

## Materiali e metodi

GIACOMO ANSALDI, VITO FALCO, GIUSEPPE FICI, FRANCESCO GAGLIANO,  
GREGORIO MARINO, GIUSEPPE MONTELEONE, ALBERTO PARRINELLO  
*Assessorato dell'Agricoltura, dello Sviluppo Rurale e della Pesca Mediterranea della Regione Sicilia*

MARIA GABRIELLA BARBAGALLO, ROSARIO DI LORENZO  
*Dipartimento Colture Arboree - Università degli Studi di Palermo*

LUCIO BRANCADORO  
*Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Università degli Studi di Milano*

### Il Campo Sperimentale di Marsala

Il vigneto di raccolta e conservazione della variabilità ampelografica siciliana, di Marsala, si trova in un'area intensamente vitata e tradizionalmente vocata alla viticoltura; questo è sito presso l'azienda dell'Istituto Femminile A. Genna Spanò in contrada Biesina in agro di Marsala. Il campo è stato impiantato nell'anno 2005 con barbatelle innestate su portainnesto 1103 P. Il sesto di impianto è di m 2,40 × 0,90. La forma di allevamento è la contropalliera con potatura a guyot con una carica approssimativa di gemme da otto a dodici gemme. Il vigneto è dotato di impianto di irrigazione (coordinate GIS).

Il campo, che ha un'estensione di 8,5 ettari, è composto da tre subunità che hanno specifiche finalità:

- **Vigneto per la raccolta e conservazione della variabilità intravarietale dei vitigni tradizionali siciliani:** in questo campo sono conservati la gran parte delle linee clonali e tutti i biotipi dei principali vitigni tradizionali siciliani; questo materiale è il frutto delle indagini condotte nel corso del programma regionale di "Valorizzazione e salvaguardia dei vitigni autoctoni siciliani". In totale sono presenti 1.576 linee clonali suddivise in 30 biotipi per 19 vitigni. Per ciascuna linea clonale è presente una parcella costituita da 20 piante;
- **Campo di confronto e omologazione:** questo accoglie le linee clonali che sono risultate conformi, tramite i test ELISA e di index biologico, ai parametri sanitari previsti dal protocollo ministeriale per l'ottenimento della certificazione dei materiali di selezione clonale. Le linee clonali presenti sono 44 per 14 vitigni, ciascuna linea clonale è rappresentata da una parcella realizzata con 25 piante;
- **Campo di collezione e conservazione dei vitigni antichi siciliani:** qui sono raccolti e conservati i vitigni presenti in poche aree della Sicilia e in numero di piante assai limitato e per questo considerate reliquie dell'antica viticoltura isolana; gli individui ad oggi raccolti sono circa

80. Questi vitigni sono stati moltiplicati ottenendo così parcelle costituite da 50 piante per ciascuna cultivar.

Per definire temperature e piovosità del campo sono stati utilizzati i dati meteo della stazione sias di Marsala, ubicata ai confini del campo in oggetto (latitudine 37° 80' 11"; longitudine 12° 56' 92"; quota 120 m). I dati di riferimento climatici della piovosità provengono dalla vicina stazione meteo di Ciavolo quota 120 m stesso areale; mentre i dati delle temperature provengono dalla stazione di Marsala quota 12 m. Il campo vite è ubicato fra le pianure costiere e le colline della provincia trapanese caratterizzati da una fascia situata fra l'entroterra (clima temperato-arido) e la fascia costiera (clima caldo umido). Dai dati climatici trentennali la piovosità media della zona è di 510,2 mm annui, mentre dai dati rilevati nel periodo 2007-2012 la piovosità media è di 663 mm. La maggior parte delle precipitazioni è concentrata nei mesi di settembre-marzo.

Riguardo alle temperature si segnalano nel quinquennio 2007-2012 dei picchi significativi sopra la media climatica del periodo: rispettivamente la terza decade di giugno 2006, la terza decade di giugno 2007, la terza decade di agosto 2007 e la prima decade di agosto 2012.

Le caratteristiche orografiche dell'ambiente sono di un versante con una scarsa pendenza, inferiore al 3%, l'esposizione S-SO; le caratteristiche del suolo sono: una scarsa pietrosità superficiale (2-3% ca.) di dimensioni da piccola e media, i suoli sono argillosi, calcarei, caratterizzati da una moderata pedogenesi ed un andamento dell'umidità tipico delle regioni mediterranee.

### Caratterizzazione ampelografica

I caratteri ampelografici necessari all'identificazione delle varietà presentati nel lavoro, sono stati rilevati utilizzando la metodica riportata nella 2ª edizione del *Codice di caratteri descrittivi OIV per le varietà di vite e specie di Vitis* edito dall'OIV (Office International de la Vigne et du Vin).

### *Rilievi effettuati per determinare le caratteristiche produttive\**

Sono state scelte cinque piante il più possibile uniformi per carico di gemme e su queste, in prossimità della fioritura, sono stati rilevati per ciascun nodo dello sperone e del capo a frutto i germogli e le infiorescenze al fine di calcolare la fertilità media dei germogli e di quella dei primi tre germogli del capo a frutto. Alla raccolta sulle stesse piante è stata pesata la produzione di uva e contati i grappoli per poi determinare il peso medio del grappolo. Su un campione di 10 grappoli sono stati prelevati in maniera casuale tre ripetizioni di 100 acini al fine di misurare il peso degli acini.

Per le varietà autoctone, le osservazioni sopra descritte sono state effettuate per quattro anni mentre per le varietà “reliquie” per due anni.

Per ciascun parametro si riportano in tabella, nelle schede, il valore medio e la deviazione standard ( $\pm$ S) calcolata tra gli anni oggetto di rilievo.

### *Caratterizzazione molecolare*

Le varietà autoctone siciliane descritte nel presente lavoro sono state sottoposte ad analisi molecolare a livello di 11 loci microsatellite (SSR: Single Sequence Repeat). L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata su 0,2 g di tessuto proveniente da foglie apicali del germoglio avvalendosi dell'utilizzo di un kit commerciale (DNAeasy Plant Mini Kit - Qiagen, Hilden, Germany). Il protocollo di estrazione è stato preceduto dalla polverizzazione dei tessuti fogliari tramite azoto liquido per agevolare la quantità di materiale genetico da estrarre. La quantizzazione del DNA genomico estratto è stata stabilita in seguito a una corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8% per confronto con DNA di fago lambda.

Il DNA estratto dai singoli campioni è stato utilizzato come template per l'amplificazione tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) di 11 loci SSR nucleari. Una lista completa degli 11 loci, delle sequenze delle rispettive copie di primers e della distribuzione sui cromosomi nel genoma di *Vitis vinifera* è presentata in tabella 1. La reazione di PCR è stata ottenuta utilizzando dei primers marcati con fluorescenza all'estremità 5', costruiti sulle regioni fiancheggianti dei rispettivi loci SSR. I prodotti di ampli-

ficazione sono stati analizzati mediante un sistema di elettroforesi capillare ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems – Life Technologies, Foster City, CA, USA) che permette di determinare le dimensioni di ciascun allele a ciascun locus. Ai singoli alleli individuati è stata attribuita una dimensione in bp (paia di basi) tramite il software GeneMapper 3.10 (Applied Biosystems – Life Technologies). Le dimensioni definitive sono state attribuite in seguito a standardizzazione con varietà di riferimento, quali Sangiovese (Tab. 2).

### *Metodologia di vinificazione*

#### *Varietà a frutto bianco*

- raccolta delle uve in cassette da 15-18 kg;
- refrigerazione delle uve a 4 °C;
- pressatura dopo aggiunta di 50 mg/kg di acido ascorbico e 50 mg/kg di metabisolfito di potassio;
- chiarifica statica alla temperatura di 10 °C, previa aggiunta di 100 mg/L di enzima pectolitico;
- riscaldamento a 15-16 °C ed inoculo con lieviti selezionati;
- eventuale incremento dell'APA, solo se inferiore a 200 mg/L; aggiunta di tiamina;
- ossigenazione di un terzo del mosto al raggiungimento di 2% di alcol ed eventuale aggiunta di sali ammoniacali (50 mg/L);
- ossigenazione ed aggiunta di 50 mg/L di sali ammoniacali al raggiungimento di 8% di alcol;
- a fine fermentazione, travaso e aggiunta di SO<sub>2</sub> fino a 20-25 mg/L di libera o, se possibile, conservazione sur “lies totales” e a 16 °C fino ai trattamenti di stabilizzazione;
- batonnages periodici, nel caso di conservazione sur lies;
- test di stabilizzazione proteica e tartarica e stabilizzazione;
- aggiunta di SO<sub>2</sub> fino a 25 mg/L di libera, filtrazione ed imbottigliamento.

#### *Varietà a frutto colorato*

- raccolta delle uve in cassette da 15 a 18 kg;
- refrigerazione delle uve a 5 °C;
- diraspatura e pigiatura;
- eventuale macerazione a 10 °C per 24 ore previa aggiunta di 50 mg/kg di metabisolfito di potassio;
- riscaldamento a 16-18 °C;
- controllo dell'APA ed eventuale suo arricchimento con sali ammoniacali;
- aggiunta di tiamina;
- inoculo di lieviti selezionati;

\* I rilievi per determinare le caratteristiche produttive sono stati eseguiti in collaborazione con i responsabili del Progetto AGER dal titolo: “Caratterizzazione e valorizzazione dei vitigni autoctoni e loro inserimento nel database viticolo italiano”.



Fig. 1 Forme del lembo della foglia adulta.

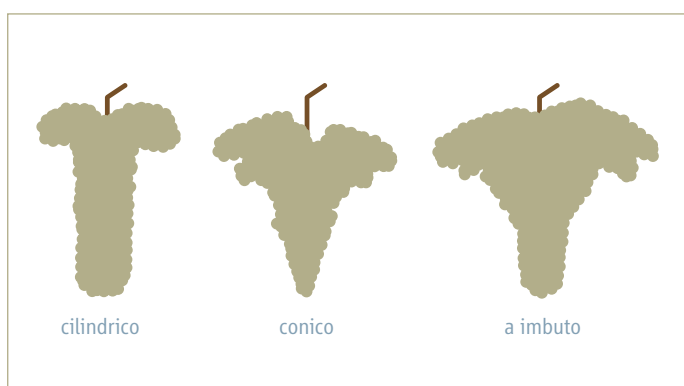


Fig. 2 Silhouette delle forme del grappolo.



Fig. 3 Silhouette delle forme dell'acino.

Tab. 1 Elenco dei loci SSR utilizzati per l'identificazione varietale

Locus SSR	Gruppo di associazione	Sequenza primer (5' → 3')	Riferimenti
VrZag62	7	F: GGTGAAATGGGCACCCGAACACACGC R: CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAG	Sefc et al., 1998
VrZag79	5	F: AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG R: TGCCCCATTTTCAAACCTTCC	Sefc et al., 1998
VVMD5	16	F: CTAGAGCTACGCCAATCCAA R: TATACAAAAATCATATTCCTAAA	Bowers et al., 1996
VVMD7	7	F: AGAGTTGCGGAGAACAGGAT R: CGAACCTTCACACGCTTGAT	Bowers et al., 1996
VVMD21	6	F: GGTTGTCTATGGAGTTGATGTTGC R: GCTTCAGTAAAAAGGATTGCG	Bowers et al., 1999
VVMD24	14	F: GTGGATGATGGAGTAGTCACGC R: GATTTTAGGTTTCATGTTGGTGAAGG	Bowers et al., 1999
VVMD25	11	F: TTCCGTAAAGCAAAGAAAAAGG R: TTGGATTGAAATTTATTGAGGGG	Bowers et al., 1999
VVMD27	5	F: GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT R: ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	Bowers et al., 1999
VVMD28	3	F: AACAATTCATGAAAGAGAGAGAGAGA R: TCATCAATTCGTATCTCTATTGCTG	Bowers et al., 1999
VVMD32	4	F: TATGATTTTTAGGGGGTGGAGG R: GGAAAGATGGGATGACTCGC	Bowers et al., 1999
VVS2	5	F: CAGCCCGTAAATGTATCCATC R: AAATCAAAATCTAATCAACTGG	Thomas and Scott, 1993

Tab. 2 Profilo allelico a 11 loci SSR per la varietà di riferimento Sangiovese

VrZag62	VrZag79	VVMD5	VVMD7	VVMD21	VVMD24	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VVS2
192-194	239-255	222-232	237-260	239-245	205-211	238-238	176-182	234-243	252-256	129-129

- ossigenazione di metà volume a 2% di alcol;
- due-tre rimontaggi o follature al giorno;
- ossigenazione di metà volume a 8% di alcol e aggiunta di 50 mg/L di sali ammoniacali;
- travaso e pressatura delle vinacce, a fine fermentazione;
- conservazione in recipiente colmo;
- induzione della fermentazione malolattica con inoculo di batteri selezionati ed eventuale aggiunta di attivanti;
- travaso dopo fermentazione malolattica e aggiunta di metabisolfito di potassio fino a 25 mg/L di SO<sub>2</sub> libera;

- affinamento con travasi parziali da un terzo a un quinto del volume totale ogni dieci giorni;
- mantenimento della SO<sub>2</sub> libera a 25 mg/L durante l'affinamento;
- chiarifica finale, stabilizzazione e imbottigliamento.

### *Metodologia di analisi del mosto e del vino*

#### *Analisi Foss*

Il Foss Wine Scan Flex è stato utilizzato per la sua capacità di dare una informazione multiparametrica dei principali dati necessari ad un enologo nel passaggio da uva a vino, in modo rapido ed efficiente. È possibile analizzare fino a 20 parametri sulla qualità, come etanolo, pH, zuccheri, acidità totale, acidità volatile, acido malico, acido lattico, glucosio e fruttosio.

#### *Dall'uva al vino*

Le analisi dei parametri chiave per verificare la maturità, che attraverso questo strumento si è riusciti a valutare, consentono prima della raccolta di tracciare delle curve di maturazione utili alla programmazione del momento della raccolta.

#### *Il sistema Foss si basa sul FT-IR: spettrofotometria I.R.*

I composti organici sono unici nel modo in cui essi hanno legami inter-atomici, che vibrano sotto i raggi infrarossi, con lunghezza d'onda caratteristica. Questo fenomeno è legato a un consumo di energia luminosa lungo specifiche lunghezze d'onda nella regione IR. La lunghezza d'onda dipende dal legame stesso (C-H, C-O, C-C, ecc.) e anche sul suo ambiente molecolare. Così una data molecola si tradurrà in varie lunghezze d'onda caratteristiche assorbite all'interno dello spettro infrarosso. L'intensità di assorbimento è direttamente proporzionale alla concentrazione della molecola in esame.

Lo spettro infrarosso di una soluzione organica, come il vino o il mosto, quindi mostra assorbimenti a determinate lunghezze d'onda. In questo modo, uno spettro contiene una quantità enorme di informazioni. L'analisi a raggi infrarossi utilizza queste informazioni per estrarre la concentrazione dei composti di interesse. Inoltre, da studi condotti presso il Centro per l'innovazione della filiera vitivinicola, dal confronto dei dati di acidità totale, acidità volatile, pH, densità 20/20, estratto secco, alcol determinati con metodi ufficiali e Wine Scan, sono emersi una buona correlazione ed un coefficiente angolare della retta di regressione prossimo a uno, ad indicare come il Wine Scan permetta di ottenere dati confrontabili ed in linea con i metodi ufficiali, con cui lo strumento è stato sicuramente calibrato.

### *Analisi degli aromi delle uve*

Da un campionamento rappresentativo delle varie cultivar oggetto di studio, sono state prelevate alcune centinaia di acini e 200 di questi sono scelti casualmente e pesati. Ogni acino è stato tagliato in due parti e, dopo rimozione dei semi, la polpa è stata staccata dalla buccia ed è stata posta in un becker contenente sodio metabisolfito, mentre la buccia è stata posta in una beuta contenente metanolo, per disorganizzare le membrane delle cellule delle bucce ed inattivare gli enzimi glicosidasi.

Dopo omogeneizzazione e centrifugazione, l'estratto ottenuto è stato reso perfettamente limpido con aggiunta di enzima pectolitico privo di attività glicosidasi.

Per la determinazione dei composti terpenici liberi (solo nel caso di uve aromatiche) e sotto forma eterosidica (aromatiche e non aromatiche) 100 mL di estratto (200 o più mL di estratto per le uve non aromatiche) sono stati addizionati di uno standard interno (1-eptanolo), e passati su una cartuccia C18 da 1 g (WAT 036795) previamente attivata o da 5 g per le non aromatiche, essendo elevato il volume di estratto utilizzato (200-400 mL).

Nel caso della cartuccia da 1 g (per quella da 5 g i volumi sono stati adattati in modo proporzionale), vengono eliminati i composti idrofili (zuccheri, acidi, sali) e sono stati eluiti i composti varietali liberi con diclorometano, disidratati con sodio solfato anidro. L'estratto organico disidratato, travasato in pallone da distillazione da 100 mL, è stato concentrato a piccolo volume e sottoposto ad analisi per GC e per GCMS.

I composti varietali sotto forma eterosidica sono stati eluiti successivamente dalla cartuccia C18 con metanolo, portati a secco sottovuoto, ripresi con 5 mL di tampone citrato fosfato a pH = 5,0, addizionati di un enzima ad alta attività glicosidasi e posti in termostato a 40 °C per 24 ore. Per le uve a bacca rossa oltre al tampone fosfato sono stati aggiunti 0,5 g di PVP allo scopo di assorbire i composti fenolici.

Al termine è stato aggiunto al prodotto di reazione enzimatica lo standard interno (lo stesso utilizzato per i liberi), e si è passata la fase liquida su una cartuccia C18 Sep Pak da 500 mg previamente attivata.

Sono stati eluiti i composti liberati per idrolisi enzimatica con diclorometano che sono stati raccolti, disidratati con sodio solfato anidro e successivamente l'estratto organico è stato concentrato e lo si è sottoposto ad analisi per GC-MS.

L'identificazione dei composti da determinare (terpenoli, norisoprenoidi, benzenoidi, alcanoli) è stata effettuata per confronto dei tempi di ritenzione (tr) e degli spet-

tri di massa con standard autentici (alcanoli, benzenoidi, linalolo,  $\alpha$ -terpineolo, citronellolo, nerolo e geraniolo) o sulla base degli indici di ritenzione e degli spettri di massa riportati in letteratura. La determinazione quantitativa è stata effettuata considerando uguale ad uno, rispetto alla standard interno (1-eptanolo), il fattore di risposta dei singoli composti.

### *Analisi dei polifenoli delle bucce dell'uva*

Per ogni campione prelevato di ciascuna varietà sono stati scelti casualmente 25 acini. Le bucce dei 25 acini, separate dalla polpa, sono state poste in tampone tartarico a pH 3.2 contenente SO<sub>2</sub>.

Si è preferito usare tale solvente per l'estrazione per i vantaggi che esso offre rispetto ad altri a maggior tenore in alcol e contenenti acidi forti che possono indurre, a carico degli antociani, reazioni di degradazione o di trasformazione e polimerizzazione. La presenza di SO<sub>2</sub> nel solvente di estrazione assicura l'inattivazione delle polifenolossidasi e un buon recupero dei composti contenuti.

I campioni di bucce sono stati omogeneizzati e centrifugati.

Per ogni campione si è ottenuto un estratto di bucce su cui sono state effettuate le seguenti analisi:

- antociani totali;
- flavonoidi totali;
- frazionamento degli antociani;
- HCTA;
- flavonoli.

- *Determinazione degli antociani e dei flavonoidi totali delle bucce dell'uva*

0,5 mL di estratto diluito 1:50 con etanolo cloridrico è stato letto allo spettrofotometro UV/VIS registrando lo spettro di assorbimento da 230 a 700 nm, su 1 cm di percorso ottico; sono state lette le assorbanze a 280 nm ( $E'_{280}$ ) e 540 nm ( $E'_{540}$ ) ed è stata calcolata l'assorbanza corretta a 280 nm ( $E'_{280}$ ), secondo il metodo elaborato da Di Stefano et al. (1989).

A partire da questi dati sono stati calcolati i tenori in:

- antociani totali mg/kg (come malvidina-3-glucoside);
- flavonoidi totali mg/kg (come (+)-catechina).

- *Determinazione degli antociani monomeri degli estratti di bucce per HPLC*

4,5 mL di estratto di bucce sono stati addizionati di 0,5 mL di acido fosforico 0,1 M, filtrati su membrana da 0,45  $\mu$ m e analizzati per HPLC.

Condizioni cromatografiche:

- colonna: Alltech 250 mm  $\times$  4,6 mm, Econosphere C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m;
- le lunghezze d'onda caratteristiche sono: 520nm.

Il risultato è un profilo antocianico, espresso in percentuali, che caratterizzerà e identificherà la cultivar.

- *Determinazione degli HCTA e dei flavonoli negli estratti di bucce per HPLC*

4,5 mL di estratto di bucce sono stati addizionati di 0,5 mL di acido fosforico 1 M, filtrati con membrana da 0,45  $\mu$ m e analizzati per HPLC.

Colonna: Alltech 250 mm  $\times$  4,6 mm, Econosphere C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m.

Le lunghezze d'onda caratteristiche sono 320  $\mu$ m per gli HCTA e 360  $\mu$ m per i flavonoli.

#### LEGENDA



Germoglio



Fioritura



Invaiaura



Invaiaura



Vendemmia



Vendemmia