso locus.

SSR	Primer F	Primer R	T _a (°C)	Localization
VVS2	5'-CAGCCCGTAAATGTATCCATC-3'	5'-AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG-3'	50	Chrom 11
VVMD5	5'-CTAGAGCTACGCCAATCCAA-3'	5'-TATACCAAAAATCATATTCCTAAA-3'	55	Chrom 16
VVIC05	5'-AAGCAAGTTGAAGAACGTGTAAGTC-3'	5'-GGCGAAGAATCTTACTGAGAATTG-3'	50	-
VVMD7	5'-AGAGTTGCGGAGAACAGGAT-3'	5'-CGAACCTTCACACGCTTGAT-3'	55	Chrom 7
VVMD27	5'-GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT-3'	5'-ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT-3'	50	Chrom 5
VrZAG62	5'-GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC-3'	5'-CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC-3'	60	Chrom 7
CCMP5	5'-TGTTCGAATATCTTCTGTGATTT-3'	5'-AGGTTCATCGGAACAATTAT-3'	55	Chloroplast
CCMP10	5'-TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA-3'	5'-TTCGTCGDCGTAGTAAATAG-3'	52	Chloroplast

Tabella 4. Microsatelliti utilizzati per l'analisi, sequenze, T_a, localizzazione nel genoma di vite.

Ogni DNA di cultivar è stato analizzato in triplo per ogni locus così come ognuna delle tre estrazioni da vini sperimentali e commerciali. Ciò significa che per ogni vino analizzato sono state eseguite 9 genotipizzazioni per ogni locus senza considerare l'analisi dei bianchi di estrazione eseguite per verificare l'assenza di contaminazioni accidentali.

I primer forward dei microsatelliti sono stati marcati con il fluoroforo Cy5 per la rilevazione fluorimetrica. Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25 μl partendo da 5 μl di soluzione di DNA estratto da vino o 50 ng di DNA estratto da foglie, in presenza di buffer di PCR 1x (50mM Tris-HCl, 10mM KCl, 5mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,3), 2,5mM MgCl₂,

0,2mM di ogni dNTP, 0,2 μ M di primer forward e reverse, 0,1 μ g/ μ l BSA (Roche Applied Science), 1U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science).

Le amplificazioni sono state realizzate in un termociclatore TC-512 (Techne, Duxford, Cambridge, UK) nelle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti; 35 cicli a 95°C per 1 minuto, la corrispondente T_a per 1 minuto, 72°C per 1 minuto e 30 secondi; 72°C per 8 minuti.

Le T_a dei primers per ogni microsatellite sono descritte nella Tabella 4. La separazione dei frammenti degli SSR è stata eseguita mediante elettroforesi capillare nel sequenziatore CEQTM 2000 TM (Beckman-Coulter). Ogni campione è stato preparato utilizzando 0,5 μ l di reazione di PCR per i microsatelliti nucleari e 0,5 μ l di una diluizione 10x della reazione di PCR per i microsatelliti cloroplastici, 0,2 μ l di CEQTM DNA Size Standard 400 (Beckman-Coulter) in un volume finale di 30 μ l di formamide. Le corse di PCR sono state realizzate nelle seguenti condizioni: temperatura del capillare 50°C, denaturazione a 90°C per 120 sec, iniezione a 2 kV per 30 sec, separazione a 6 kV per 50 min.

8. Ricerca di nuovi marcatori microsatelliti nucleari e cloroplastici

Poiché il genoma nucleare di vite è stato completamente sequenziato è possibile eseguire la ricerca di nuovi microsatelliti in silico utilizzando le sequenze BAC disponibili in banca dati. I Bacterial Artificial Chromosome (BAC) sono dei cromosomi artificiali in cui vengono clonate grosse regioni genomiche (fino a 120 kb). Questi costrutti sono molto utili per sequenziare libraries di interi genomi per poi ricostruire il genoma di partenza ricostruendolo utilizzando le informazioni dei tratti contigui tra un clone ed un altro. Utilizzando il programma disponibile in rete chiamato Sputnik (<http://cbi.labri.u-bordeaux.fr/outils/Pise/sputnik.html>) sono stati analizzati 10 Mbp del genoma di vite per ricercare nuovi marcatori SSR con ripetizioni di tipo di-, tri-, tetra- e penta-nucleotidiche. Tale ricerca è stata eseguita anche sull'intero genoma cloroplastico.

9. Ricerca di nuovi marcatori SNP cloroplastici

Per ricercare nuovi marcatori cloroplastici abbiamo spostato la nostra attenzione su marcatori SNP considerando che sono conosciuti già diversi polimorfismi di singolo nucleotide all'interno del genoma cloroplastico (Jansen et al., 2006).

Abbiamo quindi investigato se ci fossero degli individui all'interno della nostra popolazione che presentassero tali SNPs, in particolare sui geni *atpI* e *psbA*.

Utilizzando il programma Primer 3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), sono stati disegnati primer fiancheggianti gli SNP putativi: *atpI* Forward (5'-

AGCTTTACTCACATCAGTGGCCTA-3'), atpI Reverse (5'-
 TCCAAGGAACATGACAGGTATAGGA-3'), psbA Forward (5'-
 GTAGCTTGTTACATGGGTCGTGA-3') e psbA Reverse (5'-
 AGTACCAGAGATTCCTAGAGGCA-3') utilizzando la sequenza totale del genoma
 cloroplastico (numero di accessione DQ424856).

Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25 µl partendo da 50 ng di DNA di foglia, in presenza di buffer di PCR 1x (50mM Tris-HCl, 10mM KCl, 5mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3), 2,5mM MgCl₂, 0,2mM di ogni dNTP, 0,2µM di primer forward e reverse, 0,1 µg/µl BSA (Roche Applied Science), 1U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science).

Le amplificazioni sono state realizzate in un termociclatore TC-512 (Techne, Duxford, Cambridge, UK) nelle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti; 35 cicli a 95°C per 1 minuto, la corrispondente T_a per 1 minuto, 72°C per 1 minuto e 30 secondi; 72°C per 8 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,8% in buffer TAE 1X (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA), colorati con bromuro d'etidio e visualizzati mediante luce UV.

Le amplificazioni positive sono state poi purificate con il Kit GFXTM PCR DNA and Band Purification (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) e sequenziate con il Kit CEQTM DTCS Quick Start (Beckman-Coulter) per verificare la presenza degli SNPs presunti. Le reazioni di sequenziamento sono state realizzate in un termociclatore Robocycler® (Stratagene, La Jolla, CA, USA) secondo il seguente profilo termico: 40 cicli a 96°C per 40 secondi, 50°C per 40 secondi, 60°C per 40 minuti. I prodotti del sequenziamento sono stati caricati e analizzati utilizzando il sequenziatore (Beckman-Coulter).

RISULTATI

1. Estrazione di DNA da foglie

Il metodo di estrazione utilizzato per le foglie di *Vitis vinifera* si è dimostrato altamente affidabile nonostante le foglie presentino un'alta concentrazione di inibitori e polifenoli. Il DNA genomico estratto è stato quantificato mediante visualizzazione su gel di agarosio (Figura 3) e confronto con marker di peso molecolare utilizzando il sistema Gel Doc. Per accertarci della assenza di inibitori è stata eseguita un'analisi spettrofotometrica degli estratti (Figura 4) che ci ha permesso di verificare la capacità del metodo di estrazione di eseguire un'ottima purificazione di acidi nucleici con un rapporto A_{260}/A_{280} sempre superiore a 1,6.

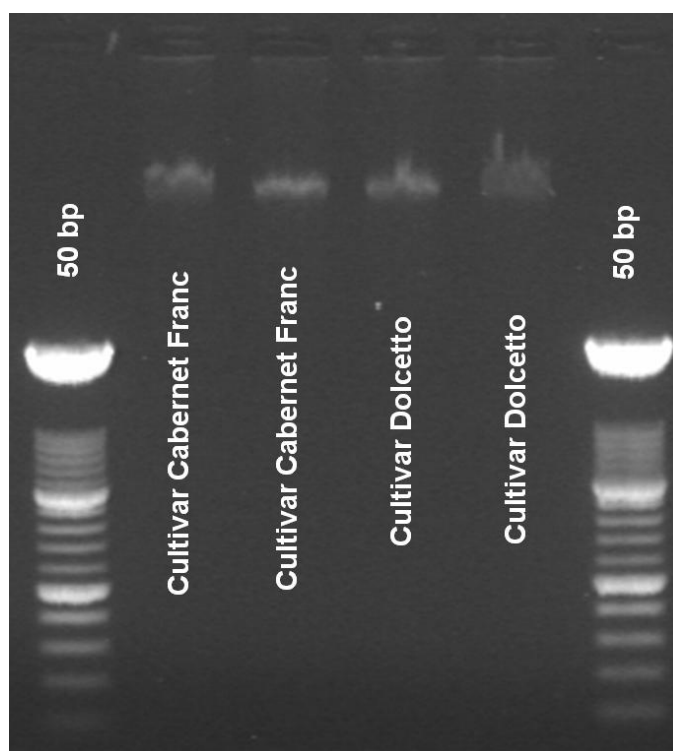


Figura 3. Elettroforesi su gel di agarosio (0,8% p/v) degli estratti da foglie di cultivar. E' presente in ogni estratto il DNA genomico non degradato.

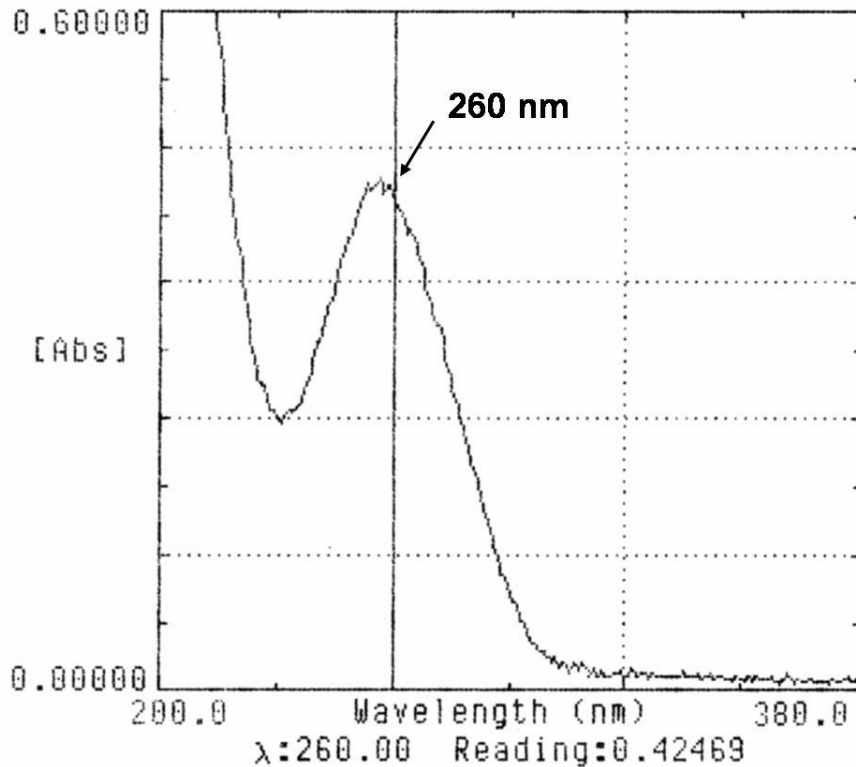


Figura 4. Spettro di assorbimento del DNA purificato da foglia di cultivar Cabernet Franc. Il picco degli acidi nucleici a 260 nm ha un segnale buono e un rapporto con l'assorbanza delle proteine a 280 nm di 1,6.

2. Estrazione di DNA da vini sperimentali

I vini sperimentali sono stati processati utilizzando il metodo di estrazione (i) descritto nei materiali e metodi modificato da Siret et al. (2000).

Siret et al. hanno dimostrato la possibilità di estrarre DNA da mosti fermentati mentre invece i nostri vini analizzati sono stati chiarificati, filtrati, imbottigliati e invecchiati per 12 mesi. Nonostante questi vini vengano catalogati quindi come sperimentali (il cui contenuto è garantito da produttore), hanno subito ogni processo di trasformazione previsto per la produzione di vini in commercio.

L'analisi spettrofotometrica eseguita sugli estratti da Sangiovese Brunello e Sagrantino dimostra che il DNA è presente negli estratti ottenuti partendo dai pellet di centrifugazione. Gli spettri rivelano l'assorbanza a 260 nm tipica degli acidi nucleici con un rapporto A_{260}/A_{280} maggiore di 1,6, indice quindi di una buona purificazione (Figura 5a).

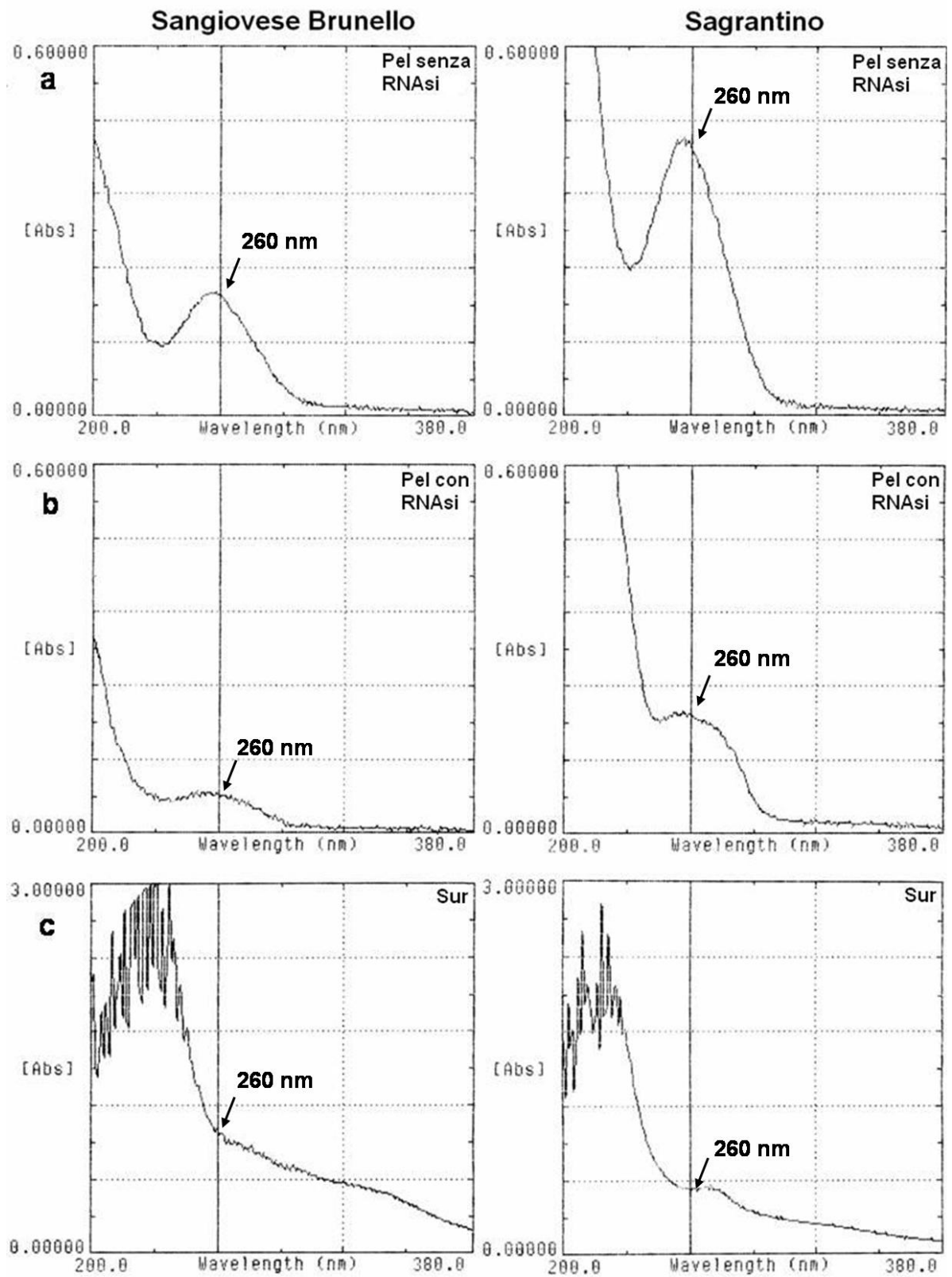


Figura 5. Analisi spettrofotometrica sugli estratti da pellet (a), pellet trattato con RNase (b) e surnatante (c) di vini sperimentali Sangiovese Brunello e Sagrantino. Negli estratti da pellet si evidenzia sempre la presenza di RNA che viene eliminato in seguito a trattamento con RNasi. Nei surnatanti sono presenti grossi quantità di contaminanti e inibitori.

La concentrazione calcolata utilizzando la legge di Lambert-Beer è in media 500 ng/μL. Questo valore diminuisce dopo il trattamento con RNAsi indicando che anche una certa quantità di DNA è presente negli estratti (Figura 5b). Gli spettri del DNA estratto dai supernatanti degli stessi vini non dimostrano una quantità di DNA rilevabile: il picco a 260 nm è infatti assente (Figura 5c).

L'elettroforesi su gel degli estratti da pellet mostra un'alta quantità di RNA degradato mentre non c'è traccia di acidi nucleici negli estratti dai surnatanti (Figura 6).

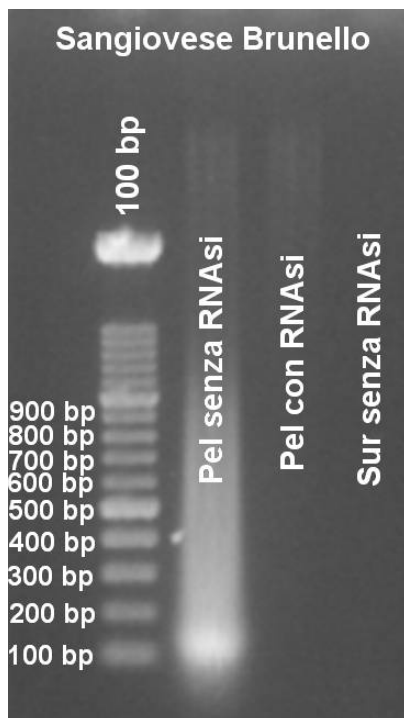


Figura 6. Elettroforesi su gel di agarosio (0,8% p/v) degli estratti da vino sperimentale Sangiovese Brunello. Vengono confermati i dati degli spettri di assorbimento della Figura 5.

Per testare l'amplificabilità del DNA di *Vitis vinifera* presente negli estratti, è stata utilizzata la reazione di PCR sul DNA ottenuto dai pellet e dai surnatanti utilizzando i primers specifici per il gene cloroplastico della *Maturasi K* di *Vitis vinifera*. Per eliminare eventuali contaminanti che possono inibire le reazioni di amplificazione è stata eseguita un'ulteriore purificazione con il Kit Nucleospin® Plant.

Le amplificazioni sono state quindi eseguite in 3 tempi: prima del processamento con il kit Nucleospin Plant e in seguito a una prima e a una seconda eluizione della Spin Column con 50 μl di acqua sterile deionizzata. Come mostrato in Figura 7 l'amplicone di PCR atteso è

stato ritrovato sia negli estratti da pellet che da surnatante ma l'intensità della banda è risultata maggiore nel caso dell'estrazione da pellet. In generale non ci sono stati miglioramenti significativi utilizzando questa ulteriore purificazione; inoltre è da riportare che dopo la seconda eluizione del DNA estratto da surnatante l'intensità della banda è risultata essere minore. Quindi considerando i costi aggiuntivi di questa procedura, per estrarre DNA da vini sperimentali è stato utilizzato il metodo (i) senza questa purificazione aggiuntiva.

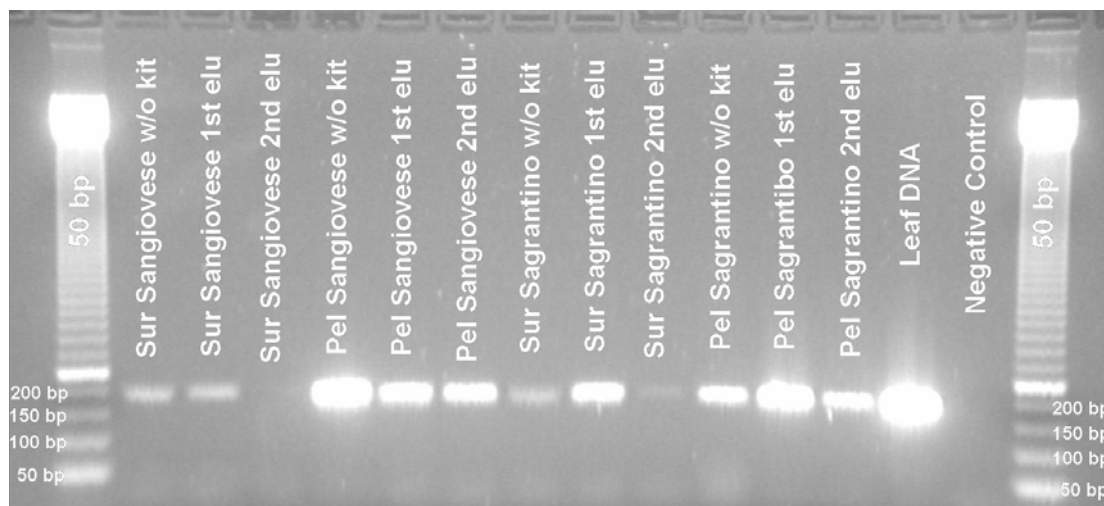


Figura 7. Amplificazione del DNA estratto dai vini sperimentali Sangiovese Brunello e Sagrantino estratto con il metodo (i) con e senza la purificazione con il Kit Nucleospin Plant. In Figura è rappresentata l'elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v) delle PCR applicate ai campioni. I risultati ottenuti dalla purificazione aggiuntiva con Spin Column non sono tali da giustificare i costi aggiuntivi di questa aggiunta.

3. Estrazione di DNA da vini commerciali

Le estrazioni di DNA dai vini commerciali Barbera d'Alba (rosso) e Capsula Viola (bianco) sono state eseguite con i 4 metodi descritti nella sezione Materiali e Metodi per individuare il metodo di estrazione che meglio si adatta ai vini commerciali. Ogni estrazione è stata eseguita in quadruplo per permettere la trattazione statistica dell'analisi.

Diversi estratti sono stati analizzati mediante spettrofotometro e elettroforesi su gel di agarosio ma in entrambi i casi non è stato ottenuto alcun risultato positivo (Figura 8).

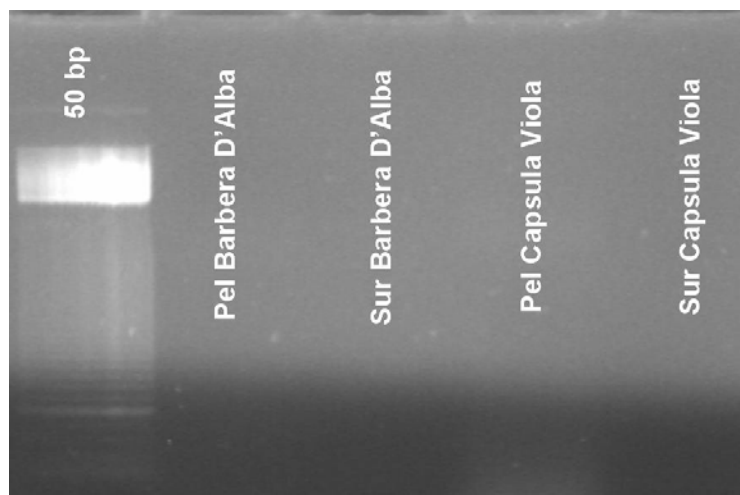


Figura 8. Elettroforesi su gel di agarosio (0,8% p/v) degli estratti da vini commerciali Barbera D'Alba e Capsula Viola. Il DNA eventualmente estratto dai vini commerciali non è rilevabile tramite elettroforesi su gel.

Gli unici segnali rilevabili sono stati ottenuti dallo spettro di assorbimento degli estratti da surnatante, generati dai coloranti del vino residui all'interno dell'estratto ottenendo quindi lo spettro rappresentato in Figura 9.

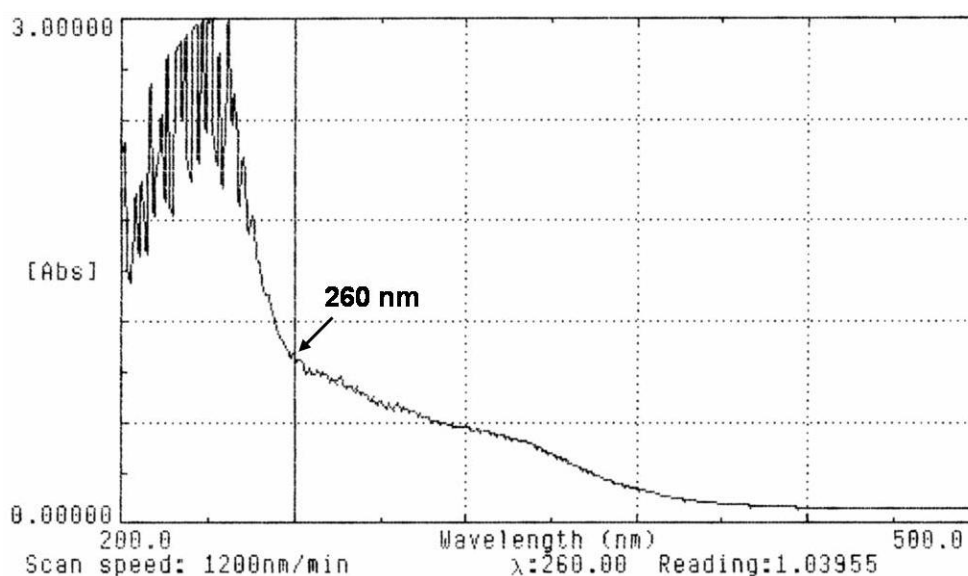


Figura 9. Spettro di assorbimento dell'estratto da surnatante del vino commerciale Barbera D'Alba. L'eventuale picco di assorbimento degli acidi nucleici è nascosto dall'assorbanza dei contaminanti e inibitori presenti nella soluzione di purificazione.

Il parametro principale che è stato valutato per scegliere il miglior metodo di estrazione è stato quindi l'amplificabilità in PCR degli estratti utilizzando i primer per la Maturasi K già utilizzati per controllare l'amplificabilità degli estratti da vini sperimentali.

Nella maggior parte dei casi è stata ottenuta una singola e intensa banda della taglia attesa (201 bp). L'analisi della sequenza ha confermato anche in questo caso che gli ampliconi ottenuti corrispondessero alla sequenza della *Maturasi K di Vitis vinifera*.

L'efficienza di amplificazione per ogni metodo è stata calcolata considerando la percentuale di PCR positive per ogni replica di estrazione eseguendo una valutazione di presenza/assenza dell'amplicone desiderato. I risultati sono riportati nella Figura 10.

Tutti i metodi, ad esclusione del metodo (iv) hanno determinato risultati positivi in almeno una replica. Per i vini commerciali non è stata riscontrata, al contrario dei vini sperimentali, una grande differenza di amplificazione tra pellet e surnatanti di estrazione.

Per valutare i migliori metodi di estrazione sono stati presi in considerazione altri parametri oltre all'amplificabilità degli estratti quali: tempo, costi, volume di partenza, difficoltà di esecuzione.

I risultati sono mostrati nella Figura 10 sono riassunti nella Tabella 5. I protocolli (i) e (iii) hanno dato la più alta efficienza di amplificazione (81,25%) e, poiché non si sono differenziati dagli altri metodi (ii) e (iv) in base agli altri parametri, sono stati scelti per proseguire le ulteriori analisi.

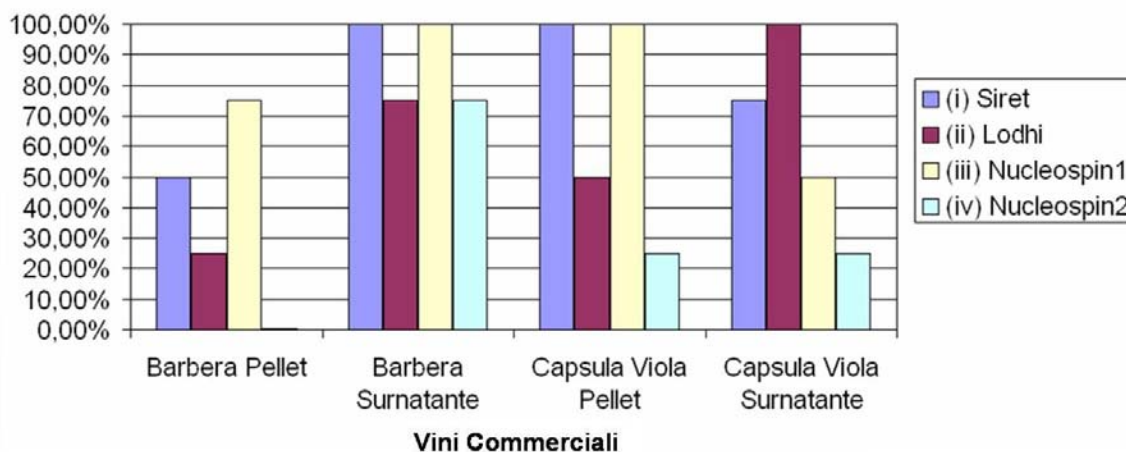


Figura 10. Rappresentazione grafica dell'efficienza di amplificazione del controllo di estrazione sugli estratti da vini commerciali Barbera D'Alba e Capsula Viola utilizzando i 4 metodi di estrazione. I metodi migliori sono il metodo (i) e (iii) come riassunto anche dalla Tabella 5.

Metodo	Tempo	Costi	Volume	Difficoltà	Solventi Organici	Efficienza di Amplificazione
(i)	3 giorni	Bassi	40 ml	Media	Sì	81,25 %
(ii)	2 giorni	Bassi	6 ml	Media	Sì	62,5 %
(iii)	3 ore	Medi	1,5 ml	Bassa	No	81,25 %
(iv)	3 ore	Medi	1,5 ml	Bassa	No	31,25 %

Tabella 5. Risultati dei test di valutazione dei 4 metodi di estrazione sui vini commerciali Barbera D'Alba e Capsula Viola.

Per valutare quale fra i metodi (i) e (iii) potesse risultare il migliore, è stato estratto il DNA da altri due vini commerciali stavolta monovarietali: Pinot Nero e Pinot Bianco. Le analisi sono state eseguite in quadruplo e per ogni set di estrazione è stato eseguito un controllo negativo di estrazione. I risultati sono descritti nella Figura 11 e si può concludere dai dati espressi dalla rappresentazione grafica che il metodo migliore da utilizzare per estrarre DNA da vini commerciali è il metodo (i) Siret. Un altro dato importante riportato nella figura è l'intensità della bande di amplificazione che risulta sempre maggiore negli estratti da pellet rispetto agli estratti dai surnatante.

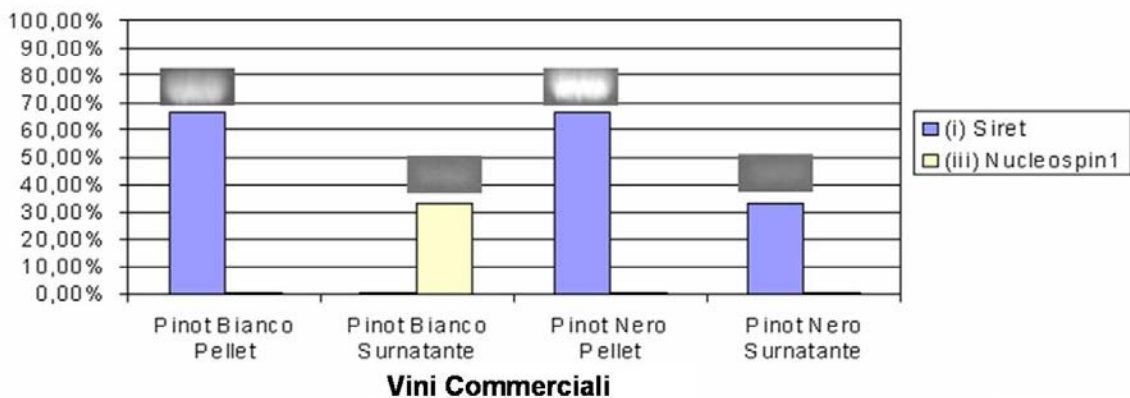


Figura 11. Rappresentazione grafica dell'efficienza di amplificazione del controllo di estrazione sugli estratti da vini commerciali Pinot Bianco e Pinot Nero utilizzando i 2 metodi di estrazione selezionati. Da questa successiva analisi il metodo migliore è risultato essere il metodo (i) Siret.

Per escludere che i prodotti di PCR derivino da amplificazioni aspecifiche di DNA di lievito, abbiamo testato gli stessi primer con DNA di *Saccharomyces cerevisiae* e non è stato ottenuto l'amplicone della taglia attesa nonostante fosse presente un lieve segnale di un aspecifico ad una taglia maggiore di circa 350 bp (Figura 12).

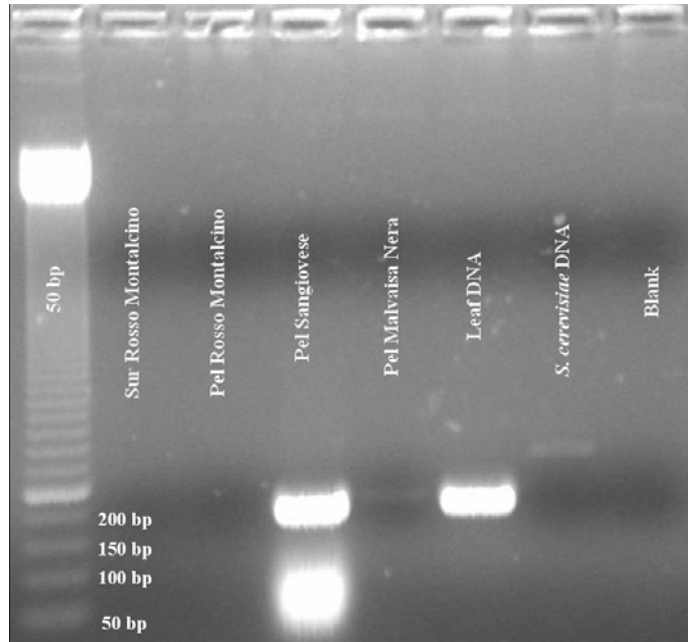


Figura 12. Elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v) delle PCR di controllo degli estratti da alcuni vini sperimentali e di controllo negativo su DNA di lievito. Nella Lane 6 l'amplificazione del DNA di lievito determina la presenza di un aspecifico avente una lunghezza di circa 350 bp.

Inoltre l'analisi delle sequenze degli ampliconi di PCR hanno confermato la loro identità con il gene *Maturasi K* di *Vitis vinifera* (Figure 13 e 14).

```
> gi|22797797|emb|AJ429274.1|VVI429274 Vitis vinifera chloroplast partial matK gene for maturase
Length=1645

Score = 345 bits (174), Expect = 3e-92
Identities = 201/201 (100%), Gaps = 0/201 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      CGTTGGCTAAAGCGAGATTTTGTAAATGCCTTAGGGCATCCCATTAGTAAGCCGTCCTGGG 60
            |||
Sbjct 1024    CGTTGGCTAAAGCGAGATTTTGTAAATGCCTTAGGGCATCCCATTAGTAAGCCGTCCTGGG 1083

Query 61     CCGATTCATCAGATTATGATATTATCGACCGATTTGTGCGTATATGCAGAAATATTTCTC 120
            |||
Sbjct 1084    CCGATTCATCAGATTATGATATTATCGACCGATTTGTGCGTATATGCAGAAATATTTCTC 1143

Query 121    ATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAAAAAAGAAATTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGAC 180
            |||
Sbjct 1144    ATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAAAAAAGAAATTTGTATCGAATCAAATATATACTTCGAC 1203

Query 181    TTTCTTGTGCTCGAACTTTGG 201
            |||
Sbjct 1204    TTTCTTGTGCTCGAACTTTGG 1224
```

Figura 13. BLAST della sequenza eseguita sulla PCR di controllo di estrazione da vino Capsula Viola. L'omologia con gene di *Maturasi K* di *Vitis vinifera* è perfetta.

Risultati

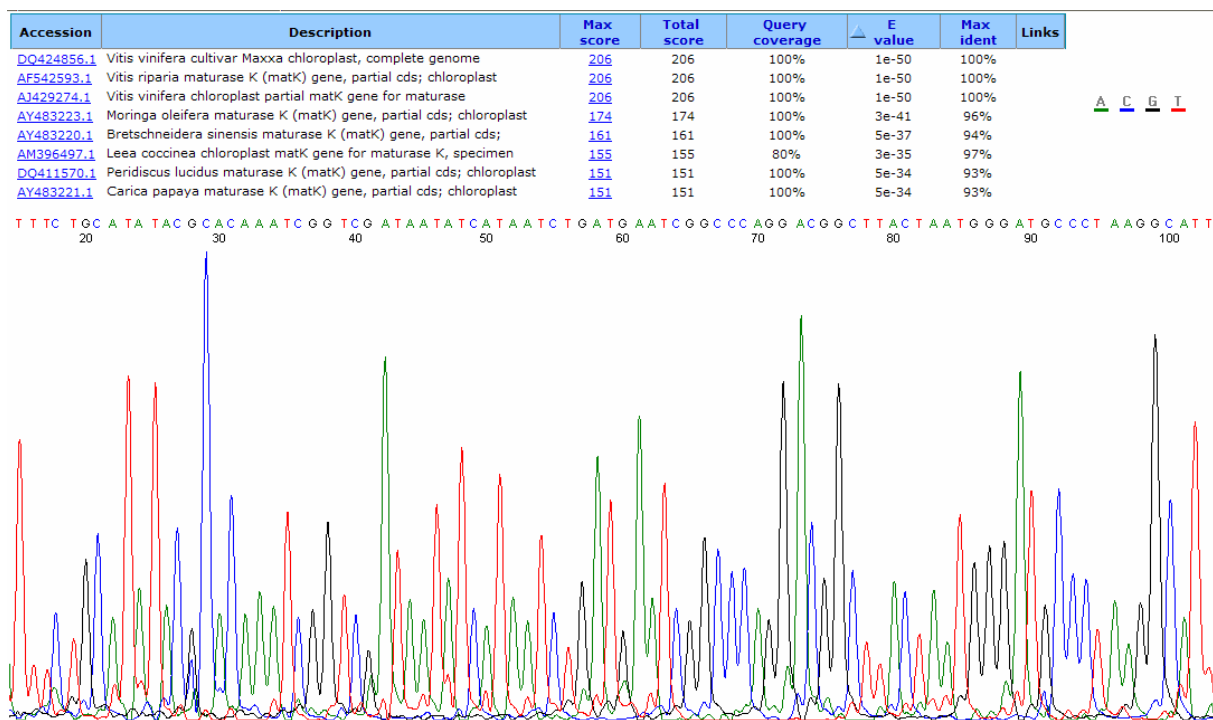


Figura 14. Elettroferogramma della sequenza eseguita sulla PCR di controllo di estrazione da vino Capsula Viola insieme ai risultati di omologia degli allineamenti eseguiti tramite BLAST. I picchi dell'elettroferogramma sono estremamente nitidi e risolti. Il DNA estratto è quindi di ottima qualità non solo per le reazioni di PCR ma anche per il sequenziamento.

Quindi in seguito alle numerose PCR di controllo di estrazione sul gene Maturasi K è possibile determinare che, sia su vini commerciali che sperimentali, l'efficienza di amplificazione è maggiore per gli estratti da pellet. Questo risultato è facilmente riscontrabile nella Figura 15 che ben dimostra come il DNA estratto da vini sia commerciali che sperimentali sia analizzabile mediante PCR. L'amplicone atteso è di 201 bp e corrisponde ai risultati ottenuti.

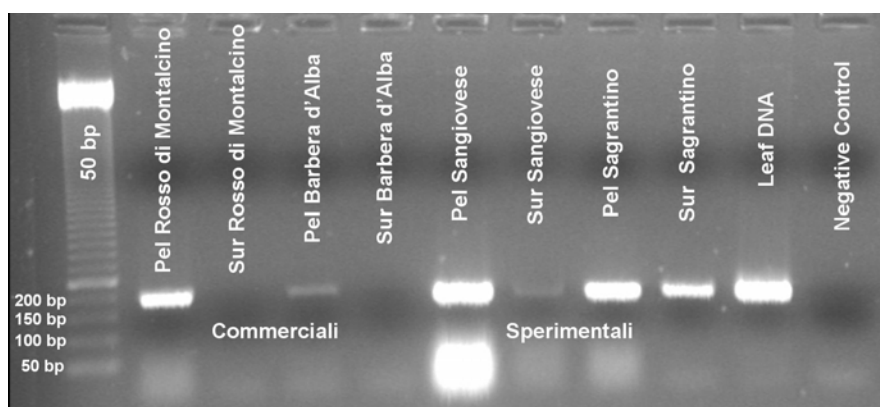


Figura 15. Elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v) PCR di controllo degli estratti da alcuni vini sperimentali e commerciali. Le PCR con risultati migliori si ottengono da vini sperimentali piuttosto che da vini commerciali. Sinora inoltre una migliore efficienza di amplificazione degli estratti da pellet rispetto agli estratti da surnatante sia per vini sperimentali che per vini commerciali.

Oltre ai vini utilizzati come campioni nell'analisi statistica per scegliere il migliore metodo di estrazione, sono stati diversi i vini commerciali testati per confermare la scelta del metodo di estrazione (i) come migliore protocollo per la purificazione di DNA da vini commerciali e sperimentali.

Nelle Figure che seguono (Figure 16 e 17) sono diversi i vini riportati e sempre risulta che il DNA purificato dal pellet di estrazione risulta essere meglio amplificabile.

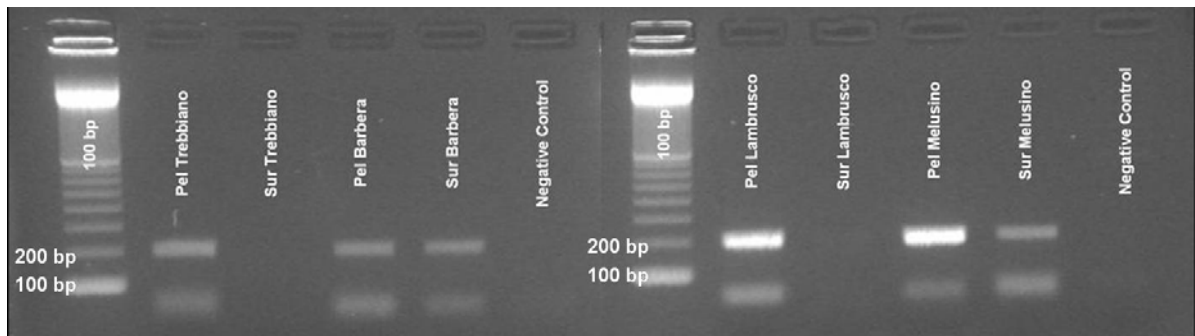


Figura 16. Elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v) delle PCR di controllo degli estratti da alcuni vini commerciali. Gli ampliconi corrispondono al risultato atteso (201 bp).

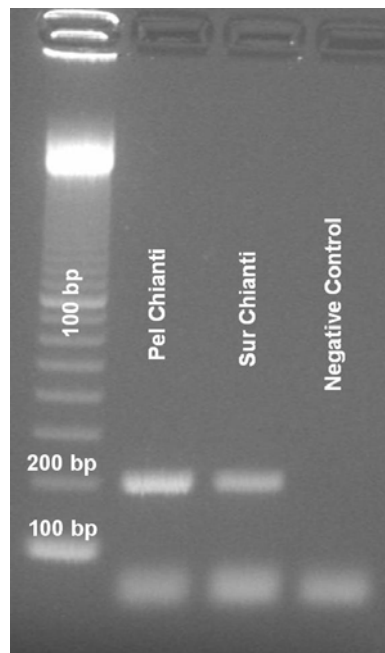


Figura 17. Elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v) delle PCR di controllo degli estratti da alcuni vini commerciali. Gli ampliconi corrispondono al risultato atteso (201 bp).

4. Amplificazione di DNA di lievito

4.1 PCR singola

Il protocollo di amplificazione utilizzato per rilevare la presenza di DNA di lievito nel vino ci ha permesso di verificare che sia in vini sperimentali che commerciali è presente in quantità rilevabili anche con una metodica di PCR standard.

In Figura 18 gli ampliconi presenti corrispondono agli attesi di 70 bp ed è possibile verificare che nel caso del vino commerciale si ha una maggiore efficienza di amplificazione su pellet rispetto al surnatante mentre avviene il contrario per il vino sperimentale. Ciò indica che, a seconda del vino che utilizziamo per l'estrazione del DNA, sono diversi i parametri che agiscono sull'efficienza di amplificazione degli estratti e che non sempre i risultati ottenuti sono riproducibili.

In figura è inoltre presente il controllo negativo effettuato su DNA di *Vitis vinifera* per verificare che i primer disegnati non amplifichino anche il genómico dell'organismo vegetale.

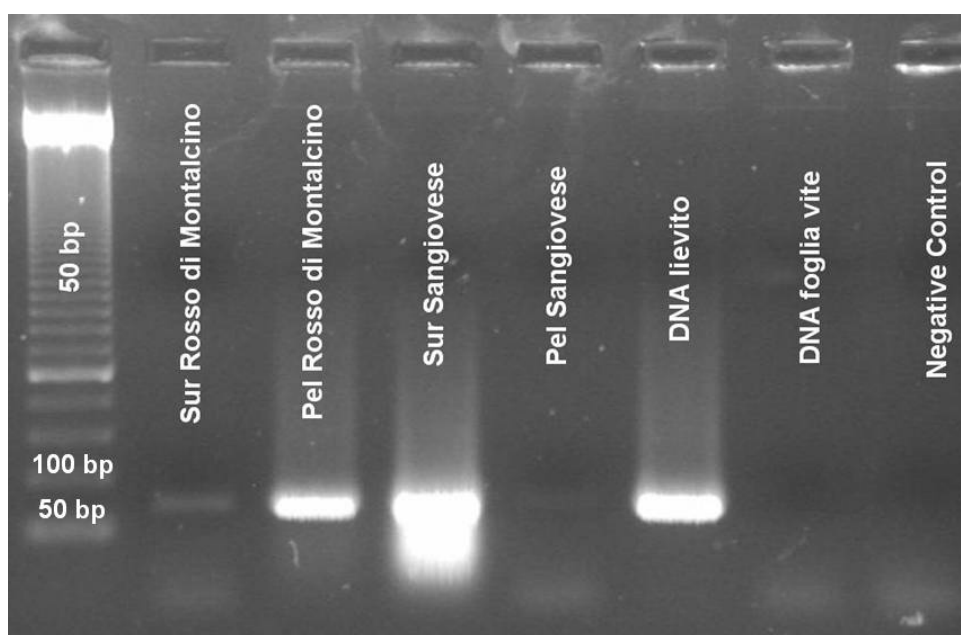


Figura 18. Elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v) delle PCR di controllo estrazione DNA di lievito. Gli ampliconi presenti corrispondono agli attesi specifici per il DNA di lievito (70 bp).

4.2 PCR duplex

Nella Figura 19 è invece rappresentata l'amplificazione in duplex di DNA di vite e di lievito contemporaneamente. In questo caso l'amplificazione di entrambi i target è stata ottenuta solamente sugli estratti da vini sperimentali (Sangiovese e Malvasia Nera).



Figura 19. Elettroforesi su gel di agarosio (2% p/v) delle PCR duplex controllo estrazione DNA di lievito su vini sperimentali e commerciali. Gli ampliconi presenti corrispondono a 201 bp (PCR specifica per DNA di *Vitis vinifera*) e 70 bp (PCR specifica per DNA di lievito).

5. Amplificazione mediante la tecnica Sybr Green Real Time PCR

5.1 Amplificazione del DNA cloroplastico di *Vitis vinifera*

Per aumentare la sensibilità delle reazioni di PCR abbiamo utilizzato la tecnica di Sybr Green® Real Time PCR. Nel caso dell'amplificazione di DNA cloroplastico i risultati sono eterogenei e dipendenti, come nel caso della PCR standard, sia dall'efficienza di amplificazione che dall'effetto matrice. In Figura 20 è possibile verificare dal profilo delle T_m che gli ampliconi risultanti hanno la T attesa (79°C) e che si riscontra la presenza in diversi campioni di primer dimers dovuti alla ridotta quantità di DNA template presente e all'alto numero di cicli di amplificazione a cui bisogna sottoporre i campioni.

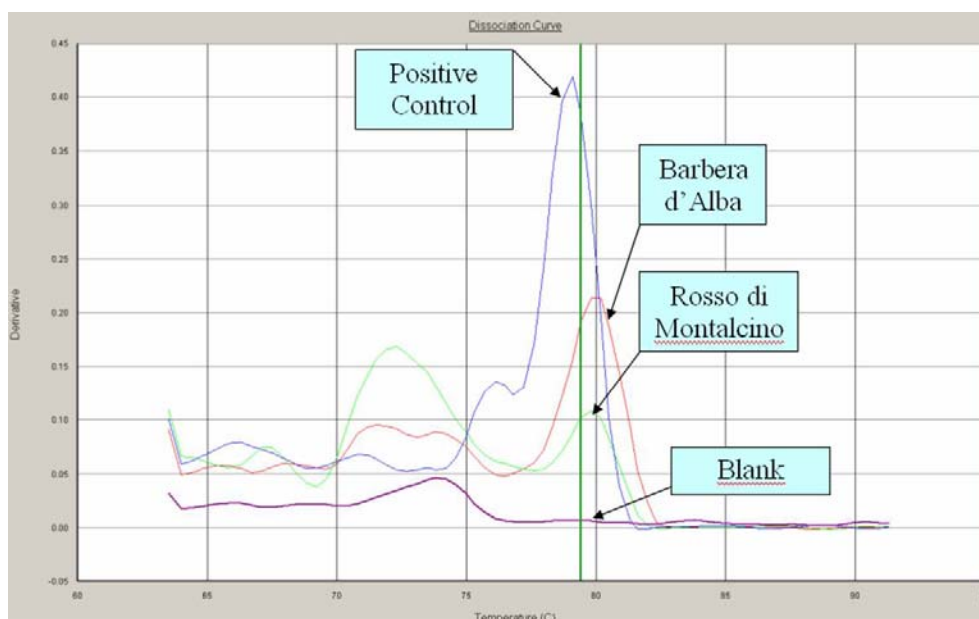


Figura 20. Profili termici degli ampliconi dei controlli di estrazione cloroplastici su vini commerciali.

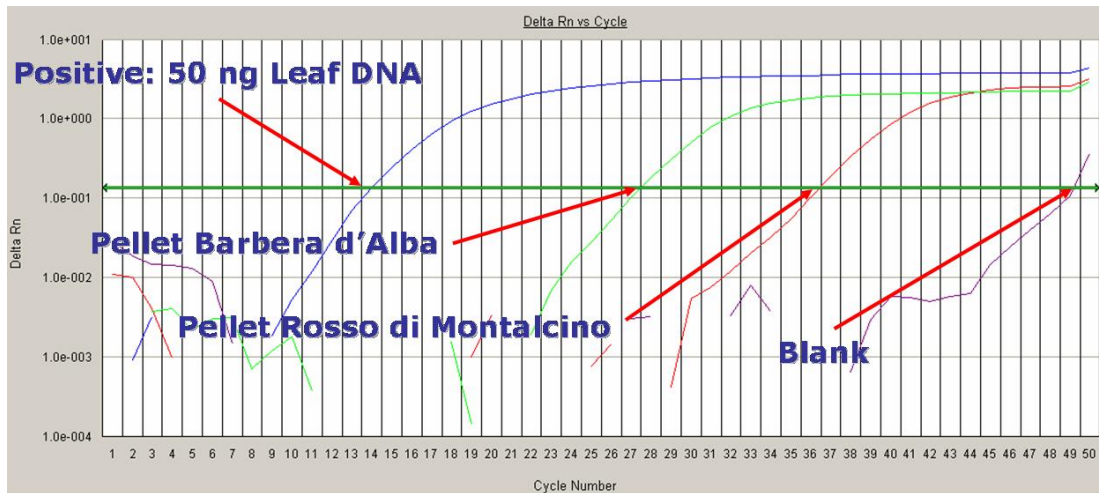


Figura 21. Profili di amplificazione dei controlli di estrazione cloroplastici su vini commerciali.

In Figura 21 sono invece presenti i profili di amplificazione di alcuni vini analizzati. Se il controllo positivo amplifica al 14° ciclo, i campioni di vini commerciali iniziano ad amplificare oltre il 27° ciclo.

5.2 Amplificazione del DNA nucleare di *Vitis vinifera*

Per valutare l'amplificabilità di DNA nucleare estratto da vini è stata utilizzata la tecnica di Sybr Green® Real Time PCR poiché la PCR standard non è sufficientemente sensibile per questo scopo. Dalla Figura 22 si può notare come in questo caso sia ancora più evidente la presenza di primer dimers e l'amplicone d'interesse è presente e sovrapponibile al controllo. La T_m dell'amplicone dell'estratto da Rosso di Montalcino corrisponde a quella del controllo positivo (82°C).

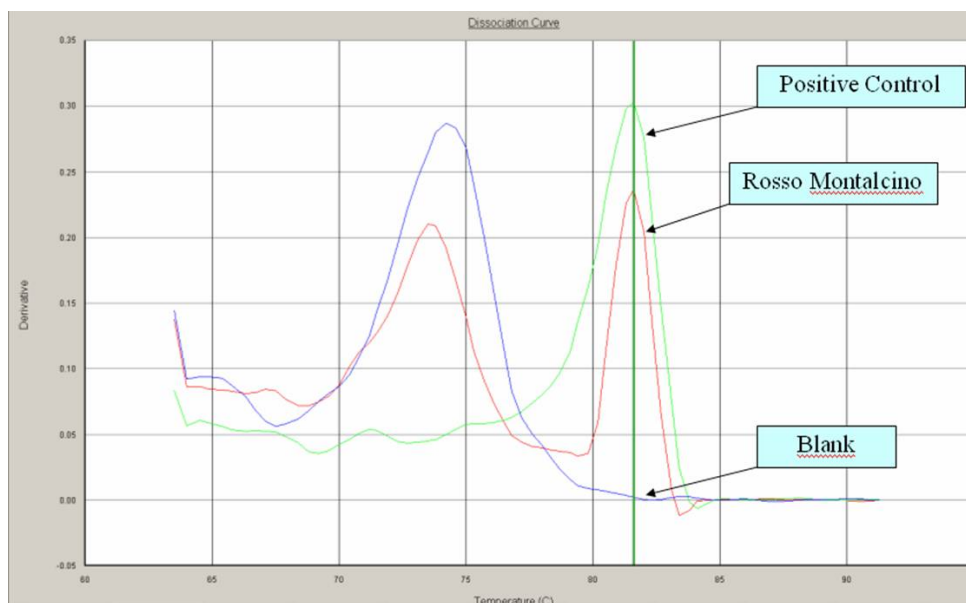


Figura 22. Profili termici degli ampliconi dei controlli di estrazione nucleari su vini commerciali.

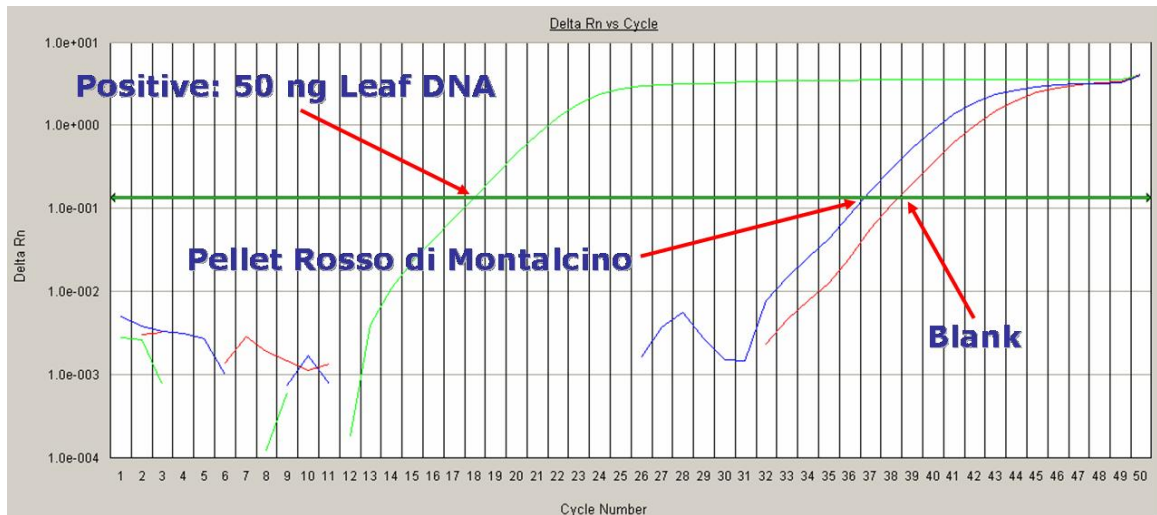


Figura 23. Profili di amplificazione dei controlli di estrazione nucleare su vini commerciali.

Dal profilo di amplificazione rappresentato in Figura 23 si può notare come l'amplificazione sull'estratto da vino commerciale abbia un ciclo soglia molto vicino al bianco di amplificazione; entrambi sono comunque influenzati dalla presenza di primer dimers sempre rilevati dal Sybr Green® a causa del suo legame aspecifico con la doppia elica di DNA.

5.3 Amplificazione del DNA di lievito

E' stato realizzato anche in Real Time il controllo dell'assenza di cross contaminazione su lievito della PCR di controllo di estrazione avente come target il DNA cloroplastico di *vitis*. I primers specifici per la *Maturasi K* amplificano un aspecifico sul DNA di *S. cerevisiae* ad una temperatura di melting superiore a quella attesa per *Vitis vinifera* (Figura 24) confermando ciò che viene riportato con la PCR standard (Figura 12).

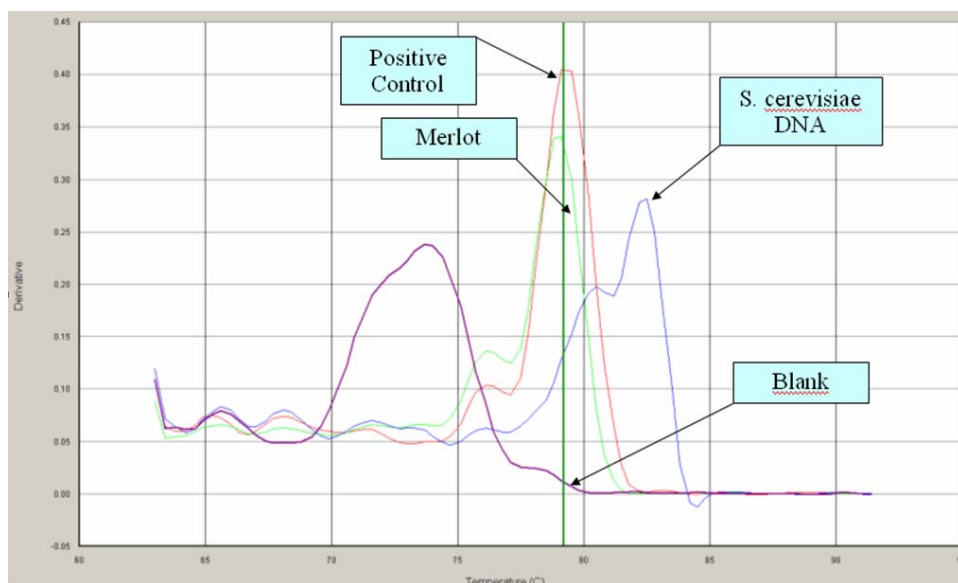


Figura 24. Profili di amplificazione delle PCR specifiche per il DNA cloroplastico su vini commerciali e su lievito.

5.4 Costruzione retta di taratura e quantificazione del DNA di *Vitis vinifera*

Tramite Real Time PCR abbiamo anche eseguito una reazione di quantificazione del DNA estratto da vini sperimentali e commerciali. E' stata costruita una retta di taratura (Figura 25) con quantità di DNA decrescente da 10^3 a 10^{-7} ng di DNA utilizzando delle diluizioni seriali e su questa retta sono poi state eseguite le quantificazioni degli estratti da vini.

In Figura 26 si osserva che 50 ng di DNA di controllo amplificano al 14° ciclo mentre i vini sperimentali tra il 20° e il 24° e i vini commerciali tra il 36° e 42°.

E' possibile quindi stabilire, confrontando queste amplificazioni con la retta di taratura, che a causa dell'effetto matrice e estrazione, il DNA estratto da 4 mL di vini sperimentali risulta quantificabile come riassunto in Tabella 6.

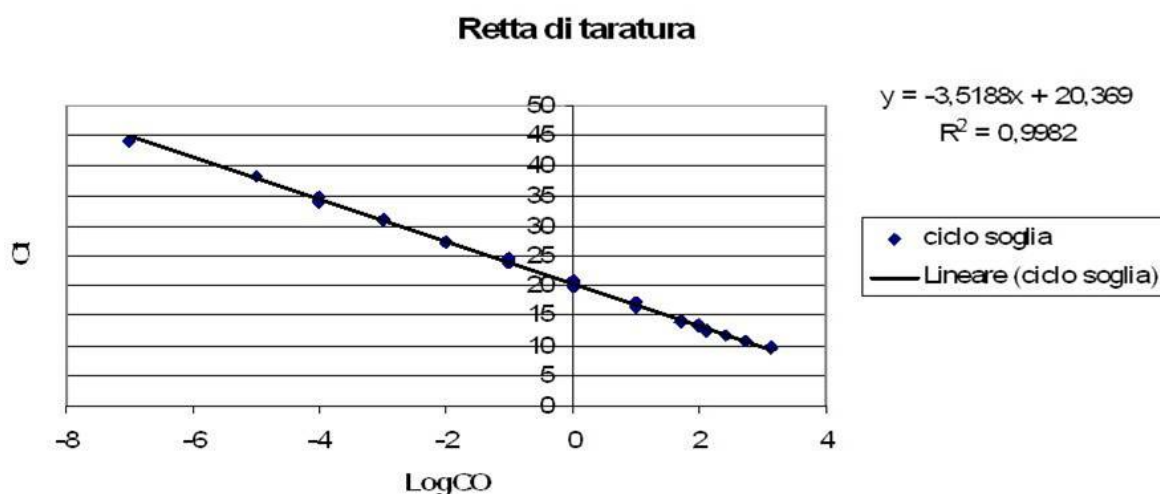


Figura 25. Retta di taratura per la quantificazione del DNA estratto da vini sperimentali e commerciali.

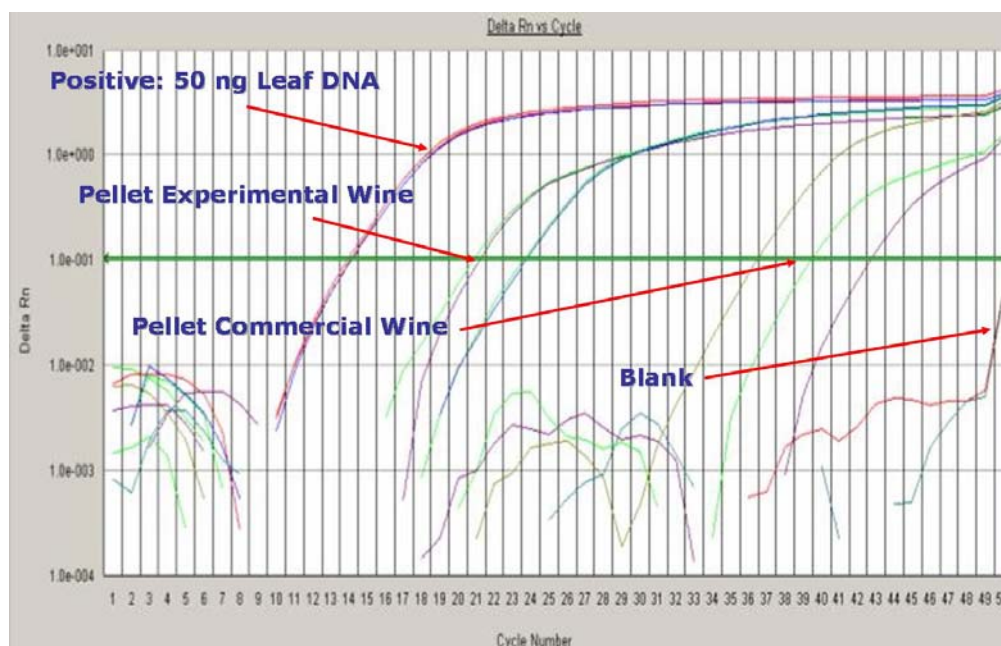


Figura 26. Profili di amplificazione per la quantificazione di DNA estratto da vini sperimentali e commerciali.

Quantità di DNA rilevata per 4 mL di vino		
	Sperimentale	Commerciale
Pellet	60 ng	40 fg
Surnatante	38 fg	4 fg

Tabella 6. Quantificazione del DNA estratto da vini sperimentali e commerciali.

5.4 Valutazione dell'effetto matrice sull'amplificabilità del DNA estratto

La verifica dell'influenza dell'effetto matrice sull'amplificabilità del DNA estratto è stata effettuata mediante Real Time PCR. I risultati sono rappresentati in Figura 27.

Su 1000 ng di DNA aggiunti vengono estratti e rilevati mediante la metodologia applicata 148,4 ng di DNA. Per le diluizioni successive le quantità estratte e rilevate sono ovviamente minori come descritto nella Figura 27.

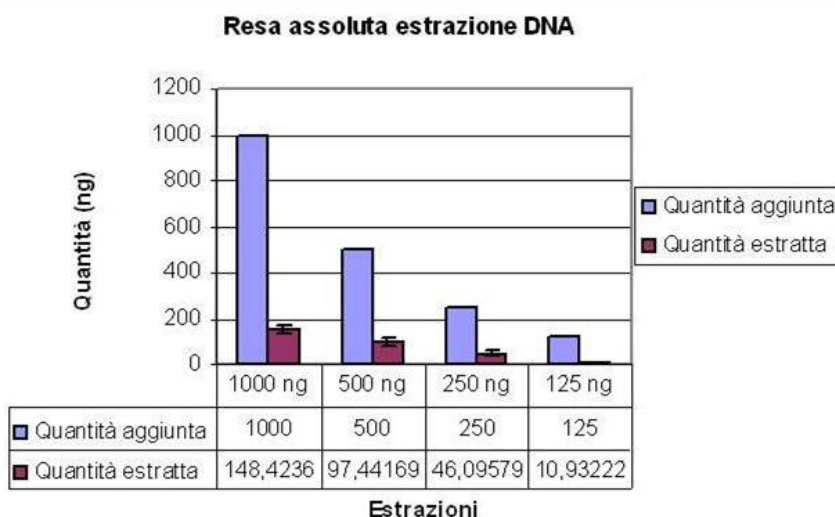


Figura 27. Rappresentazione grafica della resa assoluta dell'estrazione del DNA per lo studio dell'effetto matrice.

Per completezza di informazione è stata calcolata la resa percentuale dell'estrazione calcolata come il rapporto tra quantità di DNA aggiunta e quantità di DNA estratta e rilevata. Tale parametro è rappresentato graficamente in Figura 28.

La quantità rilevabile di DNA aggiunto al vino da estrarre risulta essere quindi tra l'8% e il 20% a causa dell'efficienza di estrazione e dall'inibizione della matrici di estrazione.

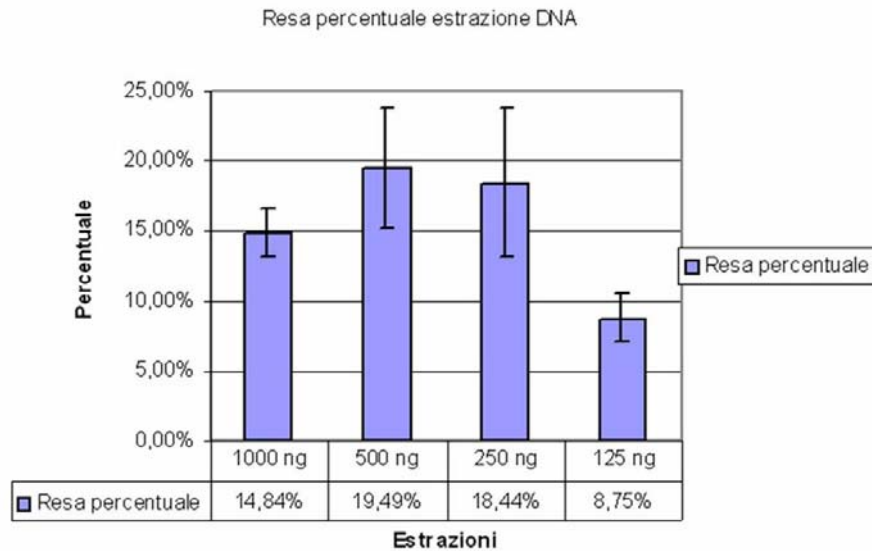


Figura 28. Rappresentazione grafica della resa percentuale dell'estrazione del DNA per lo studio dell'effetto matrice.

6. Analisi dei marcatori microsatelliti

6.1 Applicazione dei microsatelliti su foglie di cultivars

L'analisi dei marcatori SSR eseguita sulla popolazione di 12 cultivars (Tabella 1) ci ha permesso di ottenere le caratteristiche dei marcatori utilizzati in termini di numero di alleli, eterozigotità, omozigotità, numero effettivo di alleli, potere discriminante, potere di identità, potere di esclusione (Tabelle 7 e 8). L'**Eterozigotità** (H) è la proporzione degli individui eterozigoti mentre l'**Omozigotità** (h) è la proporzione degli individui omozigoti. n_e è il numero effettivo di alleli pesando il numero di individui omozigoti e il **Potere Discriminante** (PD) è il principale indice del polimorfismo dei microsatelliti. Il **Potere di esclusione** (PE) misura quanto spesso un campione selezionato casualmente non presenta il profilo genetico considerato mentre il **Potere di Identità** (P_I) misura la probabilità che due individui selezionati casualmente abbiano profili genetici identici nei loci considerati. (Weir, 1996; Fischer, 1951; Sensabaugh et al., 1982).

Analizzando il potere discriminante, che è senza dubbio il parametro più importante di un marcatore SSR, risulta evidente che i migliori SSR sono risultati essere VVMD27, VrZAG62 e VVS2. Il pannello totale di SSR nucleari ha un potere discriminante di 0,92 che risulta essere il medesimo valore del potere discriminante di tutti i microsatelliti compresi quelli cloroplastici. Ciò significa che, ai fini di discriminare un individuo appartenente a questa popolazione di cultivar, l'uso dei marcatori cloroplastici è superfluo perché troppo poco

polimorfici. I parametri di Eterozigosità ed Omozigosità non sono applicabili ai marcatori di genomi di organelli citoplasmatici.

6.2 Applicazione dei microsatelliti su vini sperimentali

I parametri utilizzati per verificare la possibilità di analizzare i 6 vini sperimentali mediante marcatori SSR sono: percentuale di identità rispetto al profilo della cultivar corrispondente, percentuale di dropout allelico rispetto al profilo della cultivar corrispondente, percentuale di amplificazioni aspecifiche e percentuale di amplificazioni non riuscite. Nella Figura 29 vengono visualizzati alcuni elettroferogrammi che permettono di verificare la corrispondenza dei risultati ottenuti tra vino Dolcetto e la sua corrispondente cultivar con i microsatelliti VVS2 e VVMD27 mentre nell'Allegato 4 sono presenti altri elettroferogrammi di confronto.

Il totale dei risultati ottenuti sono riassunti dalla Tabella 9. I migliori microsatelliti nucleari sono risultati essere VVS2 e VrZAG62 rispettivamente con il 61,11% e 58,33% di identità rispetto alla corrispondente cultivar. Il peggiore microsatellite nucleare è invece risultato essere VVMD7 con il 13,33% di identità verso la corrispondente cultivar. I microsatelliti cloroplastici sono risultati essere più indicati per l'analisi di DNA degradato poiché CMP5 e CCMP10 hanno determinato una percentuale di identità con la corrispondente cultivar rispettivamente di 64,44% e 72,73%, valori superiori rispetto a qualsiasi altro SSR nucleare.

Nella Figura 30 vengono visualizzati graficamente i risultati ottenuti con il miglior marcatore nucleare VVS2 e il migliore marcatore cloroplastico CCMP10. E' quindi evidente la differente efficienza di analisi di marcatori nucleari e marcatori cloroplastici su DNA degradato e in condizioni di Low Copy Number.

Risultati

Cultivar	VVS2		VVIC05		VVMD7		VVMD27		VVMD5		VrZAG62		CCMP5	CCMP10
Pinot Bianco	n+4	n+18	n+2	n+6	n	n+4	n+10	n+14	n+4	n+14	n	n+6	n.d.	n
Chardonnay	n+4	n+10	n	n+2	n	n+4	n+6	n+14	n+10	n+14	n	n+8	n+1	n+2
Malvasia Candia	n	n+10	n+2	n+2	n+10	n+23	n+10	n+19	n+2	n+14	n+12	n+14	n	n+1
Trebbiano Toscano	n	n+10	n	n+2	n.d.	n.d.	n+4	n+8	n+2	n+12	n+6	n+12	n	n.d.
Dolcetto	n+6	n+10	n	n+2	n+8	n+16	n+4	n+19	n+10	n+22	n+14	n+16	n	n+1
Malvasia Nera	n+12	n+12	n+2	n+2	n	n+10	n+4	n+6	n	n+10	n+8	n+14	n	n+1
Cabernet Sauvignon	n+6	n+18	n+2	n+6	n	n	n	n+14	n+6	n+14	n	n+6	n	n+1
Cabernet Franc	n+6	n+14	n+2	n+4	n	n+23	n+6	n+14	n+2	n+16	n+6	n+16	n	n+1
Merlot AR51	n+6	n+18	n+2	n+6	n	n+8	n+12	n+14	n+2	n+12	n+6	n+6	n	n+2
Pinot Nero	n+4	n+18	n+2	n+6	n	n+4	n+10	n+14	n+2	n+12	n	n+6	n	n
Sangiovese Brunello	n	n	n+2	n+2	n	n+23	n+4	n+10	n	n+10	n+6	n+8	n	n
Sagrantino	n	n+6	n+2	n+14	n	n+10	n+10	n+10	n+6	n+6	n+10	n+12	n	n+1

Tabella 7. Alleli risultanti dall'analisi delle 12 cultivar utilizzando I 6 SSR nucleari e 2 SSR cloroplastici prescelti.

SSR	Allele minore (n)	Alleli delle cultivar analizzate								H	h	n _e	PD	PE	P _I
VVS2	132	n+4	n+6	n+10	n+12	n+14	n+18			0,83	0,17	5,88	0,88	0,61	0,12
VVIC05	154	n+2	n+4	n+6	n+14					0,75	0,25	4,00	0,75	0,48	0,25
VVMD7	238	n+4	n+6	n+8	n+10	n+16	n+23			0,91	0,09	11,11	0,83	0,77	0,17
VVMD27	173	n+4	n+6	n+8	n+10	n+12	n+14	n+16	n+19	0,92	0,08	12,50	0,89	0,79	0,11
VVMD5	223	n+2	n+4	n+6	n+10	n+12	n+14	n+16	n+22	0,92	0,08	12,50	0,86	0,79	0,14
VrZAG62	187	n+6	n+8	n+10	n+12	n+14	n+16			0,92	0,08	12,50	0,88	0,79	0,12
CCMP5	102	n+1								n.a.	n.a.	1,00	0,17	0,00	0,83
CCMP10	109	n+1	n+2							n.a.	n.a.	1,00	0,60	0,00	0,4
Nucleari	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,87	0,13	7,69	0,92	0,68	0,08
Cloroplastici	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	1,00	0,71	0,00	0,29
Pannello totale	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	3,03	0,92	0,38	0,08

Tabella 8. Caratteristiche dei microsatelliti analizzati.

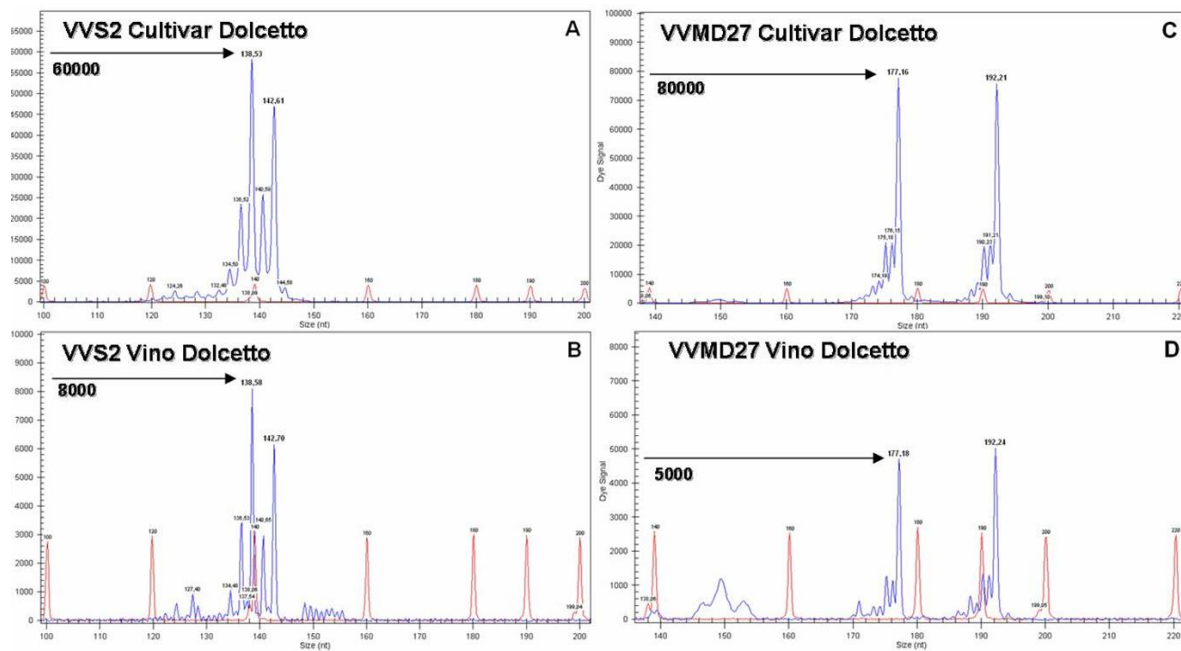


Figura 29. Confronto degli elettroferogrammi degli SSR VVS2 e VVMD27 analizzati sul vino sperimentale Dolcetto e la cultivar corrispondente. Si rileva una precisa corrispondenza degli alleli di cultivar e corrispondente vino. Si nota inoltre la perdita di intensità di fluorescenza dei segnali passando dall’analisi della cultivar all’analisi del vino.

SSR	Identità	Dropout	Aspecifico	Nessuna amplificazione	Totale
VVS2	61,11%	16,67%	0,00%	22,22%	100,00%
VVMD5	20,00%	15,56%	17,78%	46,67%	100,00%
VVIC05	50,00%	27,78%	2,78%	19,44%	100,00%
VVMD7	13,33%	15,56%	13,33%	57,78%	100,00%
VVMD27	57,41%	16,67%	0,00%	25,93%	100,00%
VrZAG62	58,33%	9,26%	6,48%	25,93%	100,00%
CCMP5	64,44%	0,00%	2,22%	33,33%	100,00%
CCMP10	72,73%	0,00%	2,27%	25,00%	100,00%
Nucleari	44,62%	16,32%	6,42%	32,64%	100,00%
Cloroplastici	68,54%	0,00%	2,25%	29,21%	100,00%
Pannello Totale	50,27%	12,47%	5,44%	31,83%	100,00%

Vino	Identità	Dropout	Aspecifico	Nessuna Amplificazione	Totale
Pinot Bianco	31,11%	26,67%	4,44%	37,78%	100,00%
Chardonnay	39,44%	23,94%	14,08%	22,54%	100,00%
Trebbiano Toscano	88,89%	1,85%	1,85%	7,41%	100,00%
Dolcetto	54,86%	10,42%	5,56%	29,17%	100,00%
Cabernet Sauvignon	4,76%	1,59%	1,59%	92,06%	100,00%
Cabernet Franc	79,17%	11,81%	3,47%	5,56%	100,00%

Tabella 9. Risultati ottenuti dall’analisi dei microsatteliti su 6 vini sperimentali confrontando i risultati con le rispettive cultivars.

Dai risultati ottenuti possiamo inoltre verificare che i diversi vini analizzati rispondono diversamente all’analisi mediante marcatori molecolari del DNA estratto. Questo può dipendere dalla diversa quantità di coloranti, polifenoli e inibitori delle reazioni di

amplificazione o dalla diversa efficienza di estrazione degli acidi nucleici. Il vino più facilmente analizzabile è risultato essere il Trebbiano Toscano con l'88,89% di identità con la corrispondente cultivar mentre il peggiore è risultato essere il Cabernet Sauvignon con il 4,76% di identità con la corrispondente cultivar. In Figura 31 vengono descritti graficamente i risultati ottenuti analizzando il vino sperimentale Trebbiano Toscano.

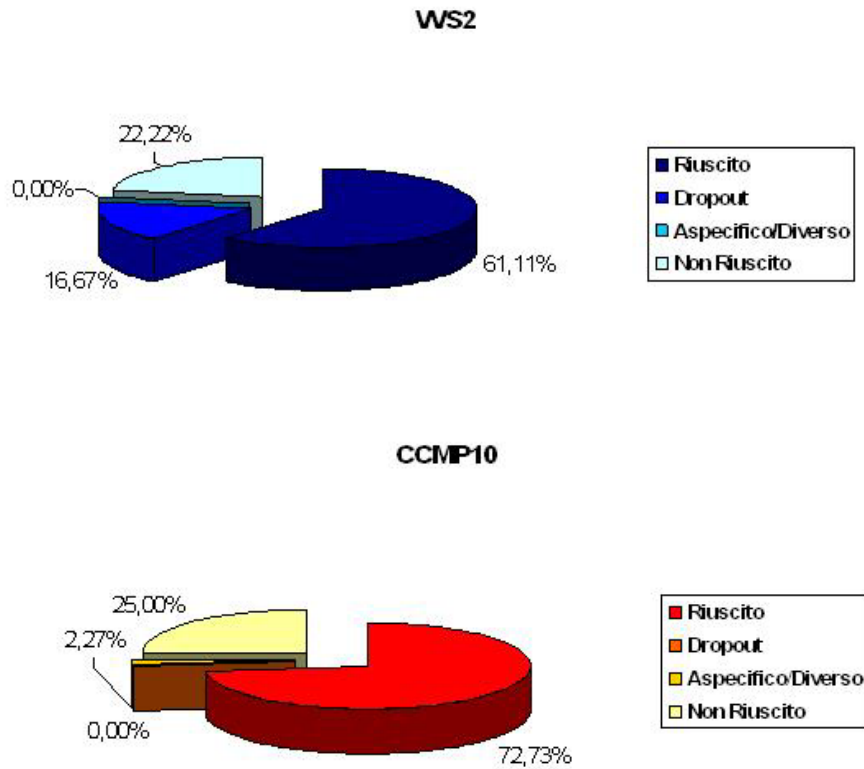


Figura 30. Confronto grafico dei risultati ottenuti con il migliore microsatellite nucleare VVS2 e il miglior marcatore cloroplastico CCMP10.



Figura 31. Visualizzazione grafica dei risultati di analisi ottenuti sul vino Trebbiano Toscano risultato essere il vino più facilmente analizzabile con i marcatori SSR.

6.3 Applicazione dei microsatelliti su vini commerciali

Per quanto riguarda l'analisi di vini commerciali le prove eseguite hanno dimostrato la possibilità di amplificare con marcatori SSR sia nucleari che cloroplastici il DNA estratto dai vini. In questo caso i marcatori più adeguati risultano essere ovviamente quelli cloroplastici poiché in condizioni di DNA degradato e Low Copy Number sono i marcatori più performanti. Non avendo a disposizione le cultivar corrispondenti ai vini commerciali analizzati possiamo soltanto fare un'analisi descrittiva dei risultati ottenuti senza considerare il parametro di identità o dropout con la cultivar ma soltanto la presenza o assenza di amplificazione con i marcatori utilizzati. Dagli elettroferogrammi presentati in Figura 32 è possibile verificare che gli SSR nucleari sono utilizzabili anche per analisi di DNA estratto da vini commerciali. In un caso sono infatti presenti due picchi corrispondenti a due possibili alleli, in due casi ci troviamo di fronte a dropout allelico e verificiamo che nell'analisi del bianco di estrazione non è stato trovato alcun segno di possibile contaminazione.

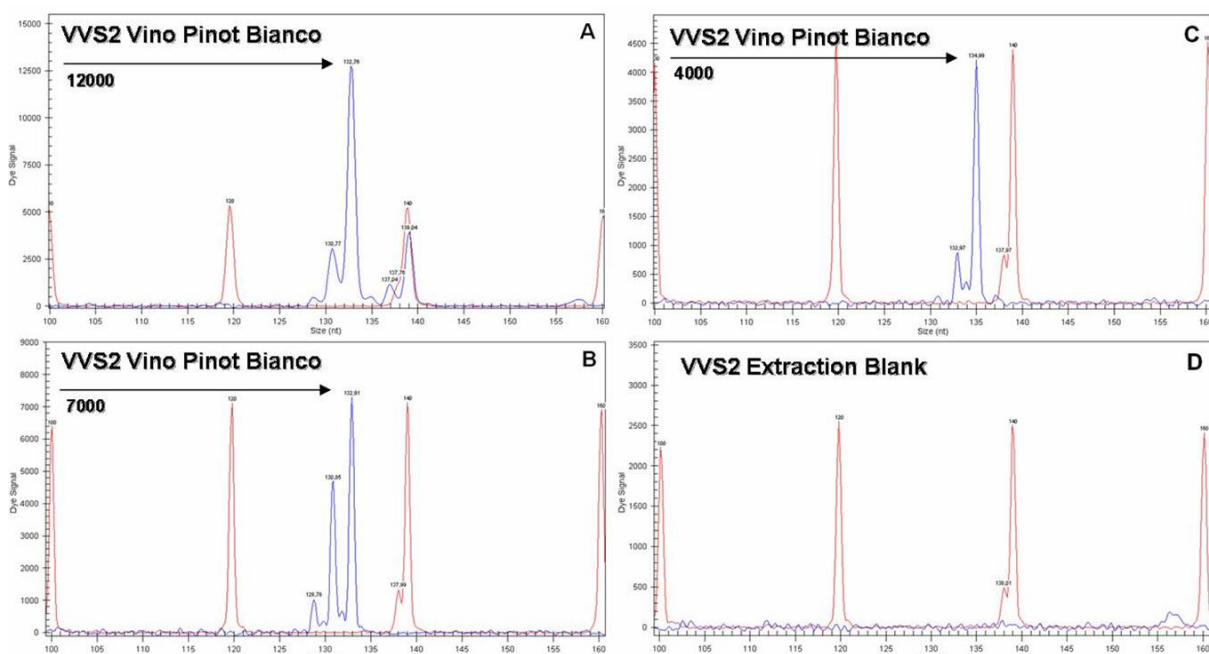


Figura 32. Analisi del DNA estratto da vino commerciale Pinot Bianco con microsatellite nucleare VVS2.

In Figura 33 viene rappresentato l'elettroferogramma relativo all'analisi effettuata sul vino commerciale Pinot Nero con l'SSR cloroplastico CCM10 mentre in Figura 34 il controllo di amplificazione degli SSR cloroplastici CCMP5 eCCMP10 sul bianco di estrazione dello stesso vino. Non disponendo del controllo sulla cultivar corrispondente possiamo solo

osservare che è possibile amplificare marcatori cloroplastici su DNA estratto da vini commerciali e tale amplificazione non è dovuta alla presenza di contaminazione di altro DNA grazie alla verifica sul controllo di estrazione.

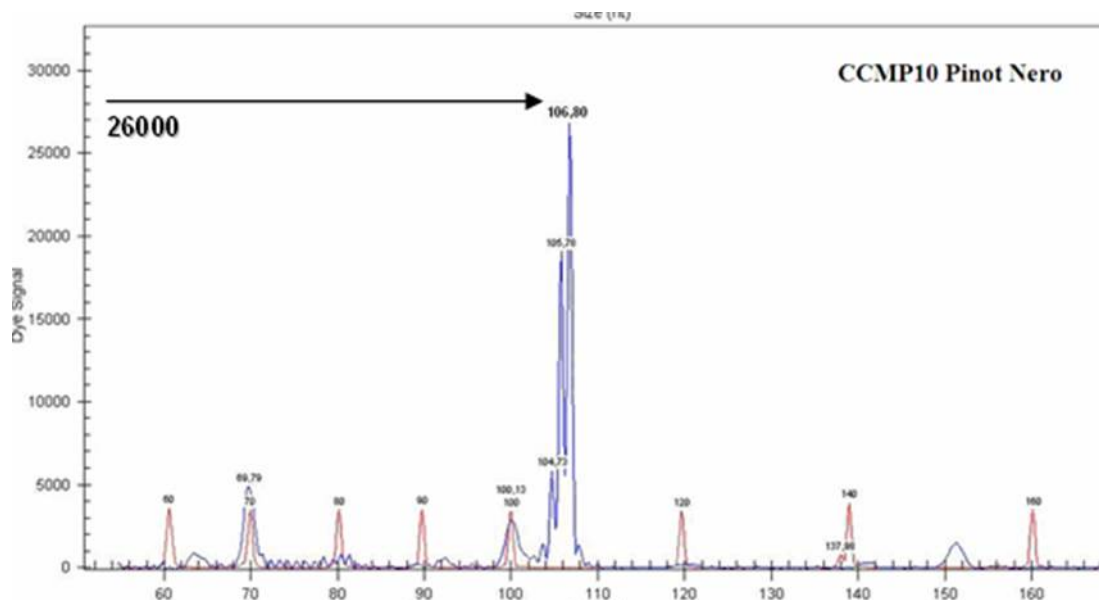


Figura 33. Analisi del DNA estratto da vino commerciale Pinot Nero con microsatellite cloroplastico CCMP10.

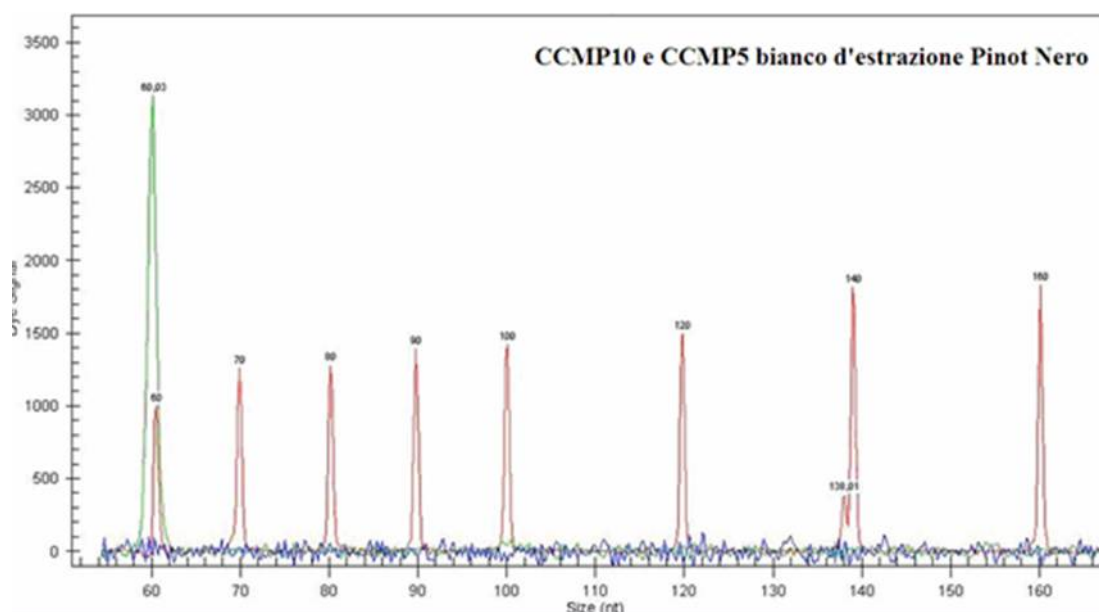


Figura 34. Analisi del controllo negativo di estrazione del vino commerciale Pinot Nero con i microsatelliti cloroplastici CCMP5 e CCMP10.

6.4 Confronto tra vini sperimentali e commerciali

Dalla Figura 35 è quindi possibile visualizzare graficamente la situazione dei diversi marcatori nucleari e cloroplastici utilizzati per questo progetto di tracciabilità.

Il DNA cloroplastico è più facilmente rilevabile in condizioni di DNA degradato e questa caratteristica è evidente soprattutto nell'analisi del DNA estratto da vini commerciali.

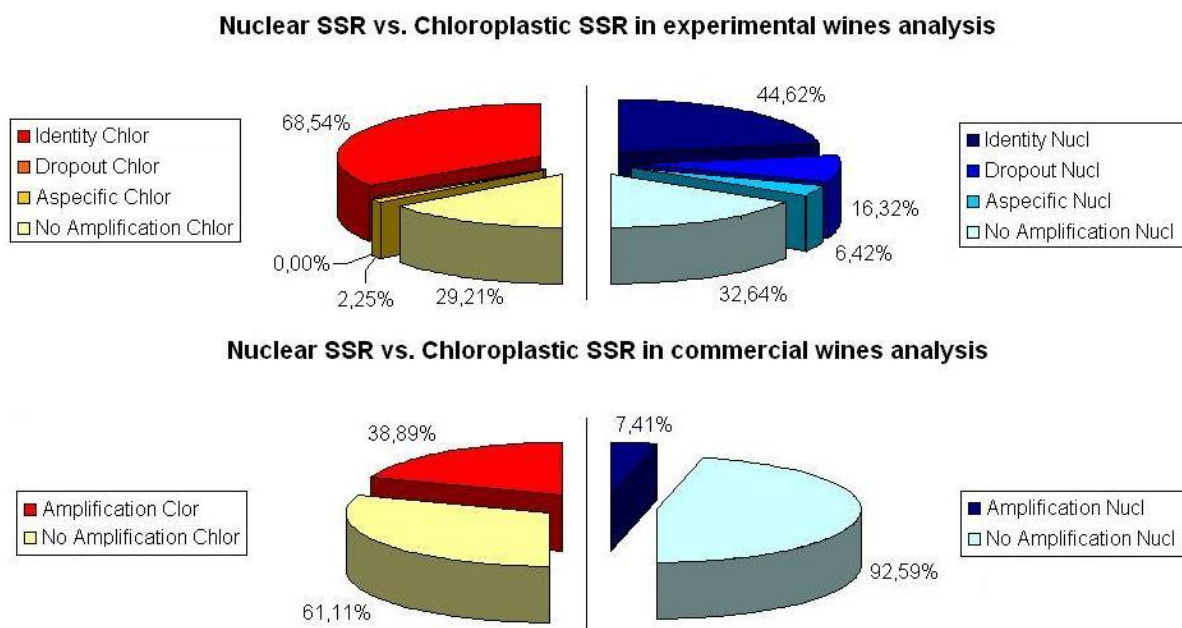


Figura 35. Rappresentazione grafica delle performance di SSR nucleari (a destra in blu) e cloroplastici (a sinistra in rosso) applicati a DNA estratti da vini sperimentali (in alto) e commerciali (in basso).

Dalle diverse figure in cui vengono visualizzati i diversi elettroferogrammi degli SSR è inoltre possibile verificare che i diversi microsatelliti danno risultati diversi in termini di intensità dei picchi allelici a seconda del tipo di SSR (nucleare o cloroplastico) e del tipo di DNA analizzato (di cultivar o di vini sperimentali o commerciali). Se i marcatori nucleari applicati a DNA estratto da cultivar presentano una fluorescenza di 60000-80000 unità, tali marcatori applicati a vini sperimentali dimostrano una fluorescenza ridotta a 5000-8000 unità (Figura 29). Gli SSR nucleari applicati a vini commerciali dimostrano lo stesso livello di fluorescenza degli SSR nucleari applicati a vini sperimentali. Tale fluorescenza si attesta tra 4000 e 12000 unità di fluorescenza (Figura 32). SSR cloroplastici applicati a DNA estratto da vini commerciali presentano invece una fluorescenza di circa 26000 unità (Figura 33).

7. Ricerca nuovi STR

I risultati ottenuti con la ricerca in silico di nuovi SSR su 10 Mbp di genoma nucleare di vite sono i seguenti:

- 538 dinucleotide repeats

- 281 trinucleotide repeats
- 215 tetranucleotide repeats
- 164 pentanucleotide repeats

La ricerca di nuovi marcatori SSR nel genoma cloroplastico ha invece prodotto i seguenti risultati:

- 56 mononucleotide repeats
- 6 dinucleotide repeats
- 9 trinucleotide repeats

Tutti questi SSR putativi sono quindi disponibili per una verifica sperimentali del loro grado di polimorfismo e potrebbero essere quindi una valida risorsa per la tracciabilità nel settore vitivinicolo.

8. Ricerca nuovi marcatori SNP cloroplastici

La ricerca e conferma di SNPs cloroplastici indicati da Jansen et al. all'interno della nostra popolazione di 12 cultivar non ha ottenuto risultati. Nelle Figure 36 e 37 vengono riportate le sequenze degli SNPs putativi rispettivamente dei geni atpI e psbA. Questi risultati confermano quindi il basso grado di polimorfismo degli SNPs e più in generale dei marcatori cloroplastici e che si necessita di un altissimo numero di marcatori di questo tipo per avere un sistema analitico con un alto potere discriminante.

```
atgaatgttctatcatggtccatcaacacactaaaagggttatacगतatctggtgtggaagtoggccaacatttcta
ttggcaaatagggggtttccaagtcocatgccaagtacttattacttctggttgtaatcgctatcttattaggttcag
ctactctagctgttcgaaatccacaaaccattcctactgacggtcagaatctcttcgaaatgctcttgaaattcattcga
gacgtgagcaaaactcagattggagaagaataggttcttgggttccttttattggaactatgtttctatatttttgt
ttcgaattggtcaggggctcttttgccttggaatcatacagttacctcatgggagtttagctgcacccacgaatgata
taaatactactgttgctttagctttactcacatcagtggcctaattctatgcG/Aggctttacaaaaagggattagggt
atctcggtaaatacattcaaccgactccaatccttttacctattaacatcttagaagattttacaaaacctttatcactt
agtttctgacttttcggtaataatattagctgatgaattagtagtgggttcttggttctttagtaccttC/Taattgtt
cctataacctgcatgttccttggattatttacaagtggatcaagctcttatttttgcactttagccgcttatat
aggcgaatccatggagggtcatcattga
```

atpIMPXF
agctttactcacatcagtggccta

atpIMPXR
tccaaggaacatgacaggtatagga

241 bp

Figura 36. Sequenza del gene cloroplastico atpI contenente gli SNP putativi.

atgactgtaatTTtagagagacgcgaaagcgaagcctatggggtcgcttctgtaactggataaccagcactgaaaaccg
tctttacattggatgggttgggttttgatgatcccgaccttattgaccgcaacttctgtatttattatcgcttcattg
ctgcccctccagtagatattgatggtattcgtgaaacctgttctggatctctactttatggaacaatattatctctggt
gccattattcctacttctgcagctatagggttgcacttttaccacaataggggaagcagcatccggttgatgaatggttata
caatgggtggtccttatgagctaattgttctacacttcttacttgggtgtagcttggttacatgggtcgtgaagtgggaactta
gtttccgctcgggtatgctT/CccttgattgctgttgcatattcagctcctggttcagctgctG/Actgctgttttctt
gatctaccaaatgggtcaaggaagcctttctgatggtaTgcctotaggaaatctctggtactttcaacttcattgattgat
tccaggctgagcacaacatccttatgcacccattccacatgttaggcgtagctgggtatttcgggggttccctattcagt
gctatgcatggttcccttggtaacctctagtttgatcagggaaaccacagaaaatgaatctgctaatagcaggttacagatt
cggtaagaggaagaaacttataatattgtggctgctcatggttattttggccgattgatcttccaatagctagtttca
ataattctcgttctttacatttcttctagctgcttggcctgtagtaggtatctggttccactgctttaggtatcagcact
atggctttcaacctaaatggtttcaatttcaaccaatctgtagttgatagccaaggtcgtgtaattaatacttgggctga
tattatcaaccgtgctaaccttggatggaagttatgcatgaacgtaatgctcataatttccctctagatctagctgctg
ttgaagctccatctataaatggataa

psbAMPXE
gtagcttggttacatgggtcgtga

psbAMPXE
agtaccagagattcctagaggca

171 bp

Figura 37. Sequenza del gene cloroplastico psbA contenente gli SNP putativi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dal lavoro svolto durante questo Dottorato permettono di affermare che il **DNA di *Vitis vinifera*** è presente all'interno di vini sperimentali e commerciali ed è possibile estrarre e purificare tale DNA ai fini della sua analisi mediante **marcatori molecolari**. Le metodiche di estrazione sperimentate hanno inoltre permesso di verificare che oltre al DNA dell'organismo vegetale è possibile rilevare la presenza di **DNA di microrganismi**. I passaggi tecnologici e le condizioni ambientali a cui sono sottoposti gli acidi nucleici presenti nel vino sono tali da rompere il **DNA** al punto da ritrovarlo **degradato** e in condizioni di **Low Copy Number** (LCN).

In seguito alle analisi svolte tramite PCR e Real Time PCR è possibile affermare che è possibile amplificare **DNA di *Vitis vinifera*** sia **cloroplastico** che **nucleare** soprattutto negli estratti da pellet dei vini piuttosto che negli estratti da surnatante. Ciò significa quindi che il DNA si ritrova maggiormente nei **residui cellulari** eventualmente presenti nel vino e che nonostante si ritrovi anche in sospensione è più difficilmente amplificabile a causa della presenza di coloranti e metaboliti secondari inibitori delle reazioni di amplificazione.

La quantità di DNA estratto è stata quantificata mediante la tecnica della Real Time PCR e sono state rilevate quantità di DNA dell'ordine dei **nanogrammi** per i vini **sperimentali** e dei **femtogrammi** per vini **commerciali**. Ciò significa che, nonostante i vini sperimentali siano stati prodotti utilizzando le stesse metodiche utilizzate per i vini commerciali, il DNA purificato da bottiglie di vini sperimentali risulta essere in maggiore quantità e quindi meglio analizzabile. Per questo motivo la messa a punto del migliore metodo di estrazione è stata comunque eseguita su vini commerciali. Allo stesso modo la ricerca del DNA di lievito ha avuto maggiore successo su vini sperimentali ma ulteriori approfondimenti soprattutto con la tecnica della Real Time PCR possono avere successo anche sui vini commerciali soprattutto al fine di seguire l'evolversi della composizione del consorzio microbico presente durante e dopo la fermentazione del mosto.

I marcatori molecolari SSR applicati ai vini sperimentali ci hanno permesso di verificare **l'applicabilità dei marcatori a DNA estratto da vini finiti**, la **corrispondenza dei risultati ottenuti con la corrispondente cultivar** di produzione e di scoprire quali siano i marcatori SSR più indicati per questa applicazione. Alcuni SSR nucleari (VVS2 e VrZAG62) sono risultati essere i migliori in termine di polimorfismo e applicabilità al DNA estratto da vino ma gli SSR cloroplastici sono risultati essere i marcatori più indicati in condizioni di DNA

degradato e LCN. Questa condizione ideale è dovuta alla presenza del genoma cloroplastico in un alto numero di copie ma è purtroppo controbilanciata da un bassissimo grado di polimorfismo dei marcatori cloroplastici.

La possibilità di applicare marcatori molecolari SSR sia nucleari che cloroplastici è stata verificata anche su vini commerciali senza però purtroppo avere la disponibilità di confronto con la cultivar di riferimento. Abbiamo quindi potuto soltanto osservare la presenza di alleli sia per i marcatori nucleari che cloroplastici in assenza di contaminazione dei controlli di estrazione e di PCR.

Per superare i problemi di basso grado di polimorfismo dei marcatori cloroplastici, ideali per analizzare DNA degradato e LCN, è quindi opportuno allargare il numero di marcatori da utilizzare per la tracciabilità del vino puntando soprattutto su marcatori SSR tri- tetra- e penta-nucleotidici, che permetterebbero di superare eventuali problemi di Stutter e Shadow Bands.

Altri marcatori adatti allo scopo sono gli SNPs sia nucleari che cloroplastici che possono permettere tramite la Real Time PCR di quantificare l'apporto di diverse cultivar all'interno di miscele di vini e verificare quindi la veridicità di quanto dichiarato in etichetta.

Un pannello completo di marcatori nucleari e cloroplastici sia SSR che SNPs permetterà quindi di inizialmente di raggiungere la tracciabilità su vini commerciali che secondo il Disciplinare di Produzione debbano essere preparati in purezza con uve proveniente da una singola cultivar. In seguito sarà quindi possibile allargare la metodologia di analisi molecolare a quei vini il cui Disciplinare di Produzione prevede la composizione di miscele di uve cercando di identificare le cultivar estranee o i rapporti con cui tali miscele sono state composte.

Se tale approccio avrà in futuro successo si può pensare di creare una banca dati del DNA dei vini e delle viti così come recentemente è stata istituita la banca dati del DNA italiana ai fini dell'identificazione forense di persone che hanno commesso dei crimini.

La comparazione tra la banche dati molecolari, insieme alle analisi chimiche di metaboliti e proteine permetterà raggiungere una tracciabilità completa sia in termini di identificazione varietale che di identificazione geografica dei vini analizzati.

Si potrà quindi integrare tutte le indicazioni di qualità già presenti in etichetta, tutelare i prodotti ad alto valore aggiunto DOC e DOCG e difendere i consumatori da frodi alimentari.

Nella Figura 38 viene visualizzato graficamente come potrà svilupparsi la tracciabilità molecolare nella filiera vitivinicola grazie alla Food Genomics e alla sua integrazione con le analisi chimiche che già vengono svolte sui prodotti vitivinicoli.

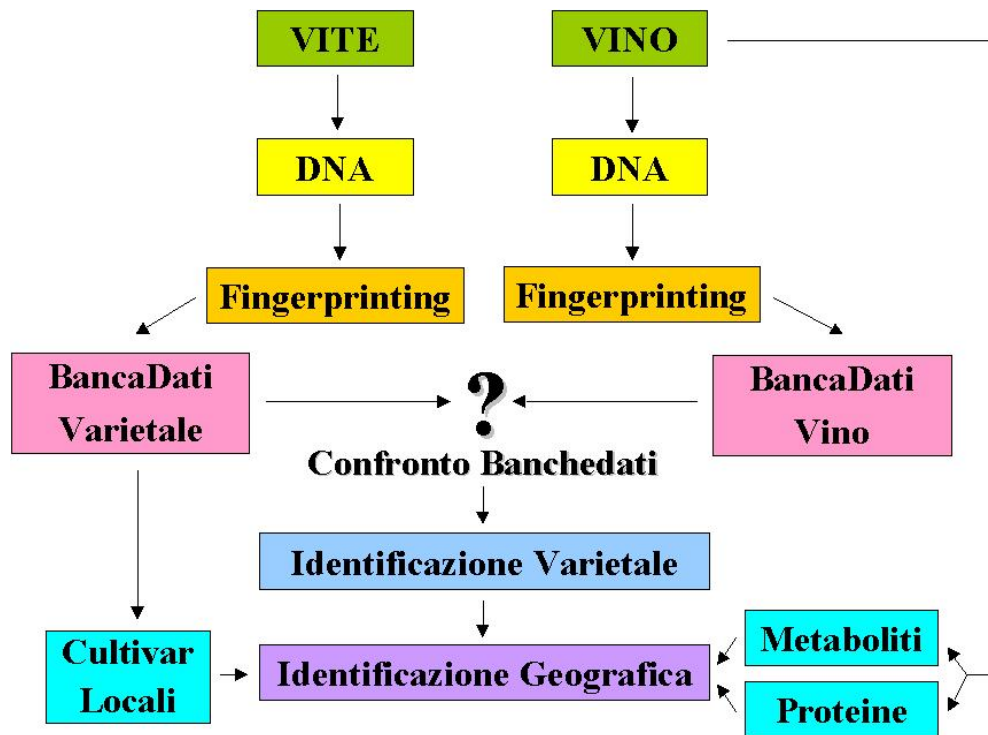


Figura 38. Tracciabilità molecolare della filiera vitivinicola.

BIBLIOGRAFIA

1. Alleweldt, G.; Dettweiler-Münch, E. The genetic resources of *Vitis*. World list of grapevine collections. **1994**, 2^a Ed., Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof. Siebeldingen.
2. Angerosa, F.; Bréas, O.; Contento, S.; Guillou, C.; Reniero, F.; Sada, E. Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1013-1017.
3. Arroyo-García, R.; Lefort, F.; De Andrés, M.T.; Ibáñez, J.; Borrego, J.; Jouve, N.; Cabello, F.; Martínez-Zapater, J.M. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species. *Genome* **2002** *45*: 1142-1149.
4. Bauer, T.; Weller, P.; Hammes, W.P.; Hertel, C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Res. and Tech.* **2003**, *217* (4), 338-343.
5. Belaj, A.; Trujillo, I.; De la Rosa, R.; Rallo, L. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2000**, *126* (1), 64-71.
6. Breton, C.; Claux, D.; Metton, I.; Skorski, G.; Bervillé, A. Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (3), 531-7.
7. Busconi, M.; Foroni, C.; Corradi, M.; Bongiorno, C.; Cattapan, F.; Fogher, C. DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chem.* **2003**, *83*, 127-134.
8. Butler, J.M. Forensic DNA typing. *Elsevier Academic Press*, **2005**.
9. Cervera, M.T.; Cabezas, J.A.; Sancha, J.C.; Martínez de Toda, F.; Martínez Zapater, J.M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.* **1998**, *97*, 51-59.
10. Consolandi, C.; Palmieri, L.; Doveri, S.; Maestri, E.; Marmioli, N.; Reale, S.; Lee, D.; Baldoni, L.; Tosti, N.; Severgnini, M.; De Bellis, G.; Castiglioni, B. Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format. *J. Biotechnol.* **2007**, *129* (3), 565-74.
11. Doveri, S.; O'Sullivan, D.M.; Lee, D. Non-concordance between genetic profiles of olive oil and fruit: a cautionary note to the use of DNA markers for provenance testing. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (24), 9221-6.

12. Faria, M.A.; Magalhães, R.; Ferreira M.A.; Meredith, C.P.; Ferreira Montero, F. *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1096-1100.
13. Fisher, R.A. Standard calculations for evaluating a blood group system. *Heredity* **1951**, *5*: 95-102.
14. French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, **2007**, *449* (7161), 467-7.
15. Galet, P. Dictionnaire encyclopédique des cépages. *Achette, Paris* **2000**.
16. Holliday, R.; Grigg, G.W. DNA methylation and mutation. *Mutat. Res.* **1993**, *285* (1), 61-7.
17. Jansen, R.K.; Kaittani, C.; Saski, C.; Lee, S-B.; Tomkins, J.; Alverson, A.J.; Daniell, H. Phylogenetic analyses of *Vitis* (Vitaceae) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evolutionary Biology* **2006**, *6*, 32.
18. Kwon, S.W. Profiling of Soluble Proteins in Wine by Nano-High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (24), 7258-63.
19. Lo Piparo, G. Principali frodi agro-alimentari, organi di controllo e modalità di accertamento, *Ministero delle politiche agricole e forestali*, **2003**.
20. Lodhi, Muhammad A.; Guang-Ning Ye; Norman F. Weeden; Bruce I. Reisch. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1994** *12* (1): 6-13.
21. Martin, G.J; Mazure, M.; Jouitteau, C.; Martin, Y.-L.; Aguilé L.; Allain, P. Characterization of the Geographic Origin of Bordeaux Wines by a Combined Use of Isotopic and Trace Element Measurements. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**.
22. Martinelli, L.A.; Moreira, M.Z.; Ometto, J.P.; Alcarde, A.r.; Rizzon, L.A.; Stange, E.; Ehleringer, J.R. Stable carbon isotopic composition of the wine and CO₂ bubbles of sparkling wines: detecting C₄ sugar additions. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2625-2631.
23. Moreno-Arribas, M.V.; Cabello, F.; Polo, M.C.; Martin-Alvarez, P.J.; Pueyo, E. Assesment of the native electrophoretic analysis of total grape must proteins for the characterization of *Vitis vinifera* L. Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 114-120.

24. Muñoz-Organero, G.; Ortiz, J.M. Aroma compounds in grapes from cultivars grown in the Comunidad de Madrid (Spain). *Riv. Vitic. Enol.* **1997**, *3*, 55-64.
25. Naqvi, N. I.; Chattoo, B. B. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. *Genome* **1996**, *39*, 26-30.
26. Ogrinc, N.; Košir, I.J.; Kocjančič, M.; Kidrič, J. Determination of authenticity, regional origin, and vintage Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1432-1440.
27. Pafundo, S.; Agrimonti, C.; Maestri, E.; Marmioli, N. Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (15), 6052-9.
28. Pafundo, S.; Agrimonti, C.; Marmioli, N. Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (18), 6995-7002.
29. Piparo, G. Principali frodi agro-alimentari, organi di controllo e modalità di accertamento, *Ministero delle politiche agricole e forestali*, **2003**.
30. Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J.M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*, 53-60.
31. Sensabaugh, G.F. Biochemical markers of individuality. In *Forensic Science Handbook*. Saferstein R. (ed) Prentice Hall, New York, **1982**, 338-415.
32. Sicheri, G. Il libro completo del vino. *De Agostini editore*, **2003**.
33. Sicheri, G. Tecnologie agrarie. *Hoeppli editore*, **1999**.
34. Siret, R.; Boursiquot, J.M.; Merle, M.H.; Cabanis, J.C.; This, P. Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5035-5040.
35. Siret, R.; Gigaud, O.; Rosec, J.P.; This, P. Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3822-3827.
36. This, P.; Cuisset, C.; Boursiquot, J.M. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationship. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 492-501.
37. This, P.; Jung, A.; Boccacci P.; Borrego, J.; Botta, R.; Costantini, L.; Crespan, M.; Dangl, G.S.; Eisenheld, C.; Ferreira-Monteiro, F.; Grando, S.; Ibáñez, J.; Lacombe, T.; Laucou, V.; Magalhães, R.; Meredith, C.P.; Milani, N.; Peterlunger, E.; Regner, F.; Zulini, L.;

- Maul, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **2004** *109*: 1448-58.
38. Thomas, M.R.; Cain, P.; Scott, N.S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* **1994**, *25*, 939-949.
39. Vasconcellos, A.M.P.; Chaves das Neves H.J. Characterization of elementary wines of *Vitis vinifera* varieties by pattern recognition of three amino acids profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 931-937.
40. Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4407-4414.
41. Weir, B.S. Genetic Data Analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, MA: Sinauer associates. **1996**, 141-150.
42. Welsh, J.; McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18* (24), 7213-8.
43. Zohary, D; Spiegel-Roy, P. Beginning of fruit growing in the Old World. *Science.* **1975**, *187*, 319-327.

ALLEGATI

1. Primer specifici per *Maturasi K* di *Vitis vinifera*

1 cactttctta tgatcatggt ttaaacagat ctattttggt ggaaaatgtg ggttatgaca
 61 ataaatccag tttactaatt gtgaaacggt taattacgcy aatgtatcaa cagaatcatt
 121 tgattttttc tgattctaatt caaaatccat tttttggaca caataagaat ttttattctc
 181 aatgatatac agagggattt ggagtcattg tggaaattcc attttcccta cgattagtct
 241 cttctctaga aggtaaagaa atagcaaaat ctcataattt acgatcaatt cattcaatat
 301 ttcctttttt agaggacaaa ttcccacatt taaagtatgt gtcagatata ctaatacccc
 361 accccatcca tctggaaatc ttggttcaag cccttcgta ctgggtgaaa gatgcctctt
 421 ctttgcattht attacgattc tttctacacg agtatcataa ttggaatagt atgattactc
 481 caaagaaatc aattttcatt ttttcaaaaa ggaatcaaag atttttctta ttctatata
 541 attttcatgt atgtgaatac gactctatct tcatttttat ccgcaatcaa tcttatcatt
 601 tacgatcaac atcttatgga gcccttcttg ggcgaatatt tttctatgga aaaatagagc
 661 attttgtcga agtctttgct aatgattttc agacaatctt atggttgttc aagaatcctt
 721 tcatgcatta tgttaggtat caaggaaaat ccattctggc ttcaaaaggg ggcctcttc
 781 tgatgaataa atggaaatat taccttgtca atttctggca atgtcatttt tacgtgtggg
 841 ctcaaccagt aaggatccat ataaaccaat tatccaagca ttccctcgac tttctgggct
 901 atctttcaag tgtgcgacta aatccttcag tggtagggag tcaaatgcta gaaaatgcat
 961 ttataataga taatgctatt aagaagtctg atactatagt tccaattatt cctatcattg
 1021 gat **cgttggc** **taaagcgaga** **tt**ttgtaatg ccttagggca tccattagt aagccgtcct
 1081 gggccgattc atcagattat gatattatcg accgatttgt gcgtatatgc agaaatattt
 1141 ctattatca cagtggatcc tcaaaaaaaaa agaatttgta tcgaatcaaa tatatacttc
 1201 gacttt**cttg** **tgctcgaact** **ttgg**ctcgt aacacaaaag tactgtacgt gcttttttga
 1261 aaagattagg gtcggaattt ttggaagaat tccttacaga ggaagaacaa gctctttctt
 1321 taatcttacc aagagtttct tctacttcgc gaagcttata taggggacgt ttttggatt
 1381 ttgatattat ttgtatcaat gatctagcca atcatgaata attggttatg aaaccatgta
 1441 aatataaatt atccctaaat gataaaaaaaaa attcatttct attctgaaat gttcatgcat
 1501 gaaaatgttca tgcagtaagg gttgaattaa ctgagtaatc aactttctta gagtcacgtc
 1561 taggggagga actgggtttt agatgtatac atagggaaag ccgtgtgcaa tcaaaaaagc
 1621 aagcacggct tggggaggga tttttt

2. Primer specifici per *Rasveratrolo Sintasi* di *Vitis vinifera*

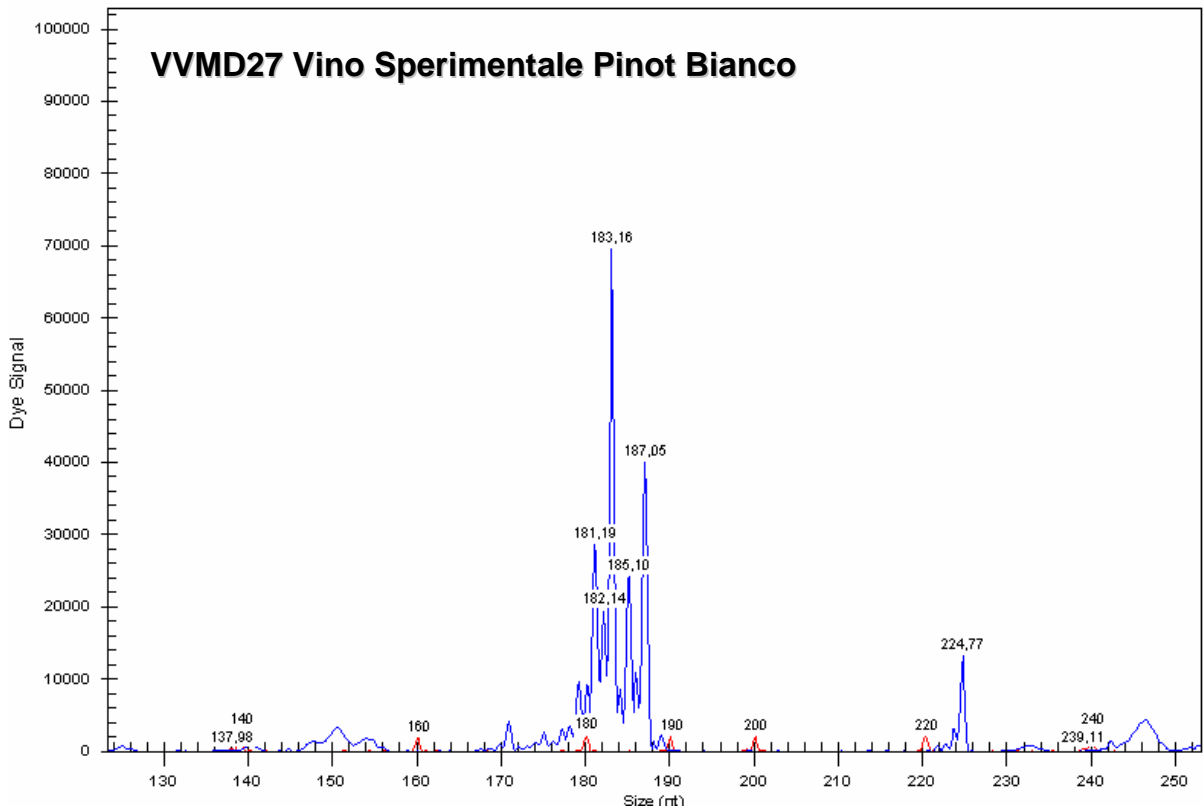
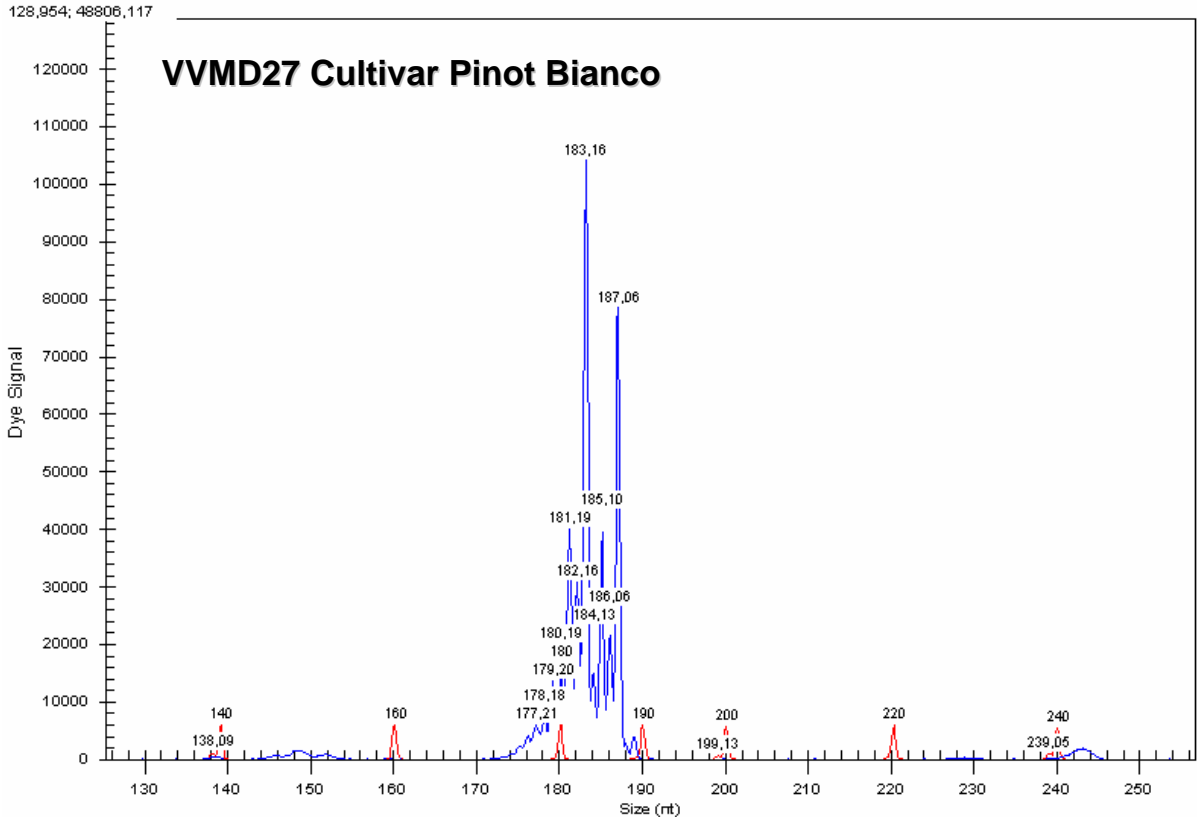
1 atggcttcag tgcaggaatt tagaaacgct caacgtgcca agggctccggc caccatccta
 61 gccattggca cagctacccc cgaccactgt gtctaccagt ctgattatgc tgatttctat
 121 ttcaggggtca ctaagagcga gcacatgact gcggtgaaga agaagttcaa tcgcatatgt
 181 aagtatattc atgcattaat ttcttacatg cttaacagtt ctgtatata gtgactgaca
 241 ctagggtgagg ctcacctcca agtgaatgaa tgttgcaatc tttctagagt atagctttta
 301 gataaaatac tacagaaaac ttgaaaatta ttttacctca gtagctaata ttcatthcat
 361 ctgactgaaa tggcttgaag agctgttctt tgaatcatgt cgcattgcca gctataatta
 421 agaataacct tctatacttg cttcaatggt aaatgcatgt cgatcatctt caacgatatt
 481 ctatatcact tgttgattgg taaaactaat gtgttcatgt tatttcattt acaggtgaca
 541 aatccatgat caagaagcgt tacattcatt tgaccgaaga aatgcttgag gagcacccaa
 601 acattgggtgc ttatatggct ccatctctta acatacgcca agagattatc actgccgagg
 661 tacccaagct cggtaaggaa gcagcgttga aggccttaa agagtggggt cagcctaaat
 721 cgaagatcac ccaccttgta ttttgtacca cctcagggtg agaaatgcct ggtgcagatt
 781 ataaactcgc taatctctta ggctcgaac catctgtcag aagagtgatg ttgtaccatc
 841 aaggggtgcta tgcaggtgga actgtccttc gaactgctaa ggatcttgca gagaataatg
 901 caggagcacg agttcttgtg gtgtgctctg agatcacagt tgttacattt cgcggccctt
 961 ccgaagatgc tttggactct ttagttggcc aagccctttt tgggtgatggg tctgcagctg

1021 taatcgtagg atcagatccg gatatctcaa ttgaacgacc actcttccag cttgtctcag
 1081 cagcccaaac atttattcct aattctgcag gtgccattgc aggaaactta cgtgaggtgg
 1141 gactcacctt tcatttgtgg cccaatgtgc ccactttaat ttctgagaac atagagaaat
 1201 gtttgactca ggc ttttgac ccacttggtt ttagcgattg gaactcgta ttttgattg
 1261 ctcaaccagg tggccctgca attcttgatg cagttgaagc aaaactcaat ttagataaaa
 1321 agaaactcga agcaacgagg catgtgctaa gtgagtatgg aaacatgtca agtgcattgtg
 1381 tgttgtttat tttggatgag atgagaaaaga aatcccttaa gggggagagg gccaccacgg
 1441 gtgaaggatt ggattgggga gtattattcg gttttggacc aggcttgact attgaaactg
 1501 ttgtgttaca tagcattcct atggttatac attaagcc

3. Primer specifici per RNA ribosomale di *Saccharomyces cerevisiae*

1 gtccgatcaa ctgtagttaa gctggtgaaga gcctgaccga gtagtgtagt gggtgaccat
 61 acgcgaaact caggtgctgc aatccttatt tctttttttt tttttttttt tttttttttt
 121 tctagtttct tggcttccta tgctaaatcc cataactaac ctaccattcg attcagaaaa
 181 attcgcacta tccagctgca ctcttcttct gaagagttaa gcactccatt atgctcattg
 241 ggttgctact acttgatatg tacaacaat attctctctc gatattccta caaaaaaaaa
 301 aaaaaaaaaa ctccggtttt gttctcttcc ctccatttcc ctctcttcta cggttaatac
 361 tttcctcttc gtctttttct acaccctcgt ttagttgctt cttattcctt cccgctttcc
 421 tgcactaaca ttttgccgca ttacactata tgatcgtagt acatcttaca actccgcata
 481 ccgcgtcgcc gcgtcgccgc gtcgcaaaa atttacttcc ccaaccattc catatctggt
 541 aagtatacat gtatatattg cactggctat tcatcttgca cttttcctct ttcttcttcc
 601 cagtagcctc atccttttac gctgcctctc tggaaactgc catcatcatt ccctagaaac
 661 tgccatttac ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaatgtccc cactgttcac tgttcaactgt
 721 tcaacttgtct cttacatctt tcttggtaaa atcgtagttc gtagtatttt ttttcatatc
 781 aaaggcatgt cctgttaact ataggaatg agcttttctc aattctctaa acttatacaa
 841 gcactcatgt ttgccgctct gatggtgcgg aaaaaactgc tccatgaagc aaactgtccg
 901 ggcaaatcct ttcacgctcg ggaagctttg tgaaagccct tctctttcaa cccatctttg
 961 caacgaaaaa aaaaaaaaaa ataaaaaata aaaagaccaa atagtaaata gtaacttaca
 1021 tacattagta aatggtacac tcttacacac tatcatcctc atcgtatatt ataatagata
 1081 tatacaatac atgtttttac ccgatcata gaattcttaa gacaaataaa atttatagag
 1141 acttgttcag tctacttctc tctaaactag gccccggctc ctgccagtac ccacttagaa
 1201 agaaataaaa aacaaatcag acaacaaagg cttaatctca gcagatcgta acaacaaggc
 1261 tactctactg cttacaatac cccgttgtac atctaagtcg tatacaaatg atttatccc
 1321 acgcaaaatg acattgcaat tcgccagcaa gcaccaagg cttttccgcc aagtgcaccg
 1381 ttgc

4. Confronto Cultivar – Vino Sperimentale



RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto il mio più grande ringraziamento va al Professor Nelson Marmioli che ha messo a disposizione tutte le risorse disponibili e soprattutto la sua pazienza per affrontare la ricerca nel campo della tracciabilità nel settore vitivinicolo.

Un doveroso ringraziamento va ad Elena Maestri e a Caterina Agrimonti così pazienti e determinanti per superare i piccoli e grandi problemi sorti durante il lavoro.

Desidero inoltre ringraziare tutte le persone che lavorano nei laboratori in cui ho svolto il Dottorato: Marta Marmioli, Aliosha Malcevschi, Giovanna Visioli, Annamaria Sanangelantoni, Simona Pafundo, Marina Malatrasi, Andrea Pirondini, Chiara Rustichelli, Elisa Trivelloni, Michelangelo Vietina, Manuela Turci, Cristina Samson, Claudia Pellacani, Urbana Bonas, Daniel Campioli, Irene Della Ghezza, Andrea Pompele.

Tra questi ringrazio soprattutto Michelangelo per essere stati compagni di avventura durante tutto il percorso affrontato.

Grazie alla mia famiglia, papà Luigi, mamma Silvana e Fabio che, nonostante i chilometri che ci separano, mi sono sempre vicini e mi consigliano nelle decisioni difficili.

Da ringraziare sono anche Eddie, Mike, Stone, Jeff e Matt per la loro indispensabile musica che ha allietato i momenti di svago.

Grazie di cuore a tutte queste persone ed anche a chi ho tralasciato ma che in questi anni di avventura da dottorando mi è stato vicino.

Damiano