

Italus Hortus

Rivista scientifica di
orticoltura, floricoltura e frutticoltura

Fondata nel 1993

Atti del

Il Convegno Nazionale di Viticoltura

PARTE I

Marsala, 14-19 luglio 2008



Publicata dalla Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (SOF)

Volume 17, Suppl. al n. 3

maggio-giugno 2010

Italus Hortus

Rivista bimestrale scientifica
di orticoltura, floricoltura e frutticoltura
Volume 17, Suppl. al n. 3, maggio-giugno 2010

Politica editoriale - Italus Hortus pubblica articoli scientifici su argomenti di interesse per l'orticoltura, la floricoltura e la frutticoltura italiana in volumi dedicati a "Review" e volumi dedicati ad Atti di Convegni patrocinati dalla SOI (Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana). Di norma, il primo ed il quarto numero di ogni anno includono le raccolte delle "Review" indicate da un numero romano progressivo. Gli articoli "Review" sono in genere "ad invito", ovvero sollecitati dal Comitato Editoriale, ma possono anche rappresentare traduzioni di articoli pubblicati su "Journals" o testi di relazioni a Convegni nazionali od internazionali. Le "Review" sono soggette a "peer review" - da parte del Comitato Editoriale e di "referees" esterni - prima della loro accettazione definitiva per la stampa. Gli autori che vogliono proporre autonomamente una "Review" devono consultare il Comitato Editoriale prima della sua sottomissione. La pubblicazione degli articoli nei numeri dedicati agli Atti di Convegni è sotto la responsabilità dell'Organizzatore e del Comitato Scientifico del Convegno stesso. Tutti i contributi sono in italiano, con un ampio "Summary" e didascalie di tabelle e figure in lingua inglese.

Aims and Scope - *Italus Hortus publishes contributions of relevance to the italian horticulture either through issues including solicited review articles or through Proceedings of Conferences organized under the aegis of Italian Society for Horticultural Sciences (SOI). Review articles are normally written on invitation from the Editorial Board and subjected to peer review before final acceptance. Intending authors of review papers are advised to consult the Editors before submission. The publication of articles in the issues devoted to Conference Proceedings is under the responsibility of the Convenor and the Scientific Committee of the Conference. All contributions appear in Italian with an extended summary, captions and legends in English.*

Direttore Responsabile/Managing Editor
Elvio Bellini, *Università di Firenze*

Direttore Scientifico/Editor
Massimo Tagliavini, *Libera Università di Bolzano*

Comitato Editoriale /Associate Editors
Gianluca Burchi, *CRA - VIV, Pescia (PT)*
Stefania De Pascale, *Università di Napoli "Federico II"*
Alessandra Gentile, *Università di Catania*
Giorgio Giaquinto Prosdocimi, *Università di Bologna*
Riccardo Gucci, *Università di Pisa*
Cherubino Leonardi, *Università di Catania*
Silvana Nicola, *Università di Torino*
Stefano Poni, *Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Segreteria Editoriale / Secretary
Francesco Baroncini, *Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana*

Editore: Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (SOI), Firenze

Direzione e Redazione: SOI Viale delle Idee, 30 - 50019 Sesto Fiorentino (FI); tel. 055.4574067; fax 055.4574071;
e-mail: soifi@unifi.it; sito web: <http://www.soih.it>

Stampa: F&F Parretti Grafiche - Via Stazione delle Cascine, 20 - 50145 Firenze

Distribuzione: vendita esclusiva per abbonamento. L'importo per l'abbonamento a questo periodico è escluso dal campo di applicazione dell'IVA ai sensi e per gli effetti del combinato disposto dall'art. 22 della legge 25 febbraio 1987, n. 67, e dell'art. 2, 3° comma, lett.1, del d.p.r. 26 ottobre 1972, n. 633, e successive modificazioni ed integrazioni

Abbonamento annuo: Italia: € 50,00 (personale); € 100,00 (ente); Estero: € 100,00

Prezzo di un numero: € 8,00/11,00; Prezzo di una copia arretrata: € 16,00; Prezzo di una copia Numero Speciale: € 18,00/20,00

La rivista viene inviata gratuitamente ai Soci della SOI. Gli abbonamenti o i singoli numeri si ricevono dietro versamento dell'importo corrispondente sul c/c postale n. 18650507 intestato alla SOI, viale delle Idee 30 - 50019 Sesto F.no (FI)

Pubblicazione registrata presso il tribunale di Firenze al n. 4609 del 1 agosto 1996

Spedizione in abbonamento postale, art. 2, comma 20, lettera C, legge 662/96 - Firenze

ISSN 1127-3496

© 2008 by SOI - Firenze

Finito di stampare nel mese di giugno 2010

Atti del II Convegno Nazionale di Viticoltura

Marsala, 14 - 19 luglio 2008
Complesso Monumentale S. Pietro

COMITATO SCIENTIFICO - EDITORIALE

MARIA GABRIELLA BARBAGALLO, Università degli Studi di Palermo
LAURA DE PALMA, Università degli Studi di Foggia
ROSARIO DI LORENZO, Università degli Studi di Palermo
CESARE INTRIERI, Università degli Studi di Bologna
CLAUDIO GIULIVO, Università degli Studi di Padova
VITTORINO NOVELLO, Università degli Studi di Torino
VITALE NUZZO, Università degli Studi della Basilicata
ALBERTO PALLIOTTI, Università degli Studi di Perugia
EUGENIO POMARICI, Università degli Studi di Napoli "Federico II"
STEFANO PONI, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
DUILIO PORRO, Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Fondazione Edmund Mach
VITO SAVINO, Università degli Studi di Bari
GIANCARLO SCALABRELLI, Università degli Studi di Pisa
ORIANA SILVESTRONI, Università Politecnica delle Marche, Ancona
PAOLO STORCHI, CRA - Istituto Sperimentale per la Viticoltura, Arezzo

COMITATO ORGANIZZATORE

GIACOMO ANSALDI, Centro per l'innovazione della filiera vitivinicola "Ernesto Del Giudice", Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana
MARIA GABRIELLA BARBAGALLO, Università degli Studi di Palermo
DARIO CARTABELLOTTA, Dirigente Generale Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana
ROSARIO DI LORENZO, Università degli Studi di Palermo
VITO FALCO, Centro per l'innovazione della filiera vitivinicola "Ernesto Del Giudice", Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana
PAOLO GIRGENTI, Dirigente Servizio allo Sviluppo, Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana
ANTONINO PISCIOTTA, Università degli Studi di Palermo

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

ANTONINO PISCIOTTA, Università degli Studi di Palermo
TANINO SANTANGELO, Università degli Studi di Palermo
PIETRO SCAFIDI, Università degli Studi di Palermo

Esplorazione della variabilità a loci marcatori e funzionali nelle varietà di vite della Sicilia

Oliveri F.^{1*}, Gebbia N.¹, Moreira F.M.², Cartabellotta D.³, Grando M.S.²

¹ Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura, via G. Marinuzzi 3, 90129 Palermo

² Fondazione Edmund Mach, Istituto Agrario San Michele all'Adige, via E. Mach 1, 38010 S. Michele all'Adige (TN)

³ Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana

Genomic variability by molecular and functional markers in Sicilian *Vitis vinifera* varieties

Abstract. Indigenous grape cultivars identified in old Sicilian vineyards were collected from *ex situ* collection fields. A total of 383 grapevine accessions were analysed at 6 microsatellite *loci* in order to evaluate their genetic identity. The results showed the real diversity of this germplasm and pointed out a strong relationship between the Sicilian and Calabrian germplasm and occasional identities with Sardinian, French and Spanish cultivars. The main traditional Sicilian varieties showed unique molecular profiles. Our work aims to outline the Sicilian gene pool, contributing to the knowledge of the vine flows that have marked the germplasm of the island. Moreover, by exploring single nucleotide polymorphisms in expressed genes, we started a functional characterization of the principal quality cultivars of Sicilia.

Key words: grapevine molecular characterization, microsatellites, single nucleotide polymorphism.

Introduzione

La coltivazione della vite e la produzione di vino sono diffuse in tutto il territorio siciliano e il patrimonio ampelografico dell'isola è piuttosto interessante.

La moderna viticoltura commerciale dell'isola è sempre più orientata alla scelta di materiale viticolo di elevata qualità, non solo per lo stato sanitario, ma anche per la corrispondenza varietale. Le varietà maggiormente coltivate sono rappresentate dal Catarratto e dal Nero d'Avola ed, in misura minore, da altre cultivar autoctone tra le quali l'Inzolia, il Grecanico, il Grillo, i Nerelli etnei, il Frappato e lo Zibibbo. Grazie al progetto sulla valorizzazione dei vitigni autoctoni siciliani è stato censito e studiato tutto il patrimonio viticolo siciliano. Numerose accessioni di vite sono

state individuate negli ultimi anni nei vecchi vigneti del territorio siciliano, e raccolte in campi collezione per la loro valutazione. La caratterizzazione delle varietà di vite con marcatori del DNA offre la possibilità di valutare l'effettiva diversità del germoplasma recuperato e di stabilire il profilo molecolare riconoscitivo delle varietà di interesse vivaistico.

I marcatori del DNA scelti per la caratterizzazione dei vitigni sono stati i "microsatelliti" ovvero i marcatori molecolari di elezione per la definizione delle identità e le relazioni genetiche delle varietà di *Vitis vinifera*, come dimostrato da un'ampia letteratura.

Altri marcatori molecolari molto promettenti sono gli SNPs, che possono essere usati ad esempio per l'identificazione delle cultivar, la costruzione di mappe genetiche, la valutazione delle diversità genetiche, la ricerca di associazioni genotipo/fenotipo, o il breeding assistito da marcatori (Flint-Garcia *et al.*, 2005; Simko *et al.*, 2004; Szalma *et al.*, 2005). Questi tipi di polimorfismi possono essere rilevati anche all'interno di regioni codificanti. Ci sono ora evidenze che gli SNPs sono molto abbondanti nel genoma di vite (Lijavetsky *et al.*, 2007). Potrebbero pertanto essere questi i polimorfismi responsabili delle variazioni del fenotipo che si osservano all'interno delle varietà di vite e portano alla comparsa dei cloni.

L'obiettivo del presente lavoro è quello di caratterizzare a livello molecolare tutti i vitigni siciliani e di creare una banca dati di riferimento per la tracciabilità su base genetica dei materiali di produzione vivaistica.

Materiale e metodi

Campionamento

L'attività di campionamento è consistita essenzialmente nel prelievo di giovani foglie o parti di giovani fusti dei maggiori vitigni autoctoni siciliani per un totale, ad oggi, di 383 campioni (tab. 1) tra varietà a bacca bianca e nera, sia di interesse regionale (Grillo, Inzolia, Catarratto, Grecanico, Frappato, Nero d'Avola, Nerello mascalese) che locale (Carricante, Minnella bianca, Albanello, Damaschino, Moscato,

* francescaoliveri@coribia.it

Tab. 1 - Vitigni e Portinnesti analizzati.
 Tab. 1 - Grape cultivars and Rootstocks analysed.

| Cultivar a bacca bianca | N. campioni | Cultivar a bacca nera | N. campioni | Portinnesti | N. campioni |
|-------------------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| Albanello | 3 | Alicante | 30 | 17.37 | 2 |
| Carricante | 26 | Frappato | 11 | 1447 | 3 |
| Catarratto | 32 | Minella Nera | 9 | 420A | 3 |
| Damaschino | 4 | Nerello Capuccio | 23 | 41B | 2 |
| Grecanico | 29 | Nerello Mascalese | 40 | 157.11 C | 1 |
| Grillo | 10 | Nero D'Avola | 42 | 161.49C | 3 |
| Inzolia | 32 | Nocera | 9 | 34 EM | 2 |
| Malvasia di Lipari | 45 | Perricone | 18 | 775P | 8 |
| Minella Bianca | 9 | | | 779P | 10 |
| Moscato Bianco | 3 | | | 1045P | 3 |
| Moscato | 1 | | | 1103P | 12 |
| Muscatinnuni | 2 | | | 140R | 14 |
| Zibibbo | 5 | | | 225R | 3 |
| | | | | <i>Rupestris du lot</i> | 2 |
| TOTALE | 201 | | 182 | | 68 |

Zibibbo, Malvasia di Lipari, Alicante, Nerello capuccio, Perricone, Nocera e Minnella nera). Un grosso campionamento è stato effettuato presso il vigneto sperimentale Biesina di Marsala (Assessorato Agricoltura e Foreste di Palermo), dove è disponibile materiale certificato per ciascuno dei vitigni sopra menzionati, realizzato grazie al progetto sulla valorizzazione dei vitigni autoctoni dei Servizi allo Sviluppo dell'Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Sicilia che ha permesso il recupero ed il censimento del patrimonio viticolo siciliano. Altro materiale viticolo è stato prelevato da campi di coltivazione di vite sparsi su tutto il territorio siciliano.

Inoltre, materiale vegetale relativo a Piante Madri Portinnesto è stato prelevato dal campo dell'azienda Bifarera sita a C.da Ficuzza del Vivaio Governativo (Assessorato Agricoltura e Foreste) per un totale di 68 campioni appartenenti a 14 vitigni portinnesto.

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dal materiale vegetale è stata eseguita usando il protocollo di Doyle (1990), leggermente modificato. Il DNA estratto da legno e giovani foglie è stato quantificato in gel d'agarosio allo 0,8% per confronto con DNA di fago lambda linearizzato, di concentrazione e peso molecolare noti, e colorazione con SyberGold. In seguito si è proceduto con l'amplificazione *in vitro* mediante PCR.

Analisi dei marcatori microsatelliti

Per permettere un'analisi di corrispondenza varietale con tutte le varietà internazionali già descritte a

livello molecolare, sia i 383 campioni di vitigni da frutto che i 68 campioni di vitigni portinnesto sono stati esaminate ai 6 loci del genoma di vite corrispondenti ai marcatori microsatelliti più usati dalla comunità scientifica (This *et al.* 2004; <http://www.genres.de/vitis/>): VVS2 (Thomas, Scott, 1993), VVMD5 e VVMD7 (Bowers *et al.*, 1996), VVMD27 (Bowers *et al.*, 1999), VrZAG62 e VrZAG79 (Sefc *et al.*, 1999).

I prodotti così ottenuti, sono stati analizzati mediante un sistema di elettroforesi capillare ABI 3130 (Applied Biosystems) che permette di determinare le dimensioni di ciascun allele (esprese in bp) a ciascun locus, attraverso l'applicazione del software Genmapper (Applied Biosystems).

Identificazione Varietale

I profili molecolari ottenuti sono stati confrontati tra loro e con i dati disponibili in letteratura e nelle seguenti banche dati *online*: GMC: <http://www.ismaa.it/areabioav/gmc.html>; Greek Vitis Database: <http://www.biology.uch.gr/gvd/>; Swiss Vitis Microsatellite Database: <http://www.unine.ch/nccr/svmd/>; e GENRES: <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>.

Caratterizzazione Funzionale

Una volta effettuata l'analisi dei loci microsatelliti, è stata avviata una esplorazione delle varietà in studio analizzando alcune porzioni di 3 geni espressi (EST, *Expressed Sequence Tags*), in modo da ricercare, al loro interno, variazioni nucleotidiche. I geni scelti e

sequenziati CND41, ConG-P e PAL sono implicati nella sintesi di composti aromatici della bacca (Emanuelli, 2006). I prodotti di PCR sono stati sequenziati in entrambe le direzioni e confrontati tra loro per l'identificazione degli SNPs impiegando il kit BigDye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing (Applied), come stabilito da Emanuelli (2006).

Risultati e discussione

Identificazione Varietale

I campioni sottoposti ad analisi erano attribuiti a 35 presunte varietà, ma non tutte le piante ritenute della stessa varietà hanno mostrato lo stesso profilo molecolare.

Complessivamente sono stati identificati 40 diversi profili del DNA (tab. 2). Le varietà maggiori della

Tab. 2 - Lista delle presunte varietà analizzate e risultato indicativo del confronto in banca dati.

Tab. 2 - *Grapevine cultivars analysed and correspondence found in database.*

| | Varietà | Campioni | Corrispondenze |
|-------------------|-------------------|---|--------------------------------|
| Bacca bianca | Albanello | 2 | Vitigni pugliesi |
| | | 1 | |
| | Grillo | 6 | |
| | Inzolia | 24 | Vitigni calabresi |
| | | 1 | |
| | | 1 | |
| | Catarratto | 28 | Vitigni calabresi |
| | | 2 | |
| | Carricante | 14 | Vitigni calabresi |
| | | 7 | |
| | | 1 | |
| | | 1 | |
| | Damaschino | 4 | |
| | Zibibbo | 5 | Moscato d'Alessandria |
| Moscato | 5 | Moscato | |
| Muscatinnuni | 2 | Vitigni greci e calabresi | |
| Malvasia | 40 | Malvasia di Sardegna (Lacombe et al., 2007) | |
| | 1 | | |
| | 1 | | |
| | 1 | | |
| | 1 | Vitigni greci e campani | |
| Grecanico | 23 | | |
| Minnella bianca | 8 | | |
| | 1 | | |
| Bacca nera | Nero d'Avola | 46 | Nero d'Avola |
| | Alicante | 24 | Grenache (Canonau in Sardegna) |
| | | 2 | |
| | | 2 | Nerello mascalese |
| | Nerello cappuccio | 17 | |
| | | 4 | |
| | Perricone | 10 | Ciliegiolo |
| | | 1 | |
| | | 1 | |
| | Frappato | 8 | Vitigni calabresi |
| 2 | | | |
| Nerello mascalese | 31 | Vitigni calabresi | |
| | 1 | | |
| Nocera | 6 | Vitigni calabresi | |
| | 2 | | |
| Minnella nera | 8 | | |

Sicilia, come Nero d'Avola, Inzolia, Grillo e altre, sono tra quelle che hanno mostrato profili molecolari unici, a conferma della loro peculiarità produttiva e dell'opportunità di avviare un programma di tracciabilità su base genetica per la tutela di questi importanti vitigni. Dei 26 germogli campionati come Inzolia, 24 hanno mostrato profilo unico, gli altri due hanno profili differenti non riscontrabili in database.

Il confronto in banche dati ha permesso di verificare la corrispondenza varietale e di identificare numerose relazioni genetiche con vitigni dell'area calabrese (tab. 2). E' stata osservata un'ampia variabilità e infatti la diversità genetica basata sulla frequenza dei marcatori ai 6 loci comprende una buona parte delle varianti alleliche note in *Vitis vinifera* (This *et al.*, 2004). L'elevata presenza di certe varianti alleliche potrebbe essere indicativa di un caratteristico *pool* genico autoctono (fig. 1). Ci si aspetta che l'estensione delle analisi molecolari all'ampio germoplasma minore recuperato in Sicilia possa fornire utili indicazioni anche in questo senso.

Caratterizzazione Funzionale

Un confronto più approfondito tra alcune varietà siciliane di interesse commerciale è stato condotto analizzando le sequenze di regioni genomiche corrispondenti a enzimi della via biosintetica degli aromi della bacca. I polimorfismi di singolo nucleotide (SNP), che infatti possono essere presenti anche all'interno di regioni codificanti, hanno la potenzialità di indicare differenze importanti per le caratteristiche funzionali delle cultivar. In questa prima esplorazione, tutte le cultivar analizzate hanno mostrato profili di SNP diversi (tab. 3). Sarà interessante procedere con la collezione delle varianti alleliche e con la ricerca degli SNP in altre porzioni genomiche per stabilire le relazioni genetiche delle varietà siciliane nell'ambito della specie *V. vinifera*.

Conclusioni

L'analisi ha riguardato un ampio numero di accessioni del germoplasma viticolo siciliano e l'utilizzo dei marcatori molecolari ha permesso di verificare l'identità dei campioni, di effettuare analisi di corrispondenza varietale e di valutare la ricchezza di diversità genetica.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che i vitigni di maggior importanza economica per la Sicilia come il Nero D'Avola, il Frappato, il Catarratto, il Grillo, l'Inzolia, hanno profili molecolari unici (non presenti nei database) a conferma della loro peculiarità produttiva e che altre varietà analizza-

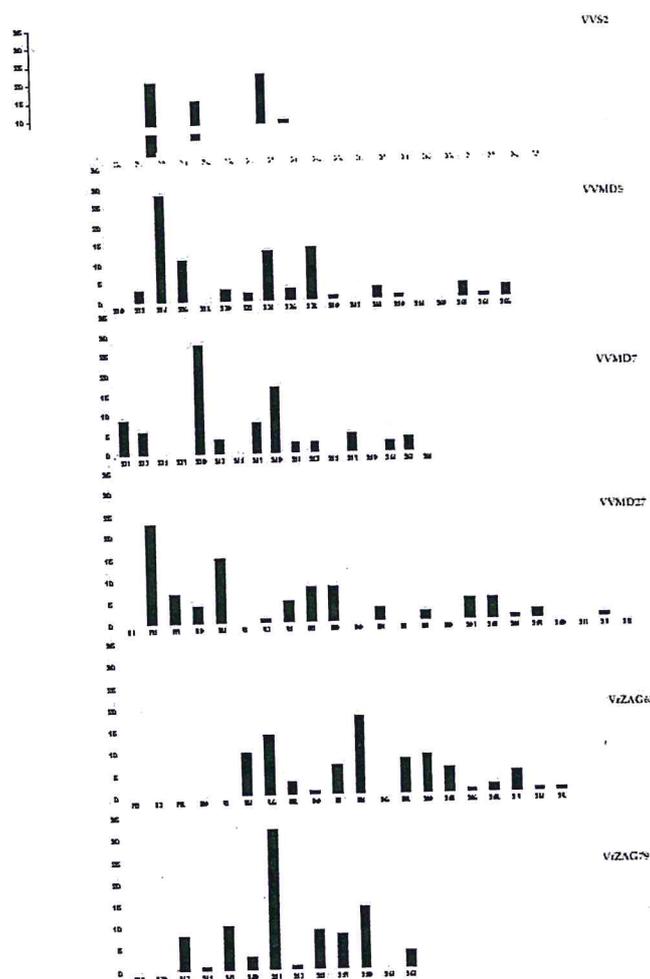


Fig. 1 - Range allelico (bp) osservato nel germoplasma siciliano rispetto all'estensione di variabilità conosciuta finora nel genere *Vitis* ai 6 loci microsatelliti VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 and VrZAG79. Per ogni variante allelica è indicata inoltre la frequenza del marcatore rilevata nei 45 diversi profili molecolari dei vitigni siciliani.

Fig. 1 - Allele sizes (bp) at 6 SSR loci VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 and VrZAG79 for the Sicilian varieties. Distribution and relative frequency of microsatellite alleles was obtained from 45 distinct molecular profiles.

te, dal confronto con i profili presenti nelle banche dati, mostrano una forte relazione con il germoplasma calabrese e sporadiche identità con varietà sarde, francesi e spagnole.

Questa indagine ha prodotto utili parametri per la caratterizzazione del *pool* genico locale.

In questo lavoro sono state poste inoltre, le basi per avviare il controllo di qualità delle produzioni vivaistiche siciliane.

Il confronto delle cultivar con marcatori SNPs ha dimostrato l'esistenza di variabilità anche in regioni codificanti del genoma implicate nella sintesi degli aromi e pone le basi per l'analisi funzionale della tipicità delle varietà siciliane.

Tab. 3 - Polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) rilevati tramite il sequenziamento di tre regioni genomiche corrispondenti ad alcuni geni della via biosintetica degli aromi della bacca in diverse varietà di vite siciliane.

Tab. 3 - Single nucleotide polymorphisms (SNPs) detected by sequencing three gene regions related to the terpenoid biosynthesis of the grape berry in different Sicilian grapevine varieties.

| Funzione | CB922850 | | | CB978225 | | | CF404130 | |
|-----------------|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| Catarratto | C/G | A | C | G/C | T | A/G | C | C/T |
| Frappato | C/G | A | C/T | T | G | G | C/T | C |
| Grecanico | C/G | G/A | C | G/C | T | G | C/T | C/T |
| Grillo | G | A | T | T/C | G/T | G | C | C |
| Inzolia | C/G | A | C | T | G/T | A | C | C |
| Malvasia Lipari | G | A | C/T | T | G | A | C | C |
| Nerello | C/G | A | C | T | G | A | C | C |
| Nero d'Avola | G | A | C | T/C | G/T | A | T | C |
| Chardonnay 130 | C/G | A | C | G/T | T | G | C/T | C |

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano l'Assessorato Agricoltura e Foreste per avere finanziato il progetto, Francesco Emanuelli della Fondazione Edmund Mach-Centro Ricerca IASMA, San Michele all'Adige (Trento) per l'analisi degli SNPs e Josè Vouillamoz, Università di Neuchâtel (CH) per la ricerca di corrispondenze varietali nella sua banca dati di profili SSR dei vitigni.

Riassunto

Numerose accessioni di vite sono state individuate in antichi vigneti della Sicilia e raccolte in campi collezione. Di queste, 383 sono state analizzate ai 6 loci microsatelliti e quindi raggruppate per identità di marcatori genetici. I risultati mostrano l'effettiva diversità del germoplasma considerato, una forte relazione tra quello siciliano e calabrese, e sporadiche identità con varietà sarde, francesi e spagnole. Le principali varietà siciliane mostrano profili molecolari unici. Il lavoro mira a delineare il *pool* genico siciliano alla caratterizzazione delle varietà tipiche. Oltre ai marcatori neutri, sono stati esplorati polimorfismi di singolo nucleotide in alcuni geni espressi di vite.

Parole chiave: Caratterizzazione varietale, microsatelliti, *single nucleotide polymorphism*

Bibliografia

BOWERS J.E., DANGL G.S., VIGNANI R., MEREDITH C.P., 1996. *Isolation and characterization of new polymorphic simple*

sequence repeat loci in grape (Vitis vinifera L.). Genome 39: 628-633.

BOWERS J.E., DANGL G.S., MEREDITH C.P., 1999. *Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. American Journal of Enology and Viticulture, v.50, p.243-246.*

DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15.*

EMANUELLI F., 2006. *Caratterizzazione di QTL per l'aroma moscato in vite con l'approccio del gene candidato. Tesi di Laurea in Biotecnologie Agro-Industriali, Università degli Studi di Verona, 2006.*

FLINT-GARCIA S.A., THUILLET A.C., YU J., PRESSOIR G., ROMERO S.M., MITHELL S.E., DOEBLEY J., KRESOVICH S., GOODMAN M.M., BUCKLER E.S., 2005. *Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. The Plant Journal 44: 1054-1064.*

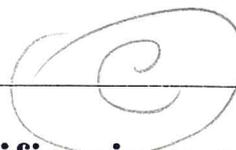
LIJAVETZKY D., CABEZAS J.A., IBAÑEZ A., RODRIGUEZ V., MARTINEZ-ZAPATER J.M., 2007. *High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (Vitis vinifera L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. BMC Genomics 19(8): 1-11.*

SEFC K.M., REGNER F., TURETSCHKE E., GLÖSSL J., STEINKELLNER H., 1999. *Identification of microsatellite sequences in Vitis riparia and their applicability for genotyping of different Vitis species. Genome 42: 367-373.*

SIMKO I., HAYNES K.G., EWING E.E., COSTANZO S., CHRIST B.J., JONES R.W., 2004. *Mapping genes for resistance to Verticillium albo-atrum in tetraploid and diploid potato populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis. Molecular Genetics and Genomics 271(5): 522-531.*

SZALMA S.J., BUCKLER E.S., SNOOK M.E., MCMULLEN M.D., 2005. *Association analysis of candidate genes for maysin and chlorogenic acid accumulation in maize silks. Theoretical and Applied Genetics 110(7): 1324-1333.*

THIS P., JUNG A., BOCCACCI P., BORREGO J., BOTTA R., COSTANTINI L., CRESPIAN M., DANGL G.S., EISENHOLD C., FERREIRA-MONTEIRO F., GRANDO M.S., IBAÑEZ J., LACOMBE T., LAUCOU V., MAGALHAES R., MEREDITH C.P., MILANI N., PETERLUNGER E., REGNER F., ZULINI L., MAUL E., 2004. *Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theoretical and Applied Genetics 109:1448-1458.*



Determinazione di Ocratossina A e identificazione molecolare di *Aspergillus carbonarius* nella produzione vitivinicola siciliana

Grippi F.*, Curione A., Calderone A., Crosta L., Gebbia N., Aiello G., Oliveri F.

Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura, c/o IZS della Sicilia, via G. Marinuzzi 3, 90129 Palermo

Determination of Ochratoxin A and molecular identification of *A. carbonarius* in the grape and wine production of Sicily

Abstract. Commission Regulation (EC) No 123/2005 provides that maximum level for ochratoxin A (OTA) is 2,0 ppb for wine (red, white and rosé) and other wine and/or grape must based beverages. Analysis of OTA has been carried out in representative samples of wine (vintage years 2003-2006) and must (vintage years 2006-2007) in the Co.Ri.Bi.A. laboratory. The analysis was performed by using high-performance liquid chromatography (HPLC) and the presence of *A. carbonarius* was checked by using a specific culture medium and molecular analysis (PCR). The results showed that the OTA level was below the limit of law in all sampled Sicilian wines and musts, despite the presence of *A. carbonarius* detected in traces.

Key words: OTA, HPLC, PCR

Introduzione

L'Unione Europea dal 26 gennaio 2005, con il Regolamento CE n. 123/2005, ha stabilito il tenore massimo ammissibile di Ocratossina A (OTA) in 2 ppb ($\mu\text{g/L}$) per il vino, il mosto e le bevande a base di succo d'uva.

Tale provvedimento è legato al fatto che l'OTA, micotossina con effetti nefrotossici, immunodepressivi, neurotossici e teratogeni, è stata considerata dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) tra le molecole sospette ad effetto cancerogeno per l'uomo (classe 2B).

Le specie che producono OTA sono i miceti filamentosi appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* presenti di norma nel suolo.

Le condizioni ambientali, umidità ed alte temperature, giocano un ruolo di primaria importanza nel promuovere la sintesi di OTA. Dati epidemiologici dimo-

strano che nel territorio italiano e più in particolare nel meridione, *A. carbonarius* è il micete più frequentemente rilevato e trova le condizioni ideali per attivare l'attività metabolica secondaria.

L'obiettivo della ricerca è stato il monitoraggio della eventuale presenza di OTA nella produzione vitivinicola siciliana finalizzato al suo contenimento.

Le fasi della ricerca hanno previsto sia la determinazione della concentrazione di OTA in campioni di vino relativi alle vendemmie 2003-2006 e in campioni di mosto relativi alla vendemmia 2007 che l'isolamento e l'identificazione molecolare di *A. carbonarius* nei mosti relativi alla vendemmia 2007.

Materiale e metodi

Sono stati analizzati 422 vini commerciali di cui 176 bianchi e 246 rossi relativi alle vendemmie 2003-2006 ottenuti dalle varietà Inzolia, Chardonnay, Grillo, Grecanico, Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon, Nero d'Avola, sia in purezza che in blend (tab. 1). Relativamente ai campioni di mosto della vendemmia 2007, sono stati analizzati 140 campioni, prelevati da cantine sociali delle province di Palermo, Agrigento e Trapani. In questo caso le varietà prese in considerazione sono state: Inzolia, Chardonnay, Catarratto, Grillo, Grecanico, Sauvignon bianco, Fiano, Bianco di Nerello Mascalese, Viogner, Zibibbo, Sangiovese, Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon, Nero d'Avola e Nerello Mascalese, sia in purezza che in blend, prelevati nelle differenti fasi della fermentazione.

La determinazione di OTA nei vini e nei mosti ha previsto una prima fase di estrazione su colonnine ad

Tab. 1. Contenuto di ocratossina ($\text{I}\mu\text{g/L}$) nei vini (vendemmie 2003-2006).

Tab. 1. Ochratoxin A concentrations ($\text{I}\mu\text{g/L}$) in wines (grape harvests 2003-2006).

| Tipologia di campioni | N° campioni | Valore minimo | Valore massimo |
|----------------------------|-------------|------------------|-----------------|
| Vini bianchi (commerciali) | 176 | 0,01 \pm 0,001 | 0,71 \pm 0,01 |
| Vini rossi (commerciali) | 246 | 0,01 \pm 0,002 | 0,76 \pm 0,01 |

* francescagrippi@virgilio.it

immunoaffinità ed una successiva fase di rivelazione-quantificazione mediante HPLC (Cromatografia Liquida ad Alta Pressione) utilizzando lo Spettrofluorimetro come detector (Brera *et al.*, 2003).

La ricerca dell'*A. carbonarius* è stata eseguita tramite l'isolamento del micete utilizzando terreni semi-selettivi, quali il MEA (Malt Extract Agar) e il MEA-B (Malt Extract Boscalid Agar) (Pollastro *et al.*, 2006).

La lettura delle piastre poste in incubazione a 25 °C è stata effettuata dopo 3 giorni e sono state considerate positive quelle in cui c'è stato sviluppo di conidi sospetti di *A. carbonarius*. L'identificazione e la conferma è stata eseguita tramite estrazione del DNA, sia da piastre che direttamente dai mosti, e successiva amplificazione tramite PCR specie-specifica (OTA-F/OTA-R) utilizzando il termociclatore 2720 Applied Biosystems (Atoui *et al.*, 2007). Gli amplificati sono stati visualizzati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% e visualizzati al transillumintore (ChemiDoc Biorad). E' stato considerato positivo il campione in cui il prodotto di amplificazione era lungo 141bp (fig. 1). Come controllo positivo interno, è stato usato un ceppo di riferimento di *A. carbonarius* (NRRL67). La specificità dei primers è stata saggiata su altre specie di *Aspergillus*.

Risultati e discussione

Nei 422 vini commerciali analizzati (vendemmie 2003-2006), 321 campioni sono risultati essere minimamente contaminati da OTA e comunque, in tutti i campioni, la concentrazione era sempre al di sotto dei limiti di legge ($< 2 \mu\text{g/L}$) (tab. 1).

Nei 140 mosti analizzati, solo 84 campioni sono risultati essere minimamente contaminati da OTA e anche in questi la concentrazione era sempre al di sotto dei limiti di legge ($< 2 \mu\text{g/L}$) (tab. 2).

Le indagini molecolari hanno permesso di rilevare in 48 mosti la presenza di *A. carbonarius* (tab. 2), ma solo da 7 campioni è stato possibile isolare il micete. Di questi, 6 erano campioni di mosto appena pigiato

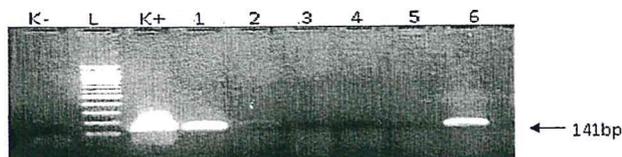


Fig. 1 - Elettroforesi su gel di agarosio della PCR per *A. carbonarius*.

Fig. 1 - Agarose gel electrophoresis of *A. carbonarius* PCR product.

Tab.2 - Risultati ottenuti dall'analisi del contenuto in OTA e della presenza di *A. carbonarius* nei mosti della vendemmia 2007.

Tab.2 - OTA content results obtained by molecular analysis (PCR) in musts (grape harvest 2007). nr=not detected

| N° mosti analizzati 140 | | Contenuto di OTA ($\mu\text{g/L}$) nei mosti Vendemmia 2007 | |
|-----------------------------------|----------------|---|-------------------|
| P. C. R. <i>A. carbonarius</i> | N° campioni | Valore minimo | Valore massimo |
| Negativi | 92 | nr | $0,75 \pm 0,001$ |
| Positivi | 48 | nr | $0,82 \pm 0,021$ |

ed 1 solo campione era stato prelevato dalla vasca durante la fase di fermentazione. Tutti i 7 campioni hanno mostrato concentrazioni ridotte di OTA (tab. 3). I due terreni di coltura utilizzati per l'isolamento, sono risultati essere selettivi in egual misura per la specie *carbonarius* (tab. 3). Nella figura 1 viene riportata l'elettroforesi dei prodotti ottenuti dalla PCR di alcuni campioni di DNA di mosto saggiati per *A. carbonarius*; i campioni positivi mostrano un prodotto di amplificazione corrispondente alla banda di 141bp.

Conclusioni

Dai risultati si evince che l'isolamento microbiologico del micete è stato possibile solo nella fase di inizio fermentazione, subito dopo la pigiatura; solo in un caso su 140 è stato possibile evidenziare l'*A. carbonarius* a metà del processo di fermentazione. L'analisi molecolare (48/140 positivi) è stata effettuata tramite PCR, una tecnica che, per la sua elevata sensibilità e specificità, permette di rilevare piccole tracce del micete anche quando non è vitale. La determinazione di OTA in tutti i campioni esaminati ne ha messo in evidenza concentrazioni particolarmente ridotte, a volte nulle, e comunque sempre molto al di sotto dei limiti di legge.

Questi dati forniscono un valore aggiunto alla produzione vitivinicola siciliana in quanto ne confermano la salubrità.

Tab.3 - Risultati ottenuti dall'analisi del contenuto in OTA in mosti (vendemmia 2007), risultati positivi all'isolamento di *A. carbonarius* in funzione delle fasi di vinificazione.

Tab.3 - OTA content results obtained in musts (grape harvest 2007) resulted positive in specific culture medium for *A. carbonarius* in two different steps of the vinification.

| Fase | Isolamento di <i>A. carbonarius</i> | | Media del contenuto di OTA ($\mu\text{g/L}$) |
|---------------|--|------|---|
| | MEA | MEAB | |
| Pigiatura | 3 | 3 | $0,118 \pm 0,125$ |
| Fermentazione | - | 1 | $0,820 \pm 0,021$ |

Riassunto

Il Regolamento CE 123/2005, stabilisce il tenore massimo ammissibile di Ocratossina A in 2 ppb per il vino, il mosto e succo d'uva. E' stata eseguita dal Co.Ri.Bi.A la valutazione del contenuto di OTA e della presenza di *A. carbonarius*, su un ampio numero di campioni di vino (2003-2006) e di mosti (2006 - 2007). Si è proceduto con la rivelazione di OTA mediante HPLC, e con l'identificazione del micete tramite isolamento e PCR. I risultati dimostrano che la concentrazione di OTA nei vini siciliani analizzati è al di sotto del limite legislativo anche in presenza di tracce del micete.

Parole chiave: OTA, HPLC, PCR.

Bibliografia

- ATOUI A., MATHIEU F., LEBRIHI A., 2007. *Targeting a polyketide synthase gene for Aspergillus carbonarius quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR*. Int. J. Food Microbiology 115: 313-318.
- BRERA C., GROSSI S., DE SANTISI B., MIRAGLIA M., 2003. *Automated HPLC Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine Samples*. J. of Liquid Chromatography & related technologies. 26:119-133.
- POLLASTRO S., DE MICCOLIS ANGELINI R.M., FARETRA F., 2006. *A new semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus Aspergillus carbonarius*. J. Plant Pathology , 88(1): 107-112.

Caratterizzazione biochimica delle componenti salutistiche (stilbeni, flavonoidi e polifenoli totali) e valutazione della capacità antiossidante nei vini siciliani

Curione A.,* Grippi F., Crosta L., Aiello G., Calderone A., Gebbia N.

Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura (Co.Ri.Bi.A.), c/o IZS della Sicilia, via G. Marinuzzi 3, 90129 Palermo

Biochemistry characterization of healthy compounds (stilbens, flavonoids and total polyphenols) and evaluation of antioxidant activity in sicilian wines

Abstract. Stilbenes and flavonoids are polyphenolic compounds widely represented in nature and have become of particular interest to chemists and biologists because of their wide range of biological activities like prevention of heart disease and cancer. The cancer protective effects of flavonoids and stilbenes have been attributed to a wide variety mechanisms, including modulating enzyme activities and their antioxidant properties resulting in the decreased carcinogenicity of xenobiotics. In our study we determine the presence of stilbenes and flavonoids (*trans*-, *cis*-resveratrol, piceatannol and their glycoside forms, quercetin and kaempferol) in Sicilian wine samples, carried out through HPLC system with DAD and FLD detector. Moreover we have investigated the total antioxidant activity (TAA), by two spectrophotometric assays (ABTS and DPPH) and the total phenolic content by Folin-Ciocalteu's reagent. In general, results showed a high concentration of phenolic compounds in Sicilian wines, in particular total resveratrol and quercetin and a relevant antioxidant activity particularly found in red wine samples, which shows positive correlation with total phenolic content.

Key words: HPLC-DAD/FLD, resveratrol, quercetin, TAA.

Introduzione

I flavonoidi, composti fenolici, sono presenti in tutte le piante e sono stati studiati nei vegetali in genere quali cereali, legumi, nocciole, olive e derivati, uve e derivati (vino, succo d'uva). L'interesse per queste sostanze deriva dal fatto che ne è stata dimostrata l'attività antiossidante, in particolare il loro effetto preventivo nei confronti di patologie come la

trombosi ed i tumori. I flavonoidi quali la quercetina ed il kaempferolo sono potenti antiossidanti, che in particolare bloccano l'ossidazione delle lipoproteine LDL ed inibiscono la perossidazione dei lipidi (Fang *et al.*, 2007).

Fra le componenti fenoliche, hanno suscitato molto interesse quelle dei vini rossi, a cui si è giunti in seguito all'osservazione indicata con il nome di "Paradosso francese" (Renaud & De Longe, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1996). Responsabile di tale "Paradosso" è il *trans*-resveratrolo, composto polifenolico non flavonoide, appartenente alla famiglia degli stilbeni. E' contenuto oltre che nelle uve e nei suoi derivati (vini e succo d'uva) anche nella frutta secca (Grippi *et al.*, 2008); come antiossidante ha attività anti-trombotica, anti-infiammatoria ed inibisce la carcinogenesi (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Altri stilbeni di interesse medico sono il glucoside del *trans*-resveratrolo o *trans*-piceide ed il piceatannolo o astringinina, il primo evidenziato nelle bacche dell'uva e nel pistacchio (Grippi *et al.*, 2008; Waterhouse & Lamuela-Raventos, 1994), il secondo in alcune piante non commestibili come *Euphorbia lagascae*, *Melaleuca leucadendron* and in *Scirpus californicus*, i cui rizomi sono edibili; e recentemente nelle uve e nel vino (Buiarelli *et al.*, 2007; Gebbia *et al.*, 2003; Ferrigni *et al.*, 1984). L'astringinina è un agente antileucemico ed antiossidante in differenti sistemi *in vitro* di cellule tumorali (Kuo & Hsu, 2008).

Tra i flavonoidi di grande interesse biochimico sono la quercetina ed il kaempferolo, per l'effetto inibitorio sullo sviluppo di alcuni tumori nell'uomo quali quelli dello stomaco, colon, prostata e mammella (Landis-Piwowar *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2008).

L'obiettivo di questo lavoro è stato determinare la presenza di stilbeni e flavonoidi (*trans*-, *cis*-resveratrolo, piceatannolo nelle forme libere e glicosilate, quercetina e kaempferolo) in campioni di vino rosso, bianco e Malvasia di origine siciliana, prodotti da uve di varietà Nero d'Avola, Perricone, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Grillo, Chardonnay, Catarratto, Grecanico, Inzolia e Malvasia delle Lipari. Inoltre di ogni campione ne abbiamo investigato l'at-

*alicecurione@coribia.it

tività antiossidante totale (TAA), attraverso saggio spettrofotometrico e il contenuto in polifenoli totali.

Materiale e metodi

Sono stati analizzati 40 vini commerciali, prodotti in Sicilia, di cui 18 rossi, 16 bianchi, 6 Malvasia delle Lipari, vino liquoroso delle isole Eolie. I campioni di vino rosso erano di varietà autoctone (Nero d'Avola e Perricone) ed internazionali (Cabernet Sauvignon, Merlot e Syrah). I vini erano sia di varietà autoctone (Inzolia, Catarratto, Grecanico e Grillo) che internazionali (Chardonnay).

I campioni sono stati conservati a temperatura ambiente e protetti da fonti di luce e calore. I vini sono stati analizzati in triplo immediatamente dopo la loro apertura. L'analisi è stata effettuata per iniezione diretta del campione di vino in HPLC (Cromatografo liquido ad alte pressioni). Come preparazione del campione è stata effettuata solo una filtrazione con filtri da 0.20 μ m (Minisart RC 25 Sartorius, Germania). L'HPLC è un Agilent Technologies (Palo Alto, CA) Serie 1100 equipaggiato di rivelatore DAD. L'analisi è stata eseguita secondo il metodo descritto da Grippi *et al.*, 2008.

La lunghezza d'onda di massimo assorbimento era di 325 nm per tutti gli standard eccetto per il *cis*-resveratrolo ed il suo glicoside, di cui era 285 nm. Le curve di calibrazione di tutti gli standard sono state stabilite mediante l'iniezione in triplicato di otto differenti punti di concentrazione. Tutti gli standard sono stati diluiti in metanolo/acqua (50/50; v/v). L'identità per ogni picco è stata ottenuta mediante il confronto del tempo di ritenzione e dello spettro di assorbimento con uno standard puro. La presenza dei composti era confermata quando il match era superiore a 990. Per ogni composto ne è stato determinato il recupero medio percentuale e ne sono stati verificati il limite di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ).

La determinazione dell'Attività Antiossidante Totale dei vini è stata effettuata mediante due metodi spettrofotometrici, ABTS e DPPH. Questi metodi misurano l'abilità degli antiossidanti come scavenger del radicale cationico ABTS⁺ e del radicale DPPH. Per la valutazione dell'assorbanza è stato utilizzato uno Spettrofotometro DU 640 (Beckman Coulter, USA). Il metodo che utilizza l'ABTS è stato descritto da Miller *et al.*, 1993, con l'apporto di alcune modifiche. Il metodo con DPPH è stato in accordo a quello riportato da Villaño *et al.*, 2007.

Il contenuto di polifenoli totali (TPC) è stato determinato secondo il metodo di Folin-Ciocalteu proposto da Minussi *et al.* 2003, al quale sono state apporta-

te alcune modifiche.

La curva di calibrazione è stata costruita su sei livelli differenti di concentrazione dello standard puro di acido gallico. I risultati sono stati espressi come acido gallico equivalenti (GAE)L⁻¹. Tutte le determinazioni sono state effettuate in triplicato.

Risultati e discussione

L'analisi cromatografica conferma la presenza di stilbeni e flavonoidi nei campioni di vino siciliano. La figura 1 riporta il cromatogramma di un campione di vino registrato a 325 nm. Il resveratrolo nelle forme *trans*- e *cis*- ed il suo piceide nelle forme *trans*- e *cis*- è stato evidenziato nei campioni di vino sia rosso, che bianco e nelle Malvasie. In tabella 1 sono riportati i valori massimi e minimi di piceatannolo totale, dato dalla somma del piceatannolo in forma libera e glicosilata, resveratrolo totale, risultato della somma del resveratrolo nelle due isoforme *trans*- e *cis*- libere e glicosilate, quercetina e kaempferolo, nelle varietà di vino rosso analizzate. Il piceatannolo e l'astringina sono stati rivelati solo nei rossi e nelle Malvasie. Lo stesso è stato riscontrato per la quercetina ed il kaempferolo, presenti nei rossi e nelle Malvasie; la quercetina è presente solo in un campione dei bianchi, così pure l'astringina. La quercetina, come si può osservare dai dati riportati nelle tabelle 1 e 2, è una componente polifenolica dei vini rossi molto consistente e si trova in buone quantità anche nelle Malvasie a differenza dei vini bianchi, nei quali è stato rivelato solo in un campione di varietà Grillo.

Nelle tabelle 3, 4 e 5 sono riportati i valori di attività antiossidante totale, rispettivamente nei vini rossi, bianchi e Malvasia delle Lipari, determinati con i due test: ABTS (TAA_{ABTS}) e DPPH (TAA_{DPPH}). Il risultato è espresso in Trolox equivalenti (mM TEq) per la TAA, mentre i polifenoli totali sono espressi in acido gallico equivalenti (GAE). I risultati mostrano che l'attività antiossidante per tutti i campioni ha un trend simile.

Il contenuto di polifenoli totale è direttamente correlato con la TAA dei vini, con entrambi i test di valutazione (P>0,01). La correlazione positiva suggerisce che la TAA dei nostri campioni di vino è strettamente legata e consequenziale al contenuto di polifenoli totali.

Dai risultati si evidenzia che nei vini rossi rispetto ai bianchi siciliani la concentrazione di stilbeni e flavonoidi è consistente per il resveratrolo totale e la quercetina, oltre alla rilevante attività antiossidante, che si correla positivamente con il contenuto in polifenoli totali. In conclusione il vino rosso siciliano per

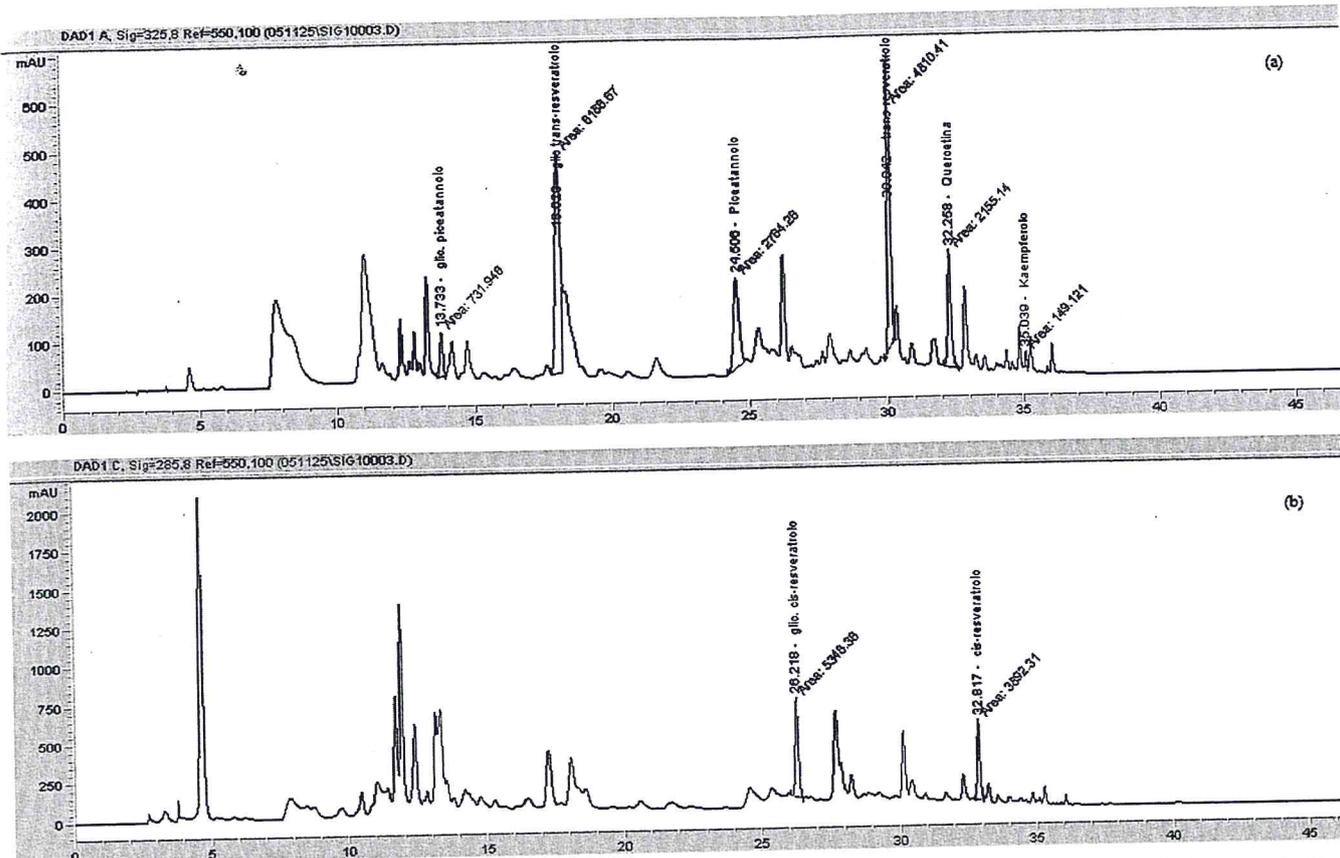


Fig. 1 - Cromatogramma di un vino rosso registrato a 325 nm (a), nel quale si rilevano l'astringina, il trans-piceide, il piceatannolo, il trans-resveratrolo, la quercetina e il kaempferolo; (b) lo stesso registrato a 285 nm dove sono rivelati il cis-piceide e il cis-resveratrolo.
 Fig. 1 - Chromatogram of red wine registered (a) at 325 nm, which are evident astringin, trans-piceid, piceatannol, trans-resveratrol, quercetin and kaempferol; (b) the same sample registered at 285 nm, which are evident cis-piceid and cis-resveratrol.

il suo elevato contenuto in composti fenolici naturali e per il suo alto potere antiossidante rappresenta un potenziale fattore preventivo nel regime alimentare.

Riassunto

Stilbeni e flavonoidi, sono polifenoli di particolare interesse biologico, per il loro effetto preventivo nei confronti delle malattie cardiovascolari e dei tumori. Nel nostro studio è stato determinato sia il contenuto di stilbeni e flavonoidi in campioni di vino siciliani, mediante sistema HPLC-DAD/FLD, sia l'attività antiossidante totale (TAA), attraverso saggio spettrofotometrico ed il contenuto in polifenoli totali degli stessi campioni. Dai risultati si evidenzia che nei vini siciliani rossi rispetto ai bianchi la concentrazione di stilbeni e flavonoidi è consistente per il resveratrolo totale e la quercetina, così pure l'attività antiossidante, che si correla positivamente con il contenuto in polifenoli totali.

Parole chiave: HPLC-DAD/FLD, resveratrolo, quercetina, TAA.

Bibliografia

BUIARELLI F., COCCIOLI, F., JASINOWSKA R., MEROLLE M., TERRACCIANO A., 2007. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Common Mass Spectrom., 21 (18): 2955-2964.
 CRESPO I., GARCÍA-MEDIAVILLA M.V., GUTIÉRREZ B., SÁNCHEZ-CAMPOS S., TUÑÓN M.J., GONZÁLEZ-GALLEGO J., 2008. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. The British Journal of Nutrition, 100 (5): 968-76.
 FANG F., LI J.M., PAN Q.H., HUANG W.D., 2007. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. Food Chemistry, 101: 428-433.
 FERRIGNI N.R., MCLAUGHLIN J.L., POWELL R.G., SMITH, C.R., 1984. Use of potato disc and brine shrimp bioassay to detect activity and isolate piceatannol has the antileukemic principle from seeds of Euphorbia lagascae. J. Natl. Prod., 47: 347-352.
 GEBBIA N., BAVARESCO L., FREGONI M., CIVARDI S., CROSTA L., FERRARI F., GRIPPI F., TOLOMEO M., TREVISAN M., 2003. Contenuto di un nuovo stilbene (piceatannolo) in alcuni vini della Sicilia. Vignevini 5: 87-94.
 GRIPPI F., CROSTA L., AIELLO G., TOLOMEO M., OLIVERI F., GEBBIA N., CURIONE A., 2008. Determination of stilbenes in Sicilian pistachio by high-performance liquid chromatography diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination. Food Chemistry, 107: 483-488.
 KUO PL., HSU YL., 2008. The grape and wine constituent piceatannol inhibits proliferation of human bladder cancer

- cells via blocking cell cycle progression and inducing Fas/membrane bound Fas ligand-mediated apoptotic pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (4): 408-418.
- KRIS-ETHERTON P.M., HECKER K.D., BONANOME A., COVAL S.M., BINKOSKI A.E., HILPERT K.F., GRIEL A.E., ETHERTON T.D., 2002. *Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer*. *The American Journal of Medicine*, 113 (9B): 71S-88S.
- LANDIS-PIWOWAR K.R., MILACIC V., DOU Q.P., 2008. *Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells*. *J. Cell Biochem.*, 105 (2): 514-523.
- MILLER N.J., RICE-EVANS C., DAVIES M.J., GOPINATHAN V., MILNER A., 1993. *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. *Clin. Sci. (Lond)*, 84 (4): 407-12.
- MINUSSI R.C., ROSSI M., BOLOGNA L., CORDI L., ROTILIO D., PASTORE G.M., DURÁN N., 2003. *Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines*. *Food Chemistry*, 82: 409-416.
- RENAUD S., DE LONGERIL, M., 1992. *Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease*. *Lancet*, 339: 1523-1526.
- RICE-EVANS C.A., MILLER N.J., PAGANGA G., 1996. *Structure-Antioxidant Activity relationships of Flavonoids and Phenolic Acid*. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7): 933-956.
- VILLAÑO D., FERNÁNDEZ-PACHÓN M.S., MOYÁ M.L., TRONCOSO A.M., GARCÍA-PARRILLA M.C., 2007. *Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical*. *Talanta*, 71: 230-235.
- WATERHOUSE, A.L., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., 1994. *The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries*. *Phytochem.*, 37: 571.