



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biologia ambientale e Biodiversità
curriculum

Biodiversità vegetale ed Ecologia del paesaggio

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche
Sezione di Botanica ed Ecologia Vegetale
SSD BIO/01

COMPARAZIONE DEI PROFILI METABOLICI DI VARIETÀ DI CILIEGIO DOLCE (*Prunus avium* L.) MEDIANTE TECNICHE DI METABOLOMICA *UNTARGETED*

IL DOTTORE
FLAVIA DI CARLO

IL COORDINATORE
PROF. MARCO ARCULEO

IL TUTOR
PROF.SSA ANNA SCIALABBA

CO TUTOR
PROF.SSA FLAVIA GUZZO

CICLO XXIX
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2017

ABSTRACT

COMPARISON OF THE METABOLIC PROFILES OF SWEET CHERRY (*Prunus avium* L.) USING UNTARGETED METABOLOMIC APPROACHES

The spread of highly productive cultivars had a negative effect on the preservation of agrobiodiversity of *Prunus avium* L. and generated disinterest towards less productive but still deserving attention varieties, with their subsequent loss.

The scientific community has shown interest in this issue and studies with different approaches were conducted through the use of conservative practices in situ and ex situ on the germplasm still available.

The present research analyzes the agrobiodiversity of sweet cherry in relation to different metabolomics composition of fruits, expression of the genotype that characterizes them.

Research activities were conducted on the field, focused on collection of fruits from 20 cultivars of *Prunus avium* used as crops in different Italian areas with heterogeneous pedo-climatic conditions; the research objectives were to characterize qualitatively and quantitatively the secondary metabolites and to compare the specific metabolic profiles of fruits the different varieties of autochthonous and commercially relevant cherries cultivated in Italy, in Sicily and Veneto regions, by untargeted metabolomics approaches.

Data collected using HPLC- coupled mass-spectrometry provided a qualitative comparison of different samples while data validation and quantitative measurements were obtained by HPLC coupled to diode array.

The results obtained allowed the identification of metabolites specific to each cultivar and to identify those with the best organoleptic and nutritional properties with respect to their metabolic content. These results suggest that the recovery and valorization of ancient cultivars of *Prunus avium* L. , like “Sandra tardiva” and “Cappuccia”, for the presence of bioactive molecules might represent a potential investment for reevaluation of cherry cultivation as well as for the germplasm preservation of ancient genotypes currently cultivated only in limited areas.

RIASSUNTO

La diffusione di *cultivar* altamente produttive ha influito negativamente sulla tutela dell'agro-biodiversità di *Prunus avium* L. determinando disinteresse nei confronti di varietà meno produttive ma meritevoli di attenzione per il valore delle loro caratteristiche organolettiche e del relativo patrimonio genetico. Il mondo scientifico ha mostrato interesse nei confronti di tale tematica e ha condotto azioni di conservazione *in situ* ed *ex situ* per preservare il germoplasma ancora esistente.

La presente ricerca analizza l'agrobiodiversità del ciliegio dolce in relazione alla diversa composizione metabolomica dei frutti, espressione del genotipo che le caratterizza.

L'attività di ricerca svolta in campo ha riguardato l'esplorazione del territorio, la raccolta di dati e il campionamento dei frutti di 20 *cultivars* coltivate in aree geografiche con differenti condizioni pedoclimatiche mentre l'attività effettuata in laboratorio è stata rivolta allo studio metabolomico.

La caratterizzazione quali-quantitativa dei metaboliti secondari e la comparazione del peculiare profilo metabolomico dei frutti delle diverse varietà di ciliegia autoctone e commerciali, coltivate in Sicilia e in Veneto, è stata effettuata mediante indagine di metabolomica *untargeted*. Le analisi sono state condotte utilizzando la tecnica HPLC accoppiata a spettrometro di massa che ha fornito dati di tipo qualitativo, consentendo la comparazione dei campioni, mentre la validazione di tali dati è stata effettuata con un'analisi di tipo quantitativo utilizzando l'HPLC accoppiata a rivelatore *diode array*.

I risultati ottenuti hanno permesso di identificare la composizione metabolomica che caratterizza ciascuna varietà e ciascun gruppo osservato e di individuare le varietà con le migliori caratteristiche organolettiche, oltre che nutrizionali con riferimento al contenuto di metaboliti in essi presenti.

I risultati ottenuti suggeriscono che il recupero e la valorizzazione di vecchie varietà, come Sandra Tardiva e Cappuccia, alla luce della presenza di molecole bioattive rilevate, costituisce un potenziale investimento per la rivalutazione economica della cerasicoltura oltre che per la conservazione del germoplasma di antichi genotipi, attualmente coltivati solamente in ristretti comprensori.

PREMESSA

La necessità di tutelare la biodiversità nasce dalla considerazione che "diversità genera stabilità" e ciò vale sia per gli ecosistemi naturali sia per quelli agrari.

La tutela della diversità in agricoltura deve essere attentamente valutata. Una ridotta disponibilità di geni comporterebbe una minore variabilità che, a lungo andare, si potrebbe configurare in una maggiore vulnerabilità delle stesse specie.

L'evoluzione del panorama varietale delle specie coltivate, con l'introduzione di cultivar altamente produttive, si è proiettata verso obiettivi meramente quantitativi, tralasciando la salvaguardia delle peculiarità insite nella specie, con la conseguente perdita anche delle strategie biologiche che la stessa aveva messo in pratica in relazione ai fattori pedo-climatici del luogo di origine.

La perdita di biodiversità, nel corso degli ultimi decenni ha stimolato il mondo scientifico ad elaborare metodiche atte allo studio delle risorse genetiche intrinseche nelle varietà autoctone.

Diversi approcci di studio, miranti alla salvaguardia del germoplasma ancora esistente, sono stati portati avanti attraverso pratiche di tipo conservativo *in situ* ed *ex situ*.

Associando alle sopracitate tecniche di salvaguardia l'applicazione delle scienze omiche, si ottiene uno studio della biodiversità completo ed esaustivo oltre che informazioni utili riguardo il contenuto nutraceutico che determinati frutti possiedono intrinsecamente.

Il presente studio, attuando la comparazione dei metabolomi dei frutti di diverse cultivar di ciliegia autoctone e selezionate, si prefigge lo scopo di caratterizzare le diverse varietà alla luce della diversa composizione metabolomica, espressione del genotipo che le caratterizza.

Nondimeno, la conoscenza approfondita dei metaboliti secondari presenti in ciascuna varietà potrebbe fornire la chiave di volta per la valorizzazione della ciliegia ma anche di tante altre specie frutticole che caratterizzano la storia agricola italiana.

L'eventuale recupero di vecchie varietà, alla luce delle eventuali presenze di molecole bioattive, costituirebbe un potenziale investimento per la rivalutazione economica delle stesse.

1. INTRODUZIONE

L'Agricoltura, intesa come attività rivolta alla produzione di alimenti indispensabili alla vita dell'uomo, nel corso dell'ultimo secolo, ha subito una profonda evoluzione. In alcuni casi, la stessa, essendo sottoposta ai rigidi canoni della produttività e della standardizzazione delle produzioni, è stata orientata verso regimi produttivi alla pari di un'attività "industriale".

In passato la qualità dei cibi era identificata dalla composizione nutrizionale e dalle proprietà sensoriali peculiari dell'alimento in questione, tuttavia, nel corso degli anni, nuove applicazioni e modelli innovativi di produzione hanno orientato i produttori agricoli ad adattarsi ai gusti standard del consumatore, con la conseguenza di immettere sul mercato prodotti sempre più omogenei nelle caratteristiche organolettiche, riducendone così esponenzialmente le peculiarità.

Le logiche di mercato, dirette alla massimizzazione delle produzioni, hanno consentito l'ottenimento di rese produttive elevate e una facile standardizzazione e stagionalizzazione delle produzioni.

Ciò è stato possibile attraverso l'introduzione di nuove varietà ed ibridi che nel tempo ha favorito una ingente perdita di diversità biologica.

Se da un lato, questo può essere giustificabile in quanto in perfetta sintonia con gli attuali stili di vita di tutte le economie più "evolute", dall'altro pone dei grossi interrogativi sulla concezione del mondo agricolo nelle generazioni moderne e sulla sostenibilità ambientale.

1.1 IL VALORE DELLA BIODIVERSITÀ

Il grande patrimonio che è la biodiversità sia dal punto di vista ambientale, che da quello economico e socio-culturale, è sempre più in pericolo di estinzione a causa dell'omologazione dei consumi e di forme di agricoltura intensiva, basata sulla coltivazione di poche varietà altamente produttive.

Il valore della biodiversità fu dichiarato da un entomologo di fama mondiale, A Edward O. Wilson (Birmingham, 1929), che utilizzò per primo questo termine per esprimere il concetto di "diversità biologica" (*biological diversity*). Wilson, studiando i piccoli dettagli che componevano il grande mondo della "diversità della vita" (termine che dà il titolo ad una delle sue più famose opere), aveva compreso che dietro la biodiversità degli

organismi viventi, dei vegetali in particolare, si nascondeva un mondo di poteri nutrizionali e nutraceutici, un'infinità di opportunità che amava definire i "servizi dell'ecosistema".

È risaputo che salvaguardando le produzioni tipiche e tradizionali, si valorizzerebbero anche le specificità del territorio di origine, l'elemento culturale, sociale e, non meno importante, quello ambientale.

Queste considerazioni, negli ultimi anni, hanno spinto il mondo scientifico e istituzionale a focalizzare la propria attenzione su tematiche inerenti la biodiversità e la riduzione dell'impatto ambientale delle colture sull'ambiente, cercando di divulgarle il più possibile tra produttori agricoli e consumatori.

A beneficiare di questo nuovo stile di pensiero e di produzione sarebbero, in primis, le aree rurali del nostro Paese che riuscirebbero a riconoscere nella propria identità e unicità il vero valore aggiunto.

Il ruolo della biodiversità vegetale ed il valore che può assumere non si limita solo ad una questione alimentare e biologica ma può, senza dubbio, toccare settori e comparti di grande rilevanza economica.

Attualmente il mercato mondiale dei farmaci, che vale diverse centinaia di miliardi di dollari, si basa in buona parte su principi attivi estratti, direttamente o indirettamente, dai regni vegetale e animale.

La perdita di biodiversità, a seguito delle attività umane, comporterebbe conseguenze sempre più evidenti sugli equilibri naturali e sull'uomo sotto molteplici aspetti: aumento dei disastri naturali, come inondazioni o tempeste tropicali, riduzione della disponibilità e della qualità delle risorse idriche e un impatto devastante sull'economia e sulle società, dovuto alla riduzione delle risorse alimentari, energetiche e farmaceutiche a disposizione.

La storia dell'umanità è disseminata di esempi che rendono molto l'idea delle conseguenze derivanti dalla perdita di biodiversità.

Nel 1845 l'Irlanda e il resto d'Europa furono colpite da una carestia che provocò la morte di oltre 2 milioni di persone. La causa fu individuata nella diffusione del parassita fungino della patata *Phytophthora infestans*. A quel tempo, la patata coltivata in Europa apparteneva ad un ristrettissimo "pool" genico originario del Sud America che,

particolarmente suscettibile al parassita, fu letteralmente distrutta con conseguenze gravissime sulla popolazione del tempo (Andrison, 1996).

Altri esempi meritevoli di essere ricordati: la distruzione di piantagioni di caffè, la comparsa in Italia della peronospora del tabacco negli anni '60 e gli attacchi al mais da *Helminthosporium maydis* (fungo parassita) negli anni '70 in America (Goidànich, 1994).

A tutto questo c'è da aggiungere l'impoverimento delle tradizioni culturali.

L'agrobiodiversità o germoplasma, rappresenta infatti un sottoinsieme della diversità biologica, avendo costituito per secoli un forte legame con la cultura e le tradizioni agroalimentari di un paese.

Le risorse genetiche hanno peraltro giocato un ruolo incisivo anche nel miglioramento delle peculiarità delle specie coltivate e, tenuto conto dei più recenti orientamenti di settore, continueranno a svolgere in futuro questa loro funzione.

L'agrobiodiversità può essere considerata come un consistente contenitore di informazioni genetiche e di caratteristiche agronomiche utili nell'attività mirata all'ottenimento di nuove varietà vegetali da coltivare, in grado di adattarsi a specifiche condizioni climatiche e ambientali meglio di altre.

Momento cruciale per la formalizzazione delle tematiche concernenti la biodiversità è stata la Conferenza dell'Organizzazione delle Nazioni Unite su Ambiente e Sviluppo svoltasi a Rio de Janeiro nel 1992. Durante questa *convention*, nell'ambito della tematica "sistemi agrari e biodiversità", i Paesi firmatari si assunsero l'impegno di ricercare le condizioni che assicurino la compatibilità tra forme d'uso del suolo e conservazione della biodiversità e sostenibilità.

In questa stessa sede è stata promulgata la definizione attuale di biodiversità intesa come "variabilità tra gli organismi viventi appartenenti a ecosistemi terrestri, marini e acquatici e i complessi ecologici di cui questi sono parte, (...); ciò comprende la diversità all'interno delle specie, tra le specie e tra gli ecosistemi" (*Convention on Biological Diversity* CBD – art. 2), accezione confermata nel nostro Paese nel 1994.

Tale definizione identifica, quindi, tre ordini gerarchici di diversità biologica – genetica, specifica ed ecosistemica – che rappresentano i diversi aspetti dei sistemi viventi che già erano stati anticipati e declinati da Norse et al. (1986).

La *diversità genetica* o *intraspecifica* è intesa come la variazione di geni eterozigoti entro la specie; essa comprende la variabilità all'interno di una popolazione e quella tra popolazioni della stessa specie.

La *diversità specifica* è riferita alla variabilità ed alla pluralità di specie e genotipi entro un'area, una regione ed alla relazione tra le specie.

La *diversità ecosistemica* è connessa alla differenziazione di ambienti fisici, di raggruppamenti di specie di piante di animali e microrganismi e di processi ed interazioni che vengono a ristabilirsi di volta in volta tra loro (Scarascia e Mugnozza, 1997).

Applicata al sistema agrario, la diversità intraspecifica viene interpretata come conseguenza dell'interazione tra fattori ambientali e antropici.

Gli agricoltori, per ciascuna specie addomesticata, hanno saputo diversificare migliaia di varietà, adattandole ai loro fabbisogni alimentari e alle diverse condizioni ambientali.

L'uomo praticando l'agricoltura in ambienti pedoclimatici molto dissimili tra loro ha consentito un incremento della biodiversità delle piante coltivate. Non curando eccessivamente la purezza delle cultivar e lasciando che queste si potessero incrociare spontaneamente con le specie selvatiche affini, ha favorito una variabilità intraspecifica caratterizzata da genotipi idonei all'ambiente colturale, resistenti agli stress ambientali e alle fitopatie, dotati di caratteristiche nutrizionali e connotati qualitativi idonei alle necessità degli agricoltori e dei mercati.

Il miglioramento delle colture agricole finalizzato all'aumento della produttività, è sempre dipeso dalla diversità genetica e quindi dalla capacità di esso di adattarsi ai cambiamenti climatici. Grazie alla selezione operata nei millenni di storia dell'agricoltura, gran parte delle risorse vegetali si è preservata anche se, negli ultimi decenni, il *trend* è in contrasto con quanto appena affermato per l'introduzione di ibridi altamente produttivi che, sostituendo le varietà tradizionali, hanno notevolmente abbassato i livelli di biodiversità.

Nell'accezione riferita alla diversità agraria specifica si fa riferimento al numero di specie botaniche esistenti.

Sono state classificate circa 350.000 specie vegetali, di queste circa 80.000 sono commestibili e, nel corso della storia, l'uomo ne ha utilizzato circa 7.000 per la sua alimentazione.

Attualmente solamente 150 specie sono coltivate e di queste, soltanto appena un quinto sono considerate “colture principali”. Gran parte degli alimenti è fornita da sole 12 specie vegetali nelle quali rientrano ad esempio il riso, il mais, il grano e le patate.

La diversità ecosistemica si riferisce sia alle grandi differenze che ci sono tra i diversi tipi di ecosistemi, sia alle diversità di *habitat* e di processi ecologici che si verificano all'interno di ciascuno di essi.

Le linee di separazione esistenti tra comunità (associazioni di specie) ed ecosistemi risultano essere molto labili e fluttuanti. L'ecosistema è in continuo cambiamento e questa sua variabilità può essere applicata a diversi livelli considerando gruppi di comunità molto ampi, come foreste temperate o barriere coralline.

A livello globale, la maggior parte dei sistemi di classificazione hanno tentato di trovare un compromesso fra le complessità dell'ecologia delle comunità ed i parametri troppo semplificati di una classificazione generale degli *habitat* caratterizzandoli con attributi climatici, per esempio, foresta umida tropicale, o pascolo temperato.

Alcuni sistemi invece si sono riferiti alla biogeografia globale per analizzare le differenze nel biota fra regioni del mondo che presentano caratteristiche climatiche e fisiche molto simili. Allo stato attuale, la stima della diversità ecosistemica è ancora in fase embrionale. Tuttavia la diversità ecosistemica è una componente essenziale della biodiversità globale che dovrebbe essere presa in considerazione in ogni valutazione della biodiversità.

1.1.1 L'erosione genetica

La ricchezza di specie di un Paese è determinata dalla evoluzione del germoplasma locale, dall'apporto derivante dalle altre aree, dalle millenarie attività antropiche di domesticazione e di miglioramento genetico e dalle testimonianze storiche che rimandano alle culture del passato (Fideghelli e Engel, 2011).

Purtroppo però, da anni si assiste ad una costante perdita di biodiversità intraspecifica che richiama la comunità scientifica a prestare sempre maggiore attenzione ai fenomeni di “erosione genetica” che sottopongono a rischio di estinzione diverse specie vegetali e non.

Dall'inizio del secolo scorso si è infatti rilevata una diminuzione della diversità in agricoltura dovuta probabilmente alla diffusione di nuove cultivar con una base genetica ristretta (CNR, Istituto del Germoplasma, 2001).

Per le risorse agrarie vegetali, la FAO già nel 1993 aveva stimato una perdita accumulata di circa il 75% del patrimonio disponibile all'inizio del secolo scorso, dimostrando la concretizzazione del grido di allarme lanciato in merito al declino e/o estinzione delle specie, e alla conseguente restrizione del "pool" genico della stessa, già un ventennio prima (Scarascia Mugnozza, 1974).

L'interazione tra fattori ambientali e antropici è sempre stata presente così come la pressione selettiva esercitata dall'uomo nel corso dei secoli, che ha portato alla selezione di numerose varietà vegetali e razze animali localmente idonee ai caratteri ambientali, alle esigenze colturali e alla necessità delle economie di sussistenza o di mercato.

Come è noto, la variazione fenotipica, ovvero la variazione fra individui all'interno di una popolazione, è la risultante dell'azione congiunta di una componente ambientale e di una genetica (Joannsen, 1926).

L'uomo, nei millenni, ha sfruttato la variabilità genetica, in un primo tempo inconsapevolmente, successivamente attraverso l'applicazione di principi di selezione.

L'incremento quantitativo delle produzioni agricole e la difesa delle colture attraverso lo sfruttamento delle resistenze genetiche a fattori biotici e abiotici sono la conseguenza dell'azione antropica esercitata.

Il miglioramento della specie oggetto di selezione è strettamente relazionato alle differenze genetiche tra individui (variabilità genetica) e contemporaneamente diventa vulnerabile in caso di restrizione o perdita, andando incontro ad erosione genetica (Ricciardi e Filippetti, 2000).

A partire dagli anni '60, i sistemi agricoli si erano simultaneamente proiettati verso due opposte direzioni.

Nelle aree a più alta vocazione agricola si è sviluppato un modello agricolo rivolto a processi di intensificazione e semplificazione produttiva, introducendo così sistemi monocolturali, adeguati alla globalizzazione dei mercati, ma fragili e dannosi dal punto di vista ambientale.

Nelle aree meno idonee alla semplificazione ed intensificazione produttiva, come i territori dell'entroterra collinare e di montagna, purtroppo si è avviato un processo di marginalizzazione, che ha portato fino all'abbandono delle attività agricole (Barbera, 2001).

In aggiunta a ciò, negli ultimi decenni, si è anche registrata una contrazione delle superfici agrarie che ha interessato anche l'Italia, con la cessione di un milione e mezzo di ettari all'urbanizzazione.

Tali cambiamenti nell'uso del suolo, hanno portato alla perdita di tanta biodiversità che si era accumulata nel corso dei secoli (Barbera, 2001). L'agricoltura moderna, o nell'accezione comune "agricoltura industriale", ha puntato all'aumento della produzione per mezzo di varietà altamente produttive, anche se dipendenti da elevati input energetici come concimi, prodotti fitosanitari e meccanizzazione spinta.

Anche il mercato si è proiettato sempre di più verso una omogeneizzazione dei prodotti, determinando una standardizzazione delle varietà coltivate, che non sono più scelte in relazione ai tipi locali, ma sulla base delle caratteristiche imposte dai consumatori, delle esigenze di elevata produttività e della capacità di rispondere alle moderne esigenze agrotecniche come la resistenza a malattie e parassiti e alla presenza di specifiche utili alla distribuzione commerciale (conservabilità, trasportabilità, uniformità di pezzatura, maturazione uniforme, standard nella colorazione dei frutti ecc).

Ciò ha causato una preoccupante erosione genetica intraspecifica di tutti gli ecotipi locali, frutto di millenni di domesticazione che si è manifestata nella perdita della diversità genetica, incluso i geni che ne avevano consentito l'adattabilità delle specie e delle varietà alle diverse condizioni agro-ecologiche del pianeta. Questo potrebbe comportare una maggiore vulnerabilità delle specie coltivate ai cambiamenti ambientali o a nuove emergenze fitosanitarie. La progressiva scomparsa di varietà e popolazioni locali ha innescato quindi un pericoloso processo di erosione genetica che si riflette notevolmente anche sulla perdita della variabilità intraspecifica delle specie coltivate.

L'alta specializzazione dell'attività vivaistica ha determinato inoltre il progressivo abbandono della propagazione *in situ* del materiale vegetale da parte degli agricoltori, favorendo ulteriormente il fenomeno di erosione riguardante sia le specie e le varietà cosiddette minori sia quelle commerciali.

Molti genotipi locali sono andati perduti e quelli attualmente utilizzati mantengono solamente una frazione del patrimonio genetico della specie di appartenenza, per cui è estremamente limitata la loro capacità di adattamento ai futuri cambiamenti ambientali.

La variabilità genetica costituisce la base a cui potere attingere per procedere a programmi di miglioramento genetico per l'ottenimento varietà migliorate, più produttive

e idonee a condizioni agroecologiche specifiche o ad esigenze specifiche di mercato, ma se il processo erosivo continua a progredire limiterà sempre più questa risorsa.

In tal senso è fondamentale operare un'attività che miri alla conservazione della biodiversità per disporre in futuro di risorse fitogenetiche utili alla promozione di uno sviluppo sostenibile.

È risaputo che la moderna agricoltura intensiva, basata sulla coltivazione di un limitato numero di specie e varietà, ha giocato un ruolo non indifferente sulla diminuzione della diversità negli agro-ecosistemi.

Per tale ragione, la conservazione della biodiversità finalizzata all'uso sostenibile delle sue componenti e all'equa ripartizione dei benefici che derivano dall'utilizzo delle risorse genetiche, ha posto particolare fiducia su quanto operato attraverso la salvaguardia dell'agrobiodiversità, dalla quale dipende la sicurezza alimentare e la stabilità ambientale, soprattutto in certe aree del mondo.

L'agrobiodiversità, intesa come insieme di risorse fitogenetiche selezionate nei secoli, diventa un bene inestimabile da preservare.

La presenza di genotipi diversificati, idonei a differenti ambienti colturali, potrà consentire la trasmissione di caratteri di resistenza agli stress ambientali e una maggiore tolleranza alle fitopatie.

Attraverso metodiche connesse alle moderne biotecnologie, si potrebbe così trarre da ecotipi locali una fonte di variabilità utile a trasferire caratteri di resistenza e rusticità a molte varietà "erose" favorendo così un nuovo processo di diversificazione.

1.1.2 Conservazione delle risorse fitogenetiche

In contemporanea all'accentuato impoverimento della biodiversità, si è andato incrementando l'interesse nella conservazione delle risorse genetiche al fine di preservare geni, genotipi e pool genici, potenzialmente utili in processi produttivi, ottenibili per mezzo di metodi tradizionali di miglioramento genetico o attraverso le più moderne biotecnologie (CNR Istituto del Germoplasma, 2001).

Intorno agli anni '60, maggiore attenzione iniziò ad essere rivolta verso la salvaguardia delle risorse genetiche vegetali. Da allora, grazie al contributo del mondo scientifico, organi di governo, organismi nazionali ed internazionali, istituzioni pubbliche e private, organizzazioni di agricoltori, hanno intrapreso attività finalizzate a tale obiettivo.

La prima Conferenza Internazionale delle Nazioni Unite sull'Ambiente Umano, tenutasi a Stoccolma nel 1972, sottolineò la esigenza di salvaguardare la biodiversità vegetale per assicurare la sussistenza a milioni di famiglie di agricoltori e la sicurezza alimentare mondiale.

Nel giugno del 1996, durante la IV Conferenza Tecnica della FAO sulle Risorse Fitogenetiche, fu adottato il Piano Mondiale di Azione per la Conservazione e l'Utilizzazione Sostenibile delle Risorse Fitogenetiche.

I Paesi membri della FAO riconobbero quindi la necessità di sviluppare un sistema globale che assicuri la conservazione e l'utilizzazione sostenibile delle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura.

Altri organismi internazionali, come il *Consultive Group on International Agricultural Research* (CGIAR) con i suoi Centri Internazionali di Ricerca in Agricoltura (IARC), *l'International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR, ora IPGRI), *l'International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN), nonché altre Organizzazioni non Governative (NGO), hanno consentito di raggiungere notevoli progressi nella conservazione e valorizzazione della biodiversità ed in particolare delle risorse genetiche vegetali.

Le strategie scelte per la conservazione della biodiversità sono molteplici, ma complessivamente si possono ricondurre a due metodi fondamentali: conservazione *in situ* e conservazione *ex situ*.

Conservazione *in situ*

Attraverso il mantenimento delle popolazioni locali nei propri habitat naturali per le specie spontanee o ecosistemi agrari di origine per le specie coltivate si favorisce la conservazione *in situ*. Per favorire questo processo è fondamentale l'attiva partecipazione degli agricoltori che le hanno da sempre coltivate (Oldfield e Alcorn, 1987; Altieri e Merrick, 1987). La diversità genetica delle colture negli agroecosistemi, oltre ad essere determinata dalla struttura delle popolazioni (tassi di mutazione, migrazione, ampiezza della popolazione, isolamento, sistemi di selezione e deriva genetica) e selezione naturale indotta dall'ambiente circostante (suolo, clima, patogeni, competizione), è influenzata anche dalle tecniche di coltivazione e selezione adottate dall'uomo (Nabhan, 1985). Le risorse fitogenetiche vengono tramandate di generazione in generazione e sono soggette

a diverse pressioni naturali ed umane. Le diverse strategie selettive e conservative adottate nei secoli dagli agricoltori sono state inconsciamente, influenzate da fattori ambientali, biologici, culturali e socio-ambientali (Brush, 1991; Bellon, 1996). Nel corso del tempo, infatti, sono state operate delle scelte che hanno portato alla selezione di popolazioni che presentavano caratteristiche agro morfologiche ritenute più valide dall'agricoltore in relazione all'ambiente di coltivazione. A tal proposito, la tecnica di coltivazione adottata o la scelta di un particolare ambiente di coltivazione, possono determinare la sopravvivenza di particolari genotipi (Bellon & Taylor, 1993). Gli agricoltori, in relazione alla percentuale di sementi da conservare, da scambiare con altri agricoltori o da acquistare, hanno deciso e continuano a decidere anche l'entità della popolazione di ogni varietà da coltivare.

L'agricoltore in questo processo quindi assume un ruolo fondamentale per la riuscita della salvaguardia della biodiversità.

Conservazione *ex situ*

La conservazione *ex situ* consiste nella collezione di germoplasma di diversa provenienza, e quindi di notevole diversità genetica, presso delle "gene bank" (banche di germoplasma). In queste collezioni, il germoplasma (semi, organi, tessuti, cellule, embrioni, ovuli, genomi) opportunamente catalogato, viene immagazzinato secondo standard di conservazione (basse temperature, umidità controllata) e periodicamente rigenerato.

Questo metodo di conservazione offre l'opportunità di immagazzinare una notevole quantità di materiale fitogenetico in spazi relativamente ridotti, di contro consente di mantenere solo una piccola frazione della variabilità dei taxa, che può essere soggetta a deriva genetica.

In questa maniera si "congela" l'interazione tra i genotipi e l'ambiente che è una fonte importante di variabilità da preservare. Spesso è l'unico metodo efficace per salvaguardare le specie minacciate di estinzione o comunque rappresenta il primo "passo" per programmare delle attività di conservazione in situ. Molti Paesi hanno costituito banche del germoplasma. Le più importanti collezioni sono mantenute presso i "Centri Internazionali di Ricerca Agricola (IARC)" del CGIAR e presso istituzioni nazionali di Paesi avanzati o in via di sviluppo (Scarascia Mugnozza, 1998). Negli ultimi anni si stanno

diffondendo delle tecniche di conservazione in vitro attraverso la coltura di tessuti che possono essere crioconservati; tuttavia tali tecniche, allo stato attuale, risultano essere limitatamente praticate perché onerose. Per garantire una più efficace strategia conservativa i due metodi di conservazione devono essere necessariamente integrati, per permettere di attuare le diverse metodologie in relazione alle risorse da proteggere, al rischio di estinzione e alle dimensioni delle aree.

1.1.3 La biodiversità nella regione mediterranea

La regione mediterranea, in quanto centro di origine e diversificazione di diverse specie spontanee e coltivate, è una delle aree più ricche di biodiversità vegetale del mondo, assimilando a pieno quanto esposto a Rio de Janeiro in termini di numero di specie vegetali presenti e alle relazioni interconnesse.

I paesi europei rientranti in tale area ospitano una considerevole quantità di specie vascolari tanto che, la maggior parte degli studi biologici dedicati a questa regione, sottolinea il numero elevato di specie endemiche presenti che può raggiungere e superare il 40% per alcuni gruppi botanici. Proprio queste caratteristiche fanno sì che il Bacino del Mediterraneo rappresenti una delle 25 regioni *hot-spot* (area con una concentrazione eccezionale di biodiversità e con un'alta densità di specie endemiche) ad oggi riconosciuta di importanza mondiale. (Myers N. et al., 2000).

Nel corso della storia, alle specie autoctone si sono aggiunte quelle introdotte dall'uomo. Si stima che almeno 360 specie sono state domesticate per la prima volta o sono state ulteriormente selezionate nelle zone mediterranee (Perrino e Desiderio 1998). La domesticazione nell'area del mediterraneo è iniziata dopo l'introduzione di piante alimentari dal Medio Oriente tra il 5.000 e il 4.000 a.C (Zohary e Hopf, 2012). Diverse specie giunsero nell'area anche dalle zone centrali e settentrionali dell'Europa. Importanti specie, come ad esempio diverse drupacee, si importarono dall'Asia centrale e dall'Asia Minore. Un discreto numero di specie invece proviene dall'Africa settentrionale ed orientale, dalla Asia meridionale e dal Sud-Est Asiatico. Poche specie di importanza minore sono originarie dell'Africa meridionale. Bisogna ricordare che un cambiamento notevole riguardante l'agricoltura e l'alimentazione dei popoli del mediterraneo fu successivo al 1492 a seguito di un'importante introduzione di nuove specie dal Nuovo Mondo.

Nella regione mediterranea, l'Italia, grazie alla sua storia di varie dominazioni da parte di vari popoli e alla sua eterogeneità ambientale, può considerarsi un centro rilevante per la ricchezza genetica presente (Barbera, 2001). Le varie popolazioni che si sono susseguite nei secoli hanno portato con sé molte delle piante coltivate ed anche hanno sperimentato tecniche agricole diversificate adattandole di volta in volta alle condizioni esistenti. Questo ha determinato il seguente quadro: la maggior parte delle piante presenti sono native dell'area, invece molte altre, come numerose specie di piante foraggere, medicinali e ortive, sono state domestiche nell'area stessa.

L'Italia vanta inoltre, in termini percentuali; la maggiore superficie coltivata altamente diversificata e questo fattore, insieme alla grande variabilità ecologica, determina una vasta diversità degli agroecosistemi e della biodiversità intrinseca (Pignatti, 2000).

Questa estrema variabilità è dovuta al susseguirsi di fenomeni di estinzione e speciazione che hanno portato alla continua scomparsa ed evoluzione di diverse specie attraverso sovrapposte manifestazioni di colonizzazione dei diversi areali biologici, fenomeni favoriti proprio dalle caratteristiche dell'ambiente in questione, estremamente complesso sia in termini geomorfologici, pedologici e climatici, sia in termini sociali e culturali.

La varietà di condizioni bio-geografiche, geo-morfologiche e climatiche che caratterizza il suo territorio fa di essa una straordinaria "oasi" sia di specie, sia di *habitat*.

L'Italia, con le isole tirreniche, le Alpi Marittime e Liguri, la catena appenninica, è caratterizzata da un elevato numero di specie endemiche (Blasi et al., 2005).

Il "catalogo delle specie coltivate" di Hammer et al. (1992, 1999), enumera per l'Italia 665 specie, di cui 551 sono coltivate nel centro-nord della penisola, 521 nel sud e in Sicilia e 371 in Sardegna.

La Sicilia insieme a Sardegna e Corsica, secondo i dati forniti dall'*European Environment Agency* – EEA, rappresenta uno dei più importanti *hot spot* della regione mediterranea.

In particolare, essa ospita circa la metà delle specie vegetali e circa un terzo di tutte le specie animali attualmente presenti in Europa. Tutto questo rispecchia il cosiddetto *gradiente latitudinale* della ricchezza di specie, secondo il quale la diversità diminuisce all'aumentare della latitudine, cioè spostandosi dall'equatore verso i poli (Zullini, 1999).

Per quanto riguarda la biodiversità del mondo vegetale, la flora vascolare italiana (Fig.1) infatti comprende quasi 7.000 specie, di cui il 16% sono specie endemiche (Fonte ISPRA).

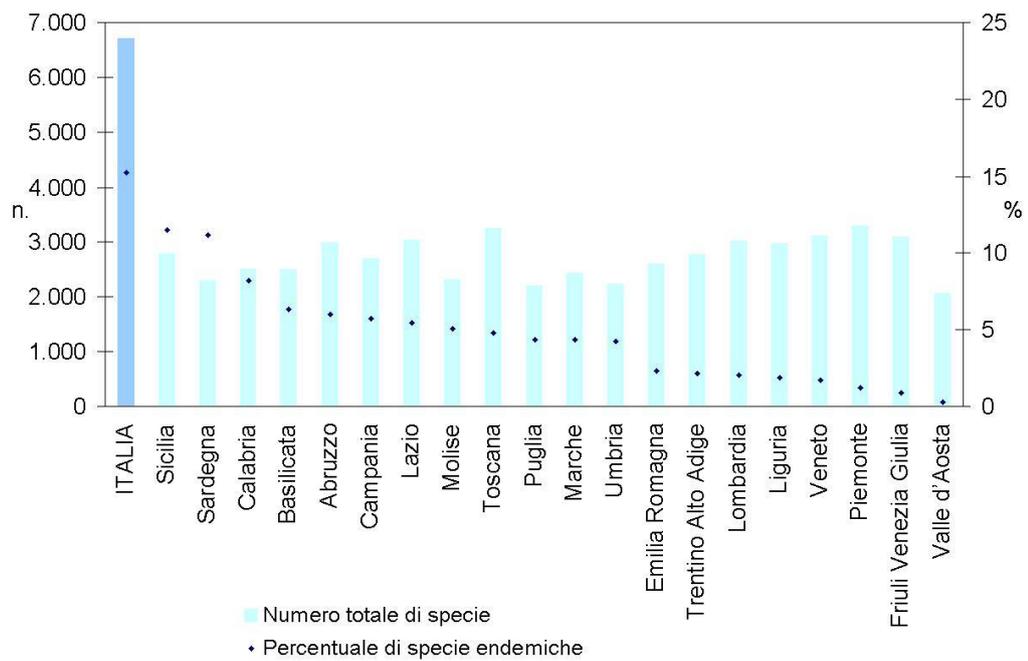


Figura 1. La flora vascolare italiana (ISPRA, 2013)

Tuttavia non mancano fattori di rischio per l'estinzione di diverse specie terrestri.

Nonostante vi sia una normativa di riferimento sempre più ricca che tenta di tutelare questa risorsa, permangono specifici fattori di perdita di biodiversità come la distruzione, la degradazione e la frammentazione degli habitat, a loro volta causati da calamità naturali ma anche dai profondi cambiamenti del territorio spesso prodotti dall'uomo.

L'azione antropica esercitata su molte aree e la distruzione, a scopo di lucro, di diversi ambienti naturali, ne minacciano seriamente il mantenimento. Molte aree selvatiche sono state oggetto di indiscriminati prelievi di piante o parti di piante per le industrie farmaceutica o cosmetica; anche nei paesi ricchi e più industrializzati continua la perdita di biodiversità per via della distruzione di *habitat* naturali o semi-naturali, per la costruzione di infrastrutture a spese della campagna, del bosco, dell'area umida, della prateria.

Anche le conseguenze dell'alterazione del clima sono oramai innegabili: alcune specie particolarmente sensibili a mutamenti anche minimi nei parametri climatici, come ad esempio le variazioni di temperatura, sono diventate molto più vulnerabili e la loro esistenza è a rischio come dimostrano i cambiamenti in termini di distribuzione e dei cicli biologici e anche l'Italia non è esente (Piccini, 2010).

Tra le cause più influenti l'inquinamento, causato dalle attività umane, ha alterato profondamente i cicli vitali di diverse specie in particolare quelle che stabiliscono uno stretto legame con il suolo.

Un'ulteriore azione di disturbo è data dall'introduzione di specie alloctone in un dato territorio che può portare alla diffusione di nuove malattie o anche alla sola riduzione di risorse per la sopravvivenza ed il nutrimento delle specie preesistenti.

Sono passati vent'anni dal Vertice Mondiale della FAO sull'Alimentazione, dove venne sottolineato che non era più possibile affrontare il problema del fabbisogno di cibo solo in termini quantitativi. Il punto focale fu spostato sulla sicurezza alimentare globale da raggiungere attraverso uno sviluppo sociale ed economico che tenesse in conto la necessità di rispettare l'ambiente e la sua biodiversità.

La conservazione e lo studio della biodiversità quindi sono intrinsecamente legati alle problematiche ambientali in quanto consente di razionalizzare le tecniche agronomiche e ridurre gli apporti di input esterni con una riduzione, dell'impatto ambientale, preservandosi essa stessa. Dal punto di vista evolucionistico il declino e l'estinzione di una specie possono essere considerati fenomeni biologici normali, tuttavia l'intensità della frequenza con cui questo evento si sta verificando desta grande preoccupazione e specialmente nel Meridione d'Italia e in aree montane dove le specie endemiche mediterranee affrontano le minacce maggiori.

La riduzione delle precipitazioni e/o l'aumento di fenomeni estremi alluvionali, gli incendi e l'aumento dei fenomeni erosivi, intesi in termini naturali e genetici, accelerano notevolmente questo processo.

Per le risorse genetiche frutticole la letteratura specializzata riporta numerosi esempi che sottolineano una grande perdita di biodiversità in un settore produttivo che pur annovera in Italia oltre 3.000 cultivar/accessioni ancora conservate presso diverse istituzioni (dati Mi.P.A.A.F).

Le pratiche agronomiche razionali, ma anche il mantenimento di aree colturali a frutto in collina e montagna, assumono oggi un ruolo preminente nella protezione dell'ambiente e nella gestione sostenibile degli ecosistemi, garantendone così una maggiore incolumità.

La salvaguardia di *cultivar* dai nomi e dai sapori quasi dimenticati, contraddistinte da particolari caratteristiche organolettiche e nutrizionali, dotate di estrema rusticità e resistenti alle più diffuse avversità, rappresentano un patrimonio genetico di interesse

ineguagliabile, in grado di concorrere ad assecondare la crescente esigenza di maggiore 'naturalità' delle produzioni.

1.2 IL CILIEGIO

1.2.1 Origine della specie

Il ciliegio dolce, *Prunus avium L.*, è un fruttifero originario di un'ampia area compresa tra il Mar Nero ed il Mar Caspio, a confine tra il continente europeo e asiatico, luogo d'origine comune ad altre drupacee come albicocco, mandorlo, pesco e susino.

Nell'accezione riferita al ciliegio acido, *Prunus cerasus L.*, pare che la sua denominazione derivi dal nome del luogo in cui, secondo una leggenda, un generale romano, Lucio Licinio Lucullo, raccolse tale pianta per portarla in Italia. La località in questione era Cerasonte, una città dell'Asia Minore che si affaccia sul Mar Nero.

In Italia, vi è testimonianza della sua presenza, in un periodo compreso tra il I sec. a.C. e il I sec d.C., in vari scritti di diversi autori latini riguardanti le tecniche di innesto e Plinio stesso ne elencava diverse varietà.

Alcune regioni d'Italia vantano una lunga tradizione nella coltivazione di questo albero da frutto.

Nel presente lavoro, a tal riguardo, ci approcceremo allo studio della cultura cerasicola di due zone di coltivazione molto dissimili tra loro sia per condizioni pedoclimatiche sia per il differente approccio che hanno riguardo la conduzione di tale specie fruttifera.

Le regioni prese in esame sono Sicilia e Veneto, con particolare riferimento ad alcuni areali produttivi dislocati rispettivamente nelle province di Palermo e di Vicenza.

L'antica presenza della cerasicoltura in Sicilia, dopo le testimonianze di Cupani (1696) e Nicosia (1725), è validamente supportata dall'opera dello Scigliano (1834) e dai lavori di Savastano (1926), Carrante (1941), Spina (1959) e Damigella (1973) .

In provincia di Palermo, le aree di coltivazione destinate alla produzione di ciliegie si possono ritrovare nel territorio di Altofonte, dove l'introduzione è abbastanza recente e nel territorio di Chiusa Sclafani dove invece la cerasicoltura vanta una tradizione agricola di lunga data.

Storicamente, l'introduzione della specie nel territorio chiusese la si deve proprio a Lucinio Lucullo, che arrivò in quelle zone, precisamente nella città sicana di Scirtea, l'odierna San Carlo ricadente nel territorio di Chiusa Sclafani, durante la seconda Guerra Servile (104-99 a.C.) per placare le rivolte degli schiavi che si stavano opponendo all'Impero e portò con se materiale vegetale riferito a tale specie.

Tuttavia, la testimonianza della presenza della coltivazione della ciliegia nel territorio chiese, si fa risalire alla metà del 1500, grazie ad alcuni riveli lasciati in favore del Monastero di Santa Maria del Bosco.

Agli inizi del XX secolo, Giuseppe Pitrè, descrivendo la festa del SS. Crocifisso di Chiusa Sclafani, riportò che “nello stesso paese si coltivano delle ciliegie davvero saporite, che vengono mangiate nel periodo della festa”.

Nel periodo fascista divenne celebre una canzone che, oramai timidamente fissata nei ricordi degli anziani, inneggiava “a Chiusa pi cirasi boni” per annoverare le ricchezze dei paesi dei monti Sicani (<http://win.lafrecciaverde.it/n124/sagra-ciliegie/art.html>).

I chiesi, in quanto produttori di ciliegie, vengono soprannominati dagli abitanti dei paesi vicini di “cirasara” e tradizione vuole che ci si raccomandi al santo delle ciliegie Gerardo Tintore o Tintori per ottenere una buona produzione. Si racconta infatti che il Santo si trattenesse spesso in chiesa a pregare fino a tarda ora. Una sera, per convincere i canonici del Duomo a lasciarlo rimanere oltre l'orario di chiusura, promise loro un cesto di ciliegie; benché fosse pieno inverno, glielo consegnò subito la mattina successiva.

A motivo di tale prodigio, San Gerardo viene sempre raffigurato con un rametto di ciliegie.

La provincia di Vicenza, invece, è caratterizzata dalla produzione della Ciliegia di Marostica, prodotto contraddistinto da una certificazione di qualità IGP.

Documenti storici indicano la coltivazione del ciliegio sulle colline di Marostica fin dall'epoca romana, ma la tradizione agricola, legata alla coltivazione di essa, pervenuta fino ai nostri giorni risale al 1400.

Un aneddoto legato alla ciliegia narra che nel 1454 Taddeo Parisio, castellano e governatore della “terra e castello nobile di Marostica”, doveva concedere la mano della propria figlia. Poiché erano due i contendenti, Taddeo decise, per evitare duelli, di darla in sposa a chi avesse battuto l'altro nella disputa di una partita a scacchi vivente. Taddeo concesse in matrimonio la fanciulla al vincitore e nello stesso giorno delle nozze ordinò che si mettessero a dimora in tutto il territorio delle piante di ciliegie in ricordo del lieto evento. Da quel momento sembra avere inizio la tradizione cerasicola che, con il passare del tempo, ha reso famoso questo comprensorio (www.venetoagricoltura.org).

1.2.2 La produzione di ciliegie nel mondo, in Europa e in Italia

La produzione mondiale di ciliegie (Fig.2) è stata stimata nel 2013 in 2.294.455 t, prevalentemente ottenuta nel continente asiatico ed europeo.

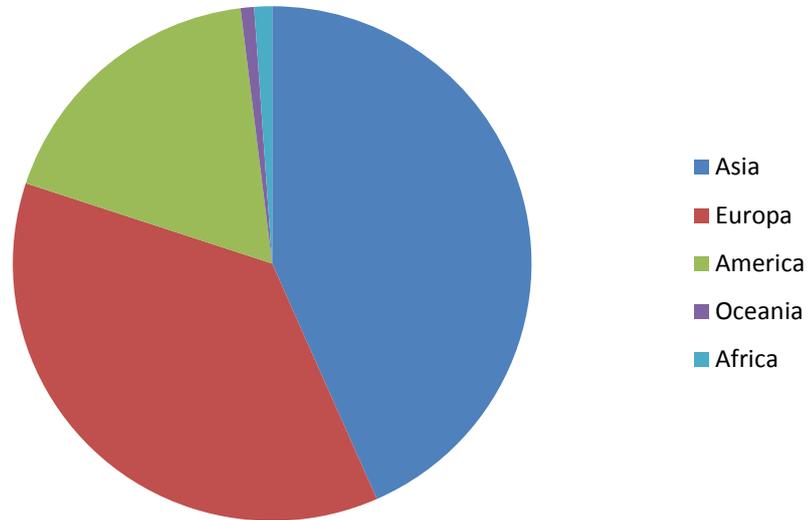


Figura 2. La produzione mondiale di ciliegie (FAOSTAT, 2013)

I Paesi maggiori produttori a livello mondiale (Fig.3) sono la Turchia con 494.325 t, gli Stati Uniti con 301.201 t e l'Iran con 199.995 t, che contribuiscono così per il 31,1 % alla produzione mondiale.

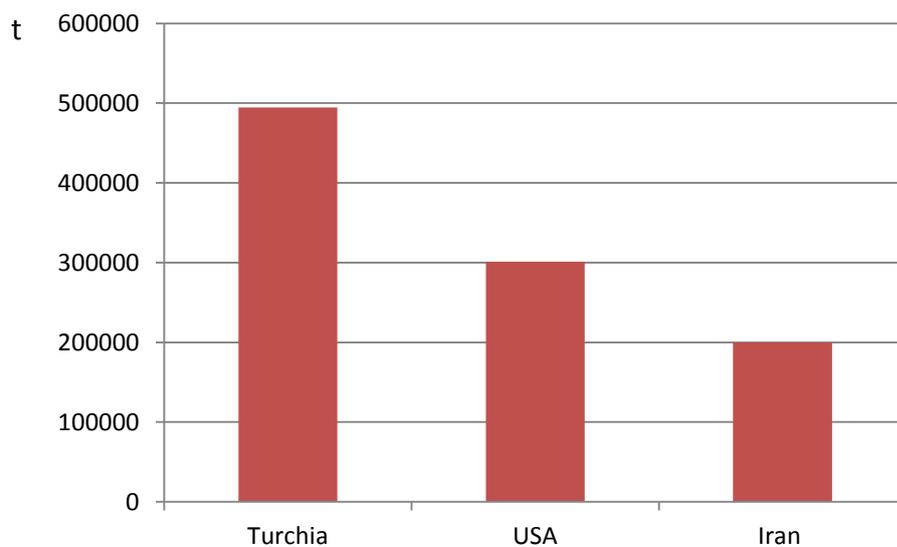


Figura 3. I Paesi maggiori produttori mondiali (FAOSTAT, 2013)

Nell'Unione Europea, Italia e Spagna (Fig.4) sono i maggiori produttori di frutta estiva e, anche nel caso della ciliegia, garantiscono la parte preponderante della produzione. L'Italia, producendo circa 131.175 t, si colloca ai vertici della graduatoria europea, segue la Spagna con 97.200 t, mentre Ucraina, Romania e Russia vantano una discreta produzione che si aggira in media intorno alle 80.000 t ciascuna, conclude la classifica dei maggiori paesi produttori la Grecia con 58.200 t. (Faostat, 2013).

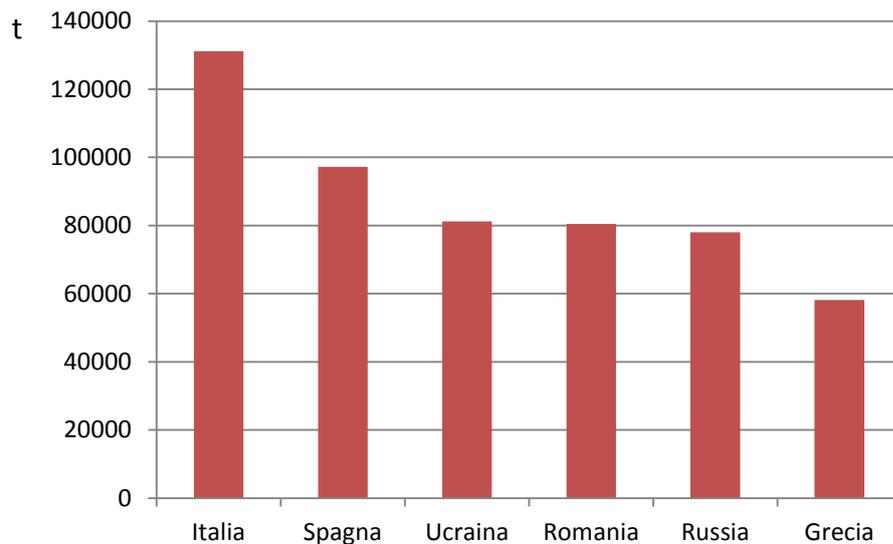


Figura 4. I Paesi maggiori produttori europei (FAOSTAT, 2013)

Se l'Italia è il leader europeo in termini di produttività, lo stesso non si può affermare per quanto riguarda l'esportazione. L'export italiano ha attraversato due fasi distinte negli ultimi venticinque anni. Negli anni '90 si è assistito ad una bilancia commerciale sempre positiva con un export che ha toccato le 15.000 t e un import che si è abbassato fino a 2.500 t mentre a partire dal 2000 si è registrato un netto cambio di tendenza connotato da negative performance. La Spagna, invece, presenta un'inversione di tendenza e nel 2013 è riuscita ad esportare 21.923 t contro le 10.414 dell'Italia (FAOSTAT,2013).

I maggiori importatori di ciliegie sono la Russia e la Germania che però stanno iniziando a investire sulle proprie coltivazioni, facendo così presagire un cambio di rotta nei prossimi anni.

La produzione italiana complessivamente, nel decennio 2003-2013, ha registrato una crescita costante; si è passati infatti da una produzione di 102.000 t nel 2003 a quella di 131.175 t nel 2013 (Fig.5), con un aumento pari al 22% con una sola evidente flessione

registrata nel corso della campagna 2012 probabilmente in conseguenza ad diminuzione della superficie coltivata e a registrata nello stesso anno che ha ridotto i volumi raccolti ad un valore di 104.766 t.

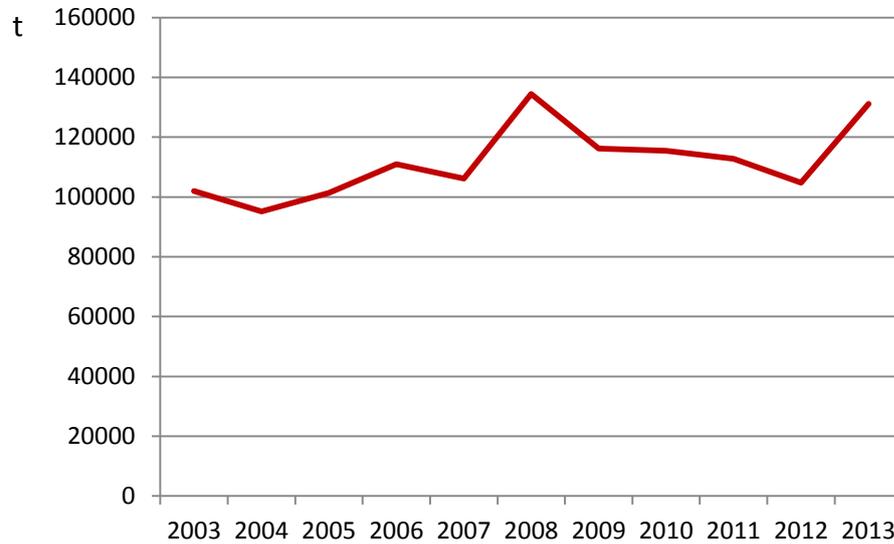


Figura 5. Produzione italiana di ciliegie nel decennio 2003-2013 (FAOSTAT, 2013)

All'incremento delle produzioni riferito al suddetto periodo corrisponde un aumento delle superfici investite a ciliegio: dal 2003 al 2013 si è infatti assistito ad un aumento del 7 % passando da 28.558 Ha a 30.581 Ha (Fig.6) in coltura specializzata (Faostat, 2013).

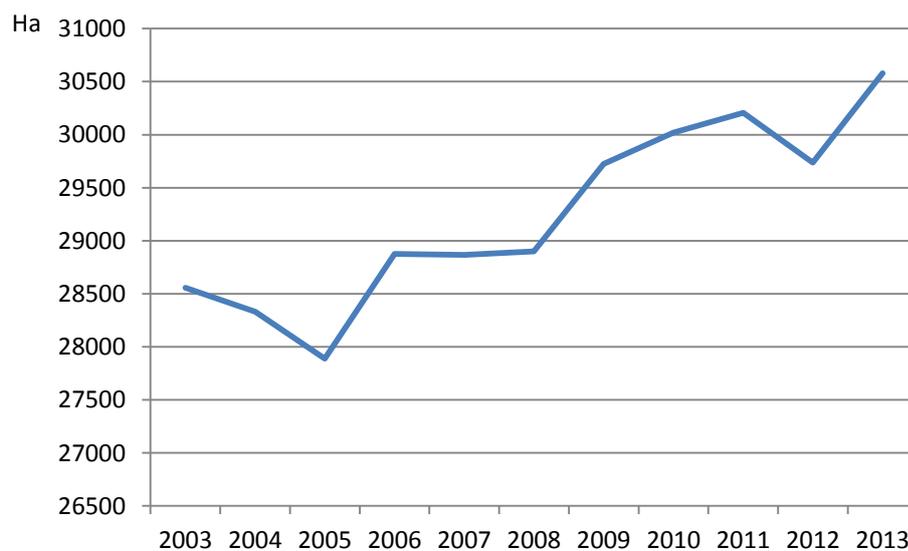


Figura 6. Andamento delle superfici investite a ciliegio in Italia nel decennio 2003-2013 (FAOSTAT, 2013)

E le previsioni sono anche più rosee, secondo il report del Global Agriculture Information Networks del 21 agosto 2015 si prevede per l'Italia un incremento di produzione, garantendo così una costanza nelle performance produttive che si attesta sulla soglia delle 131 000 t con un aumento della produzione specialmente nell'Italia meridionale.

Per imporsi in un sistema commerciale, dove l'Italia rimane ancora deficitaria riguardo la produzione di ciliegie, è necessario aumentare le superfici investite e coltivare varietà adatte all'ambiente di coltivazione al fine di produrre di più per soddisfare il mercato.

In Italia le regioni più produttive sono Puglia, Campania, Emilia Romagna e Veneto.

1.2.3 La cerasicoltura in Veneto e in Sicilia

I centri cerasicoli del Veneto sono rappresentati dalla provincia di Verona e Vicenza.

In quest'ultima il ciliegio trova spazio soprattutto nelle aree collinari, dove i problemi fitosanitari sono più contenuti rispetto al resto della regione.

In questo modo si contribuisce anche allo sviluppo economico di zone spesso marginali e poco idonee per altre specie frutticole.

Le colline di Marostica, infatti, rappresentano oggi il secondo distretto cerasicolo del Veneto. La coltivazione è concentrata principalmente nei comuni di Marostica, Salcedo, Fara Vicentino, Breganze, Mason, Molvena, Pianezze, Bassano ricadenti nella provincia di Vicenza, un territorio di alta pianura e collina tra i 90 e i 400 metri di altitudine con una superficie investita a ciliegie è pari a 706.00 Ha che fornisce mediamente una produzione di 34.900 q (ISTAT, 2011).

Il terreno in cui viene coltivato il ciliegio deriva in buona parte dall'alterazione di rocce basaltiche terziarie; è particolarmente fertile, povero di azoto ma ricco di potassio, che contribuisce molto favorevolmente alla qualità del prodotto.

La produzione è, in alcuni ceraseti, supportata da sistemi tecnologici innovativi sia dal punto di vista culturale che commerciale e si basa soprattutto sulla coltivazione di alcuni gruppi di varietà, localmente distinte come Sandre, Duroni e Marostegane. Si tratta in realtà di uno spettro varietale notevolmente ampio che vede la presenza di varietà autoctone che alloctone.

L'espansione e la specializzazione della coltura identificano e caratterizzano la cerasicoltura del territorio. Diversi fattori influiscono sull'interesse a tale coltivazione a tal

punto di essere in grado di valorizzare il prodotto con l'ottenimento del marchio di qualità IGP.

L'aumento della domanda di frutti freschi di qualità e il ridimensionamento della coltura in altre zone di produzione, sia nazionali, sia estere ha incoraggiato i coltivatori a sostenere tale settore.

Nondimeno, la presenza di varietà particolarmente apprezzate per le loro qualità di pregio stimola i produttori a tentare di ampliare questo settore agricolo.

Ma anche il mondo della ricerca ha iniziato ad occuparsi in maniera sistematica della cerasicoltura veneta. Oltre a dare precise indicazioni che permettono agli agricoltori una migliore gestione della coltura sotto diversi aspetti, ha puntato verso la valorizzazione delle caratteristiche nutrizionali proprie di questi frutti, riscuotendo grande interesse nella collettività.

In Sicilia, il ciliegio, nei diversi comprensori di coltivazione, è dotato di un germoplasma autoctono molto eterogeneo, caratterizzato dalla presenza di diversi biotipi a cui si accompagnano alcune varietà nazionali ed estere di recente introduzione.

In accordo al già noto processo di "meridionalizzazione della frutticoltura", si è riscontrato un incremento delle superfici investite ad ciliegie in molte regioni del Mezzogiorno (Crescimanno e Sottile, 2003) ma in Sicilia la superficie investita è rimasta pressoché costante.

Il ciliegio, del resto, è stato sempre presente nell'Isola anche grazie ad una sia pure ristretta popolazione di ecotipi locali che si sono sempre più affermati nelle zone di differenziazione, nelle quali hanno contribuito a mantenere presente la coltura per secoli senza mai investire grandi risorse in questo settore.

Tuttavia il territorio siciliano, presentando un'orografia molto diversificata, offre una eterogeneità di ambienti che possono essere sede di svariate tipologie di coltivazione tali da consentire produzioni diversificate, ma con una forte valenza di tipicità fra esse.

Inoltre la presenza di molteplici microclimi, presenti nei diversi areali in considerazione delle differenze altimetriche e di esposizione, le differenti condizioni pedologiche e la lunga storia di attività frutticola dell'uomo hanno consentito nel tempo la selezione e la propagazione di interessanti varietà e biotipi con un ampio calendario di maturazione

La costa, con il suo clima più mite, la montagna con un clima più temperato e la collina che media le due situazioni, possono essere ambiente favorevole per lo sviluppo di differenti colture o di settori diversi della stessa coltura.

Il clima meridionale esalta in generale le caratteristiche agronomiche e qualitative della maggior parte delle specie frutticole.

La vocazione ambientale di molte aree meridionali è anche espressa, sotto il profilo agronomico, dal minore rischio di perdite produttive dovute ai danni causati da gelate primaverili e, dal punto di vista qualitativo, da un più elevato contenuto zuccherino dei frutti e dai limitati problemi da *cracking*, grazie alla minore presenza di precipitazioni nel periodo pre-raccolta.

Le aree interne della regione, caratterizzate da clima più freddo e continentale, potrebbero fornire perfettamente lo spazio a specie frutticole come il ciliegio, caratterizzate da un alto fabbisogno in freddo che, sulla costa, non riscontrerebbero condizioni ideali di sviluppo.

Il mancato soddisfacimento del fabbisogno in freddo, come di quello in caldo, determina una mancata differenziazione delle gemme a fiore e aborto dell'ovario con conseguenze che si rifletterebbero sulla produzione.

In Sicilia la coltura cerasicola è prevalentemente diffusa nelle province di Catania e Palermo.

Il comprensorio di Chiusa Sclafani, in provincia di Palermo, costituisce uno degli areali preferiti da questa coltura perché caratterizzato da particolare microclima che consente la coltivazione di diverse varietà autoctone tra cui ricordiamo la Cappuccia.

Già dalla fine degli anni sessanta, si tentò di valorizzare questa produzione, con l'istituzione della sagra da parte della Pro-loco locale. Da quell'anno in poi, diverse iniziative hanno consentito alla piccola drupa di farsi conoscere e apprezzare in tutta la Sicilia.

La cerasicoltura ha però rivestito solo un modesto ruolo nell'economia locale, probabilmente perché non è supportata da impianti specializzati e da adeguati sistemi di distribuzione e di commercializzazione del prodotto.

La ciliegia di Chiusa Sclafani, con i suoi 3800 q.li di produzione, potrebbe costituire, per la comunità chiusese, un prodotto di pregio che, grazie alla valorizzazione delle sue

caratteristiche peculiari ad alta individuazione, tale da esercitare un rilancio dell'economia agricola locale.

Quindi operando una tutela diretta verso queste produzioni che possono o meno vivere una condizione di criticità (rischio di estinzione reale o potenziale) si potrebbe fornire la possibilità per valorizzare un territorio.

L'attenzione rivolta a prodotti agroalimentari legati alla memoria e all'identità storica – culturale di un territorio che manifestano peculiarità ampiamente riconoscibili offrono spunto alla rivalutazione di varietà o ecotipi autoctoni che sono tradizionalmente coltivati.

Le caratteristiche qualitative (organolettiche soprattutto) peculiari, dovute allo stretto legame ambientale con uno specifico territorio molto spesso concedono la possibilità di creare un indotto economico ristretto ma di eccellenza.

Pertanto, in un mercato con sempre maggiore competizione, i prodotti di qualità certificata possono rappresentare un punto di forza per lo sviluppo dei sistemi agroalimentari locali.

1.2.4 Il ciliegio: interesse economico

Il comparto agricolo italiano, per le condizioni climatiche favorevoli di cui beneficia, è caratterizzato da produzioni ortofrutticole di ottima qualità, concorrenziali rispetto alle altre produzioni estere, che, anche grazie alle peculiarità climatiche, coprono un calendario di offerta molto ampio.

Oltre alle produzioni "ordinarie", l'Italia si caratterizza per la presenza di uno straordinario patrimonio di produzioni ortofrutticole di eccellenza che godono della certificazione di qualità e tutela (DOP, IGP, STG, PTN, Presidi Slow Food).

I livelli di riconoscimento che l'Unione Europea ha stabilito (DOP, IGP, STG) rappresentano una valida strategia che mira alla valorizzazione non solo delle produzioni agroalimentari ma anche del territorio in cui sono prodotte.

Il ciliegio, anche se da sempre è considerato "minore" a causa della bassa incidenza delle superfici investite in Italia, possiede tutte le caratteristiche utili all'inserimento in un progetto che miri alla sua valorizzazione.

Sotto l'aspetto economico, la ciliegia manifesta difficilmente eccedenze produttive e ciò, insieme all'ottima recettività dei mercati, spinge i frutticoltori ad un'attenzione sempre maggiore verso questa specie.

La tendenza del mercato è legata ai desideri del consumatore, quindi alla domanda del prodotto. Il consumatore apprezza la ciliegia anche perché rappresenta il primo approccio con la frutta fresca della stagione estiva. Inoltre è un frutto "facile da mangiare": non si sbuccia, non sgocciola e viene considerato frutto di facile consumo anche al di fuori dell'ambito domestico - "frutto snack".

Le caratteristiche organolettiche della ciliegia quali sapore, dolcezza e succosità, e quelle prettamente estetiche devono rispondere alle richieste del consumatore che desidera un frutto intensamente colorato, di buona pezzatura e di buon sapore, ossia una ciliegia "bella da vedere e buona da mangiare".

Sino ad oggi le varietà coltivate hanno ben supportato le esigenze del consumatore, ma solo se inserite nell'ambito di filiere corte, dove le caratteristiche del frutto non risentono eccessivamente di perdite qualitative dovute allo stoccaggio post-raccolta.

Tuttavia, a seguito delle nuove tendenze di mercato, con una sempre maggiore verticalizzazione del processo produttivo, nasce l'esigenza di ricercare un prodotto che ampli il calendario di maturazione e che, soprattutto, non perda le tanto ricercate caratteristiche di qualità in fase post-raccolta. Si auspica l'adozione di opportune tecnologie per poter preservare e valorizzare al meglio la qualità del prodotto fino all'arrivo al consumatore.

Inoltre, ai requisiti estetici richiesti dalla maggioranza dei fruitori se ne aggiungono altri, legati ad una nicchia di consumo molto più ristretta ma molto esigente. Infatti, in seguito ad un aumento di interesse relativo alla tutela della salute e alla salvaguardia dell'ambiente, il consumatore più accorto è disposto a pagare un po' di più per acquistare un prodotto ottenuto con metodi più rispettosi della natura e dell'uomo stesso.

Anche in conseguenza di quanto appena detto, in merito alle produzioni agricole è cresciuta l'attenzione da parte degli imprenditori verso tecniche a basso impatto ambientale, con un uso più razionale dei fattori produttivi.

L'interesse rivolto verso la coltivazione di varietà precoci che, garantendo un anticipo nell'immissione nel mercato, consentirebbe un vantaggio prettamente economico in periodi molto favorevoli ed inoltre offrirebbe anche l'opportunità di condurre l'impianto

in regime biologico dal momento che l'epoca di maturazione ricade in periodi in cui non è preoccupante la diffusione della mosca della frutta.

La produzione biologica, in ogni caso, è destinata ad aumentare per rispondere sempre più esaurientemente alle esigenze dei consumatori più attenti, indicatori principali delle nuove problematiche sociali.

La qualità tradizionale, la salubrità degli alimenti e la salvaguardia dell'ambiente sono tematiche che, oltre a dare l'input per lo sviluppo di tecniche produttive non convenzionali, potrebbero anche spingere verso la differenziazione delle produzioni, elemento indispensabile per aumentare la competitività sul mercato.

A dar forza a queste nuove tendenze ci sono anche gli incentivi comunitari che invogliano il coltivatore a dirigersi verso tecniche agronomiche alternative e adeguate alle circostanze.

Anche la valorizzazione delle produzioni locali attraverso l'adozione di marchi – IGP permetterebbe di realizzare un valore aggiunto attraverso l'esaltazione della qualità e la specifica peculiarità delle produzioni locali.

Tuttavia nel settore, salvo eccezioni, sono presenti delle resistenze commerciali che non permettono la diffusione di un modello organizzato ed efficace costituendone così un punto di debolezza che continua a gravare pesantemente sul potere contrattuale dei singoli cerasicoltori e che penalizza le loro attese di ricavare maggior reddito dalla coltura. Pertanto la ciliegia anche se è una cultura apprezzata, presenta delle peculiarità di tipo gestionale che ne limita la diffusione

1.2.5 Miglioramento genetico e panorama varietale

Il miglioramento genetico ha puntato verso la selezione di nuove varietà, che potessero superare problematiche insite nella biologia della specie, come la diffusa autoincompatibilità, e che potessero soddisfare le richieste del mercato, garantendo un calendario di raccolta più ampio.

La costituzione di varietà autocompatibili, dotate di resistenza agli stress di natura biotica-abiotica e con buona produttività ben distribuita lungo il calendario di maturazione, ha consentito di migliorare la gestione del ceraseto in termini sia quali-quantitativi sia economici.

Si è puntato all'ampliamento del calendario di maturazione in epoca precoce, perché la ciliegia è tra i primi frutti ad aprire la stagione estiva, quindi invoglia il consumatore all'acquisto e, inoltre, se precocissima, non entra in competizione con altri frutti estivi, come pesche, nettarine, susine, garantendo così una buona redditività.

Per di più, il valore delle varietà precoci potrebbe essere esaltato all'interno di impianti condotti in gestione biologica e/o integrata, poiché il loro ciclo produttivo ricade in un periodo poco favorevole ai temibili attacchi di mosca e quindi non necessiterebbe di trattamenti antiparassitari, al punto di riscuotere maggiormente anche l'interesse del consumatore più attento.

Tuttavia, anche l'ottenimento di varietà tardive ed extra-tardive possiede un valore economico di rilievo per quegli areali in cui le condizioni climatiche sono in grado di soddisfare i relativi fabbisogni in freddo. Tali varietà, infatti, sono contraddistinte da alta qualità, in grado di mantenere ancora un buon prezzo in epoche dove la competizione con altri frutti estivi è notevole.

Non va dimenticato che le cultivar sono state selezionate in funzione anche di altri parametri, come la consistenza della polpa, la serbevolezza e la *shelf life*, perché è fondamentale che sulla mensa del consumatore giungano frutti nel pieno delle qualità organolettiche.

Per garantire quindi la buona riuscita di un impianto, la scelta della cultivar è il passo più difficile ed importante da dovere compiere, in quanto sono molteplici i fattori da dover tenere in considerazione che vanno dalla gestione agronomica del ceraseto e arrivano alla commercializzazione del prodotto.

Il frutteto, infatti, deve essere considerato come un sistema complesso in cui interagiscono materiale biologico, fattori ambientali e pratiche agronomiche.

Spesso le cultivar di ciliegio mostrano un comportamento fenologico, agronomico e pomologico molto diverso in funzione dell'ambiente pedo-climatico in cui vengono coltivate.

Tale comportamento si traduce ovviamente in risultati produttivi e giudizi commerciali frequentemente contrastanti da regione a regione.

Diffondere una cultivar tra tante, significa dare rilevanza economica e qualitativa ad una varietà sia perché richiesta dal mercato ma anche perché meglio si presta alle caratteristiche dell'ambiente in cui si deve insediare.

In merito a questo aspetto, diversi progetti sono stati portati avanti dal Mi.P.A.F., tra i quali ricordiamo il progetto “Liste di Orientamento Varietale dei fruttiferi”, che ha avuto e continua ad avere l'intento di informare gli operatori del settore orto-frutticolo in merito alle cultivar più adatte per i diversi ambienti italiani.

Alla luce di quanto detto, le varietà autoctone sono state affiancate, nel tempo, da altre di nuova generazione che si sono ben adattate alle condizioni pedoclimatiche italiane.

Si riporta di seguito una breve descrizione delle varietà che sono state oggetto di studio in questo lavoro.

Le cultivar vengono classificate sulla base della posizione che occupano all'interno del calendario di maturazione, in relazione alla cultivar “Burlat”, scelta come riferimento, per la sua larga diffusione sul territorio nazionale e la cui epoca di maturazione ricade intorno al 25 maggio.

Cultivar precoci

In questa fase del calendario varietale ci si ritrova di fronte all'esigenza di disporre di un frutto che risponda alle richieste del mercato sia in termini di produttività che di caratteristiche organolettiche.

EARLY BIGI® Bigi Sol*

Albero vigoroso, a portamento espanso, con rami aperti. Autoincompatibile. Fioritura precoce, di buona entità. Frutti di medio-grossa pezzatura con buccia di colore rosso brillante, polpa mediamente consistente, di sapore medio.

Maturazione precoce. Produttività elevata e costante. Alta suscettibilità al cracking.

FRANCESE/BURLAT

Albero di media vigoria e portamento espanso. Autoincompatibile. Fioritura medio-precoce, di entità medio-scarso. Frutti di media pezzatura con buccia di colore rosso intenso e polpa rosa, dalla consistenza medio-scarso, mediamente succosa. Maturazione precoce. Produttività media con maturazione scalare. Scarsamente resistente alle manipolazioni ed al cracking.

SANDRA

Albero molto vigoroso e a portamento assurgente. Autoincompatibile. Fioritura medio-precoce, di media entità. Frutti di media pezzatura con buccia di colore rosso non uniforme e polpa rosso carnacino, dalla consistenza media, mediamente succosa. Maturazione precoce. Produttività media con maturazione scalare. Suscettibile al cracking se nei giorni immediatamente prima della raccolta si verificano eventi meteorici avversi.

SWEET EARLY® Panaro 1*

Albero vigoroso, a portamento semi espanso. Autofertile. Fioritura medio-tardiva, di elevata entità. Frutti di elevata pezzatura con buccia di colore rosso scuro brillante a maturazione completa, polpa poco consistente, di ottimo sapore. Maturazione precoce. Produttività medio-alta su portinnesti deboli. Buona tenuta di maturazione in pianta, sensibile al cracking.

Cultivar intermedie

Molto ben assortito appare il periodo medio-precoce, che comprende cultivar di pregio sia sotto il profilo organolettico che produttivo.

BELLA ITALIA

Albero di vigore medio e a portamento assurgente-espanso. Autoincompatibile. Fioritura intermedia e di media entità. Frutti di media pezzatura con buccia di colore rosso intenso, polpa di colore rosso, di consistenza medio-scarso, di discreta qualità gustativa, sapore dolce e succulenza medio-elevata. Maturazione intermedia. Produttività media. Poco soggetta a spaccature.

BLACK STAR*

Albero di vigoria medio-elevata, portamento espanso. Autofertile. Fioritura intermedia, costante ed abbondante. Frutti di grossa pezzatura con buccia di colore rosso scuro brillante, polpa rossa di elevata consistenza. Maturazione media. Produttività elevata. Tenuta di maturazione ottima ed elevata resistenza al cracking.

GIORGIA

Albero di vigore medio elevato con portamento semi espanso Autoincompatibile. Fioritura intermedia, di entità medio-alta. Frutti di grossa pezzatura con buccia di colore rosso brillante, rosso scuro a piena maturazione e con polpa soda e rossa. Maturazione media. Produttività elevata e costante. Tenuta di maturazione buona, poco suscettibile al cracking. Precoce entrata in produzione con produttività elevata e costante.

GRACE STAR*

Albero vigoroso, a portamento espanso. Autofertile. Fioritura precoce, di entità elevata e costante. Frutti di grossa pezzatura anche in presenza di forte produzione con buccia di colore rosso porpora brillante, con polpa rosa, di media consistenza. Maturazione media, uniforme. Produttività elevata. Tenuta di maturazione media e mediamente suscettibile al cracking.

MILANESE

Albero di vigoria media e a portamento assurgente-espanso. Autoincompatibile. Fioritura intermedia e di media entità. Frutti di media pezzatura con buccia di colore rosso, polpa rosa e consistenza medio-elevata, di discreta qualità gustativa, sapore dolce e succulenza media. Maturazione medio-tardiva. Produttività media. Poco soggetta a spaccature.

ROANA

Albero mediamente vigoroso a portamento assurgente. Autoincompatibile. Fioritura intermedia e di media entità. Frutti di media pezzatura con buccia di colore rosso cupo uniforme, mediamente consistente; polpa di colore rosso vinoso, molle, mediamente succosa. Maturazione medio-precoce. I frutti sono facilmente danneggiati dalle piogge nel periodo di raccolta.

ROMANA

Albero molto vigoroso a portamento assurgente. Autoincompatibile. Fioritura intermedia e di media entità. Frutti grossi con buccia di colore rosso amaranto non uniforme, molto consistente; polpa di colore rosa, soda, mediamente succosa. Maturazione intermedia. I frutti qualitativamente pregiati, sono abbastanza resistenti alle manipolazioni.

VAN

Albero di vigoria medio-elevata e portamento espanso. Autoincompatibile. Fioritura intermedia e di media entità. Frutti di buona pezzatura con buccia di colore rosso-nerastro, polpa rossa e consistente. Maturazione media. Produttività medio-elevata. Suscettibile al cracking.

Cultivar tardive

Questo periodo è molto interessante per la ricchezza di cultivar di notevole pregio.

CAPPUCCIA

Albero mediamente vigoroso a portamento espanso. Autoincompatibile. Fioritura e maturazione tardiva. Frutti di media pezzatura con buccia e polpa di colore rosso-vinoso. Consistenza molle e molto succosa. I frutti, pur presentando buone caratteristiche organolettiche, hanno un limitato valore commerciale.

DURONE DEL CHIAMPO

L'albero è molto vigoroso con portamento mediamente espanso. Il frutto è di pezzatura grossa, buccia di colore rosso intenso, polpa grossa, soda e di ottimo sapore. Varietà interessante per il consumo fresco, molto resistente alle manipolazioni ma sensibile alle spaccature dei frutti.

DURONE ROSSO

Albero di vigore medio-elevato e a portamento espanso-globoso. Autoincompatibile. Fioritura precoce e di media entità. Frutti di medio-grossa pezzatura con buccia di colore rosso intenso, polpa di colore aranciato, di consistenza medio-elevata, di buona qualità gustativa, sapore medio e succulenza medio-scarso. Maturazione tardiva. Non soggetta a spaccature.

FERROVIA

Albero vigoroso con portamento tendenzialmente assurgente. Autoincompatibile. Fioritura medio-tardiva. Frutti di grossa pezzatura con buccia di colore rosso intenso

vinoso e polpa consistente di colore rosa. Maturazione tardiva. Produttività media. Mediamente suscettibile al cracking, ma resistente alle manipolazioni.

KORDIA

Cultivar a maturazione medio-tardiva con pianta ad elevato o medio-elevato vigore, portamento espanso ben ramificato, autosterile e medio-elevata produttività. Il frutto si presenta di medio-grosse dimensioni con forma cuoriforme, colore di fondo rosso scuro intenso. La polpa è di buone qualità gustative, colore rosso, consistenza e succulenza medio-elevate. Mediamente suscettibile al cracking, e alle manipolazioni.

LAPINS

Albero di vigoria intermedia a portamento assurgente, con fruttificazione semi-spur. Autofertile. Fioritura precoce, di intensità elevata. Frutti di buona pezzatura con buccia di colore rosso scuro brillante a piena maturazione e polpa consistente e di colore rosa. Maturazione tardiva. Produttività elevata. Tenuta di maturazione ottima e mediamente suscettibile al cracking.

REGINA

Albero di vigore e portamento intermedio, autosterile e con media produttività e maturazione tardiva. Il frutto è di elevate dimensioni con forma cuoriforme, colore rosso intenso. La polpa è di ottime qualità gustative e consistenza elevata. Varietà poco suscettibile alla spaccature.

SANDRA TARDIVA

Albero di vigore medio e a portamento assurgente-espanso. Autoincompatibile. Fioritura intermedia e di entità medio-scarso. Frutti di media pezzatura con buccia di colore rosso, polpa di colore aranciato, di consistenza medio-scarso, di discreta qualità gustativa, sapore medio e succulenza media. Maturazione intermedia. Molto soggetta a spaccature.

1.3 LA METABOLOMICA E LO STUDIO DEL METABOLOMA

1.3.1 La metabolomica

La *metabolomica* è descritta come la scienza volta ad analizzare i composti a basso peso molecolare prodotti dal metabolismo cellulare. Tali molecole possono essere i prodotti intermedi o finali delle trasformazioni chimiche e sono dette metaboliti, mentre il loro *pool* globale in un tessuto o in un organismo è definito *metaboloma*, da cui il termine metabolomica.

Determinare il metaboloma di un organismo, quale può essere ad esempio una drupa di ciliegia, è come produrre un'istantanea dei processi biochimici che avvengono al suo interno attraverso l'identificazione e la quantificazione delle molecole che si originano da tali reazioni.

Il vantaggio dello studio del metaboloma è dato dal costo relativamente basso delle analisi e dalla rapidità con cui si ottengono i risultati, sotto forma di grandi moli di dati interpretabili attraverso l'analisi statistica; la sua versatilità ne ha inoltre permesso l'applicazione in molteplici campi quali la farmacologia, la fisiologia umana, la nutrizione e la biologia vegetale.

La metabolomica si scinde in due differenti approcci: la metabolomica *untargeted* o "non mirata", che rappresenta uno studio di tutti i metaboliti rilevabili in un campione, includendo quelli sconosciuti, permettendo di ottenere un *fingerprint* con lo scopo di comparare i diversi campioni; la metabolomica *targeted* o "mirata", si focalizza invece sull'analisi di gruppi ben definiti o singoli metaboliti con lo scopo di quantificarli. La caratterizzazione del metaboloma di un campione nella sua interezza è un obiettivo ambizioso poiché l'estrema variabilità chimica e strutturale dei metaboliti richiede l'utilizzo di strategie e tecniche di analisi complementari tra loro al fine di ottenere quante più informazioni sul maggior numero possibile di metaboliti. Essenzialmente le fasi principali consistono nell'estrazione dei metaboliti dai tessuti del campione, la loro separazione attraverso adeguate tecniche cromatografiche, la loro rilevazione attraverso metodi spettroscopici (risonanza magnetica nucleare, spettrometria di massa, spettroscopia UV-visibile) e l'interpretazione mediante analisi statistica multivariata dei dati ottenuti.

1.3.2 I metaboliti secondari: i polifenoli

In ciascun organismo vegetale, si possono distinguere due differenti gruppi di metaboliti:

- primari, derivati dai processi e dalle reazioni necessarie alla sopravvivenza della cellula (metabolismo primario). A questo gruppo appartengono carboidrati, lipidi, proteine ed acidi nucleici;
- secondari, che derivano dal metabolismo primario e sono sintetizzati *ad hoc* per applicare particolari strategie di risposta alla pressione ambientale. Tali metaboliti sono largamente prodotti dagli organismi vegetali in quanto permettono loro l'interazione chimica con l'esterno a scopi principalmente riproduttivi o di difesa.

Nella determinazione quali-quantitativa del metaboloma di ciliegia presteremo maggiore attenzione allo studio di alcune classi di metaboliti facenti parte dell'ampia classe dei polifenoli.

Nel mondo vegetale i polifenoli sono composti ubiquitari e fondamentali nella fisiologia della pianta, contribuendo alla resistenza nei confronti di microrganismi e insetti, alla pigmentazione e alle caratteristiche organolettiche.

È noto infatti che frutta e vegetali necessitano di una molteplicità di composti per preservare la loro integrità dovuta alla continua esposizione a tensioni ambientali, compresi i raggi UV e le alte temperature.

Questi fattori stimolano la sintesi di composti protettivi come le antocianine; proprio per la particolare combinazione di calore e luce ne sono ad esempio particolarmente ricchi vegetali e frutta tipici dell'area mediterranea.

Il termine polifenoli include parecchie classi di composti con una struttura chimica comune: sono derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello (Scalbert et al 2000). Pertanto, a seconda del numero di anelli fenolici che essi contengono e degli elementi strutturali che legano questi anelli tra loro, i polifenoli possono essere distinti in:

- molecole con **un solo** anello benzenico ed un gruppo funzionale terminale carbossilico (**acidi fenolici**) o ossidrilico (**alcoli fenolici**)
- molecole con **due** anelli benzenici e struttura lineare (**stilbeni**) o ramificata (**lignani**)
- molecole con **più** anelli benzenici (**flavonoidi**)

Una struttura chimica di questo tipo consente, a tali composti, di funzionare attivamente da: *scavenger* per stabilizzare i radicali liberi, agenti riducenti, chelanti di metalli pro-ossidanti e *quencher* della formazione di ossigeno singoletto (Rice-Evans et al., 1996).

Inoltre i polifenoli costituiscono i principi attivi di molte piante medicinali anche se i meccanismi d'azione responsabili della loro attività farmacologica non sono ancora completamente conosciuti.

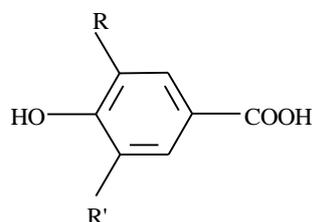
È risaputo comunque che all'attività polifenolica è correlata la qualità, l'accettabilità e la stabilità dell'alimento, in particolare nel caso della frutta, poiché questi agiscono come aromatizzanti, coloranti e antiossidanti.

In questa sede ci soffermeremo alla trattazione di due delle principali categorie polifenoliche: i polifenoli non flavonoidi (o acidi fenolici) e i polifenoli flavonoidi.

1.3.2.1 Acidi fenolici

Le molecole appartenenti a questo gruppo sono caratterizzate dalla presenza di un anello benzenico legato a un gruppo carbossilico direttamente oppure mediante una catena alifatica. L'anello benzenico presenta delle funzioni ossidriliche -OH che, in alcune molecole, possono essere sostituite dal gruppo metossilico -OCH₃. Essi vengono distinti in due gruppi:

- Acidi benzoici: sono acidi fenolici che presentano come unità base il gruppo fenil carbossilico C₆-C₁, possono essere mono-di-trisostituiti con gruppi -OH e -OCH₃ (Fig.7).



R=R'=H; Ac. *p*-idrossibenzoico
R=OH, R'=H; Ac. protocatechico
R=OCH₃, R'=H; Ac. vanillico
R=R'=OH; Ac. gallico
R=R'=OCH₃; Ac. siringico

Figura 7. Acidi benzoici (Ribéreau-Gayon et al., 2007)

- Acidi idrossicinnamici: la struttura base è quella del fenil propano C₆-C₃, possono essere mono-di-trisostituiti con -OH o -OCH₃ (Fig.8).

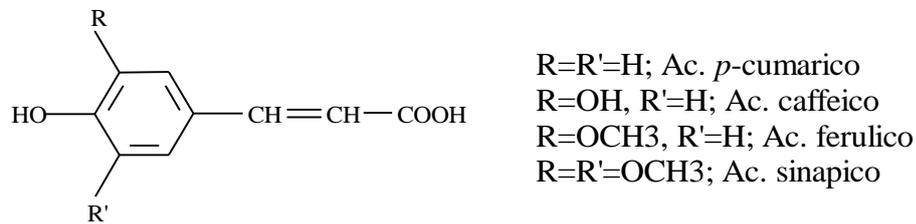


Figura 8. Acidi cinnamici (Ribéreau-Gayon et al., 2007)

Gli *acidi idrossibenzoici*, come l'*acido gallico* e l'*acido protocatechico*, si trovano in pochissimi vegetali commestibili per l'uomo, perciò sono di modesto interesse nutrizionale. Il loro contenuto è generalmente molto basso, fatta eccezione per le more (che ne contengono fino a 270 mg/kg di peso (Shahidi et al., 1995)), le foglie di tè (che rappresentano una fonte importante di acido gallico: ≤4,5 g/kg), i lamponi (che contengono fino a 100 mg di acido protocatechico/kg)(Tomas-Barberan, 2000) e l'olio di oliva (la cui concentrazione di acido protocatechico è di circa 0,22 mg/kg) (Shahidi et al., 1995; Macheix et al., 1990; Cabrini et al., 2001) . Tuttavia, va considerato che le concentrazioni di acido protocatechico in circolo potrebbero essere superiori alla quantità ingerita con gli alimenti, perché questo composto nell'uomo rappresenta il metabolita più importante delle antocianine, come la cianidina-3-glucoside.

Gli *acidi idrossicinnamici* comprendono soprattutto l'*acido cumarico*, *ferulico* e *caffeico*. Raramente gli acidi idrossicinnamici sono presenti in forma libera ma sono esterificati con zuccheri e acidi organici ad esempio sono legati a derivati glicosidici o ad esteri dell'acido chinico, schimico o tartarico.

Nella maggior parte dei frutti gli acidi idrossicinnamici sono legati all'acido chinico.

L'acido caffeico, infatti, si combina con l'acido chinico per formare l'*acido clorogenico*, che si trova in molti tipi di frutta, come la ciliegia, e in alte concentrazioni nel caffè (una tazza può contenerne fino a 350 mg)(Vitaglione et al., 2007).

L'*acido caffeico* essendo l'acido fenolico più abbondante, rappresenta tra il 75% e il 100% degli acidi idrossicinnamici totali contenuti nella maggior parte dei frutti: i kiwi contengono fino a 1 g di acido caffeico/kg del peso.

L'acido *p*-cumarico e il caffeico si possono anche ritrovare in forma legata con gli antociani.

L'*acido ferulico* è l'acido fenolico più abbondante nei cereali: nei chicchi di grano è presente per lo 0,8-2 g/kg del peso secco, pari a circa il 90% dei polifenoli totali (Sosulski et al., 1982; Lempereur et al., 1997).

1.3.2.2 Flavonoidi

I flavonoidi sono largamente distribuiti nel regno vegetale e vengono normalmente assunti tramite cereali, frutta, verdura, legumi nonché con le più comuni bevande quali tè, vino e birra.

Costituiscono una categoria di sostanze polifunzionali ad elevata bioattività, che comprende più di 5000 composti. Possiedono proprietà biochimiche di interesse funzionale nel campo nutrizionale e terapeutico.

È stato dimostrato che i flavonoidi hanno un ruolo importante nella cardioprotezione, dal momento che molti studi riportano che diete ricche in flavonoidi riducono il rischio di malattie cardiovascolari.

Inoltre si è visto come frutti ricchi di flavonoidi, svolgono un ruolo predominante nella neuroprotezione, in quanto contrastano il declino della funzione cognitiva legata all'invecchiamento e nella chemioprotezione, aumentando l'attività degli enzimi detossificanti della fase II.

Negli ultimi anni inoltre sono state attribuite ai flavonoidi diverse funzioni quali cattura dei radicali dell'ossigeno, azione anticancro, antipertensiva, antibatterica, antibiotica e antiallergica.

La biosintesi dei vari flavonoidi, oltre che dalla genetica della pianta e dal suo ciclo biologico, è regolata da numerosi fattori esterni come la luce, la temperatura, la composizione del terreno, i danni meccanici, l'attacco di parassiti, ecc.

Sono sintetizzati dall'enzima Calcone Sintetasi, a partire da tre molecole di Malonil-CoA e una molecola di 4-Cumaroil-CoA. Il *calcone*, oltre a rappresentare una classe di flavonoidi, è il primo polifenolo sintetizzato, da cui derivano tutti gli altri.

Sono molecole organiche caratterizzate da una struttura C₆-C₃-C₆ nella quale i due anelli aromatici C₆ sono uniti da una catena alifatica C₃ ossigenata, il cui grado di ossidazione differenzia le varie sottofamiglie.

Appartengono alla classe dei flavonoidi :

- Antocianine
- Flavonoli
- Flavan-3-oli e procianidine

Antocianine

Nel regno vegetale le antocianine sono responsabili della colorazione di fiori, frutti e, in alcune specie vegetali, anche delle foglie. In particolare possono intervenire nella colorazione delle foglie di piante quando queste che si trovano in condizione di stress fisiologico che vede coinvolto il sistema di trasporto degli zuccheri.

Nei vegetali, le antocianine, sono localizzate a livello vacuolare ed è proprio l'acidità di tale compartimento cellulare che, unitamente alle caratteristiche strutturali, ne determina il colore.

La maggior parte dei colori rosso, blu e viola di frutta, verdura, fiori e altri tessuti o prodotti vegetali è proprio dovuta alla presenza di antocianine e all'elevata solubilità in acqua che queste possiedono.

Esse si presentano principalmente come glicosidi, in cui il residuo di zucchero è principalmente legato alla posizione 3 dell'anello C o alle posizioni 5 e 7 dell'anello A. Sebbene molto rara, la glicosilazione è stata osservata anche in posizione 3', 4' e 5' dell'anello B. Il residuo di zucchero può essere anche acilato da diversi acidi aromatici o alifatici: il più comune è l'*acido cinnamico*.

Le antocianine sono costituite da una struttura di base (l'aglicone) denominata antocianidina. Esistono sei diversi tipi di antocianidine (Fig.9) e, nella cellula vegetale, si trovano coniugate ad uno o, più raramente, due residui.

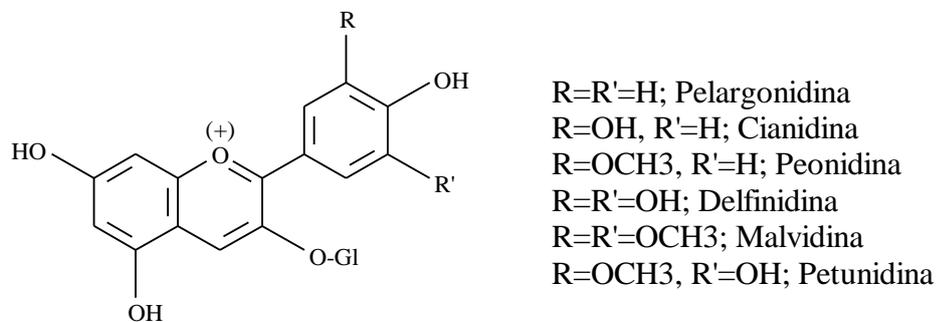


Figura 9. Antocianine (Ribéreau-Gayon et al., 2007)

Gli antociani possono inoltre originare molecole più complesse fra le quali le più importanti sono le antocianine acilate, nelle quali uno dei residui ossidrilici dello zucchero è esterificato con un acido organico (*p*-cumarico, caffeico, acetico).

Le *antocianine* sono ampiamente distribuite nell'alimentazione umana: sono presenti nel vino rosso (fino a 350 mg/L), in alcune varietà di cereali e in alcune verdure (cavoli, fagioli, cipolle, ravanelli), ma abbondano soprattutto nella frutta laddove il contenuto è generalmente proporzionale all'intensità del colore ed al grado di maturazione; nel ribes nero e nelle more raggiunge valori fino a 2-4 g/kg.

Tuttavia le *antocianine* sono presenti soprattutto nella buccia della frutta di colore rosso in quantità variabile, ad eccezione di alcuni frutti rossi (ciliegie e fragole) in cui sono presenti anche nella polpa (Amrani Joutei, 1993). Proprio in ciliegia, gli antociani più abbondanti sono la cianidina e la peonidina.

Flavonoli

I flavonoli presentano un doppio legame tra le posizioni C2-C3 e un ossidrilico in C3 e rappresentano la categoria dei flavonoidi più abbondante negli alimenti, di cui la *quercetina* risulta il composto più rappresentativo. (Fig.10)

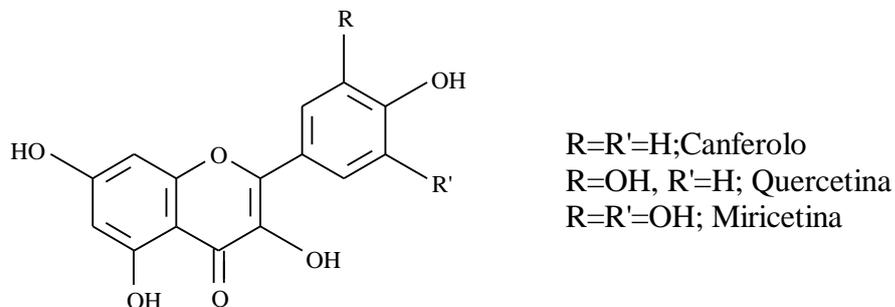


Figura 100. Flavonoli (Ribéreau-Gayon et al., 2007)

Le principali fonti di *flavonoli* sono le cipolle (fino a 1,2 g/kg di peso fresco), il cavolo riccio, i porri, i broccoli ed i mirtilli. Il tè ed il vino rosso possono contenere fino a 45 e 30 mg di *flavonoli*/L, rispettivamente.

La maggior parte dei *flavonoli* sono incolori o lievemente colorati in giallo, tuttavia, alcuni loro derivati hanno una gamma di colori che va dal giallo al marrone scuro. Come tutti i composti fenolici il loro accumulo è influenzato dalle condizioni ambientali durante il

periodo di maturazione, in particolare l'esposizione alla luce solare gioca un ruolo determinante sull'accumulo della quercetina; questo potrebbe spiegare il contenuto variabile nei frutti di questa sostanza.

A tal riguardo la biosintesi dei *flavonoli* è stimolata dalla luce; infatti, essi si accumulano nel tessuto esterno della frutta,. Si possono infatti verificare differenze di concentrazione di *flavonoli* tra frutti dello stesso albero e anche nelle diverse parti dello stesso frutto, a seconda dell'esposizione alla luce del sole.

Flavan-3-oli e procianidine

I *Flavan-3-oli e procianidine* sono caratterizzati nell'anello C da tre atomi di carbonio saturi, un gruppo ossidrilico in C3 e assenza dell'ossigeno in C4. Esistono in forma di monomeri (*catechine*) e di polimeri (*proantocianidine*).

A differenza di altre classi di flavonoidi, questi non sono glicosilati negli alimenti, ma spesso si ritrovano in forma acilata. Le *catechine* vengono classificate in *catechina*, *epicatechina*, *gallo catechina*, *epigallo catechina* e l'*epigallo catechin-gallato*. La *catechina* ed *epicatechina* si trovano in molti frutti come le albicocche (250 mg/kg del peso) e le ciliegie (250 mg/kg del peso) e nel vino rosso (fino a 300 mg/L). La *gallo catechina*, *epigallo catechina* e *epigallo catechin-gallato* abbondano nel tè verde (fino a 800 mg/L) e nel cioccolato (fino a 600 mg/L) (D'Archivio et al., 2007).

I *flavan-3-oli* sono presenti in natura essenzialmente sotto forma di agliconi (Fig.11), anche se recentemente si è rilevata la loro presenza in matrici vegetali in forma glicosilata e in ciliegia, le procianidine che si originano dai flavan-3-oli per reazioni di polimerizzazione sono abbondanti e diversificate.

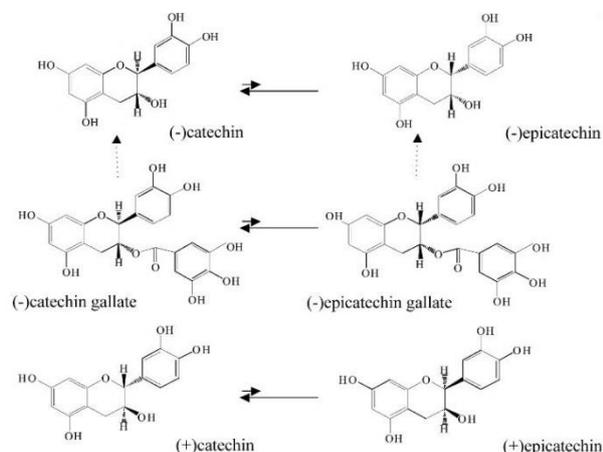


Figura 11. Flavan-3-oli in equilibrio con le rispettive forme isomeriche (meristemi.wordpress.com)

1.3.3 Tecniche adottate per l'indagine metabolomica

Le fasi caratterizzanti un esperimento di metabolomica *untargeted* sono la separazione dei metaboliti del campione e la loro rilevazione.

La separazione delle molecole contenute in una soluzione si effettua con metodi cromatografici, basati sull'interazione chimica tra due fasi, l'una in movimento rispetto all'altra stazionaria. La fase in movimento, solitamente costituita da un fluido che trasporta il campione con le molecole da separare, è detta fase mobile e attraversa il mezzo di separazione (fase stazionaria); in base all'affinità chimica tra le molecole del campione e la fase stazionaria, queste impiegano tempi diversi (tempo di ritenzione) per eluire. Mediante un rilevatore posto a valle del dispositivo di separazione (colonna) può essere effettuata la registrazione di un cromatogramma.

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata l'HPLC (*high-performance liquid chromatography*, Fig.12) con un tipo di colonna chiamata *reverse phase*, ovvero un tipo di cromatografia liquida in cui si è sfruttato il principio della fase inversa dove molecole di tipo apolare interagiscono fortemente con i gruppi C18 (octadecili) che compongono la fase stazionaria.

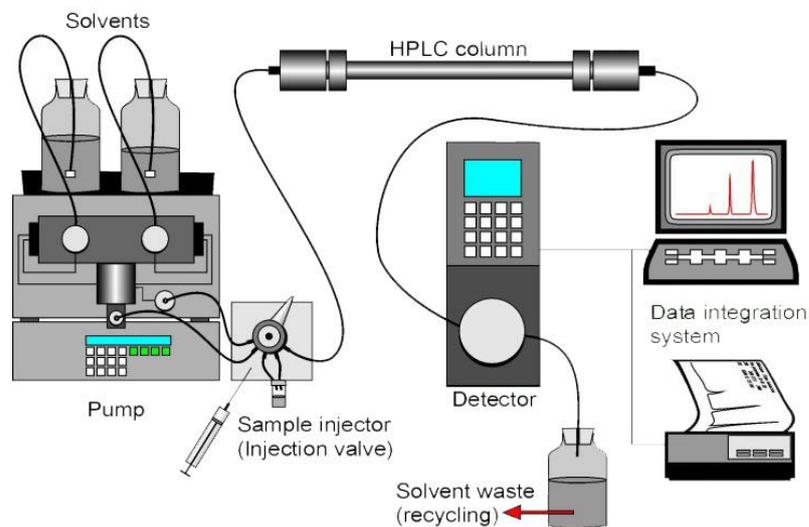


Figura 12. Schema di apparecchiatura HPLC con iniezione manuale del campione (uni.bremen.de)

L'HPLC consiste in un sistema di pompe che applica elevate pressioni al fine di mantenere un flusso costante all'interno della colonna cromatografica e permettere l'eluizione delle molecole del campione. Il tempo di ritenzione (RT) è caratteristica peculiare di un analita e fornisce un importante dato per l'identificazione della molecola.

Nella cromatografia a fase inversa, viene utilizzata come fase mobile una miscela di due solventi a polarità differente, le cui concentrazioni vengono modificate secondo un gradiente nel tempo. Con la diminuzione della polarità della fase mobile, è possibile l'eluizione dapprima delle molecole più polari, per poi giungere alle meno polari. I vantaggi di questa tecnologia sono i tempi relativamente brevi dell'analisi, l'impiego di volumi molto ridotti di campione e la grande efficienza nella separazione.

Terminata la fase di separazione, avviene la rilevazione degli analiti mediante un apposito strumento collegato in serie all'HPLC; tra gli strumenti più utilizzati in metabolomica vi sono lo spettrometro di massa (MS) e il *Diode array detector* (DAD).

La spettrometria di massa è una tecnica molto sensibile che permette di misurare la massa/carica di una molecola e quindi risalire al suo peso molecolare (McMurry, 2004). Accoppiata alla separazione con HPLC, lo spettrometro di massa è in grado di rilevare un numero elevato di metaboliti in una sola analisi. Inizialmente, le molecole vengono ionizzate da una sorgente di tipo elettrospray ESI (*Electrospray Ionization*; Fig.13): essa nebulizza le molecole sospese nel solvente in un flusso di gas inerte (N_2) e vi applica una forte differenza di potenziale per conferire loro una carica; successivamente, attraverso l'elevata temperatura presente all'interno della sorgente, si ha l'evaporazione delle goccioline di solvente contenenti l'analita. La riduzione della dimensione delle particelle, determina un aumento della densità di cariche presenti, causando il fenomeno detto "esplosione di Coulomb" dovuto alla repulsione di cariche elettriche dello stesso segno. Si induce, così, la formazione di una corrente di singoli ioni (analita caricato positivamente o negativamente, privo di residui di solvente) che vengono indirizzati verso un analizzatore.

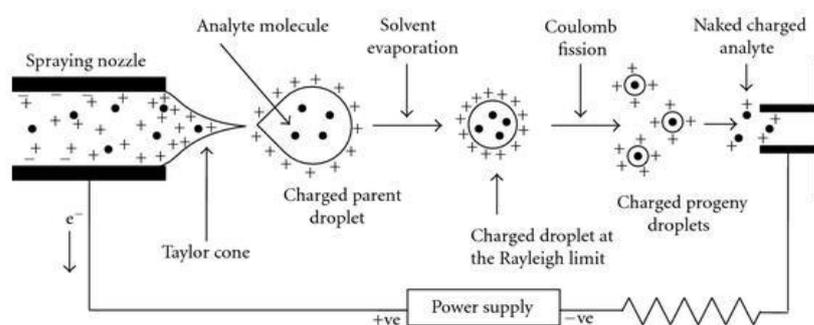


Figura 13. Sorgente di ionizzazione ESI (www.hindawi.com)

Solitamente gli ioni che si formano presentano una singola carica: questa può essere positiva ($[M+H]^+$) o negativa ($[M-H]^-$) a seconda della modalità di ionizzazione definita dall'operatore. La struttura di una molecola è anche responsabile del fatto che questa si ionizzerà meglio in modalità positiva, negativa o in entrambe le modalità. L'analizzatore utilizzato in questo lavoro è di tipo a "trappola ionica" (Fig.14) ed opera mediante elettrodi, a cui viene applicata una tensione continua ed una alternata permettendo di trattenere o rilasciare verso un detector gli ioni desiderati che affluiscono nella trappola. La trappola ionica permette inoltre di far collidere tra loro gli ioni, generando ioni figli o frammenti che formano un profilo di frammentazione caratteristico ed identificativo della struttura di ogni molecola.

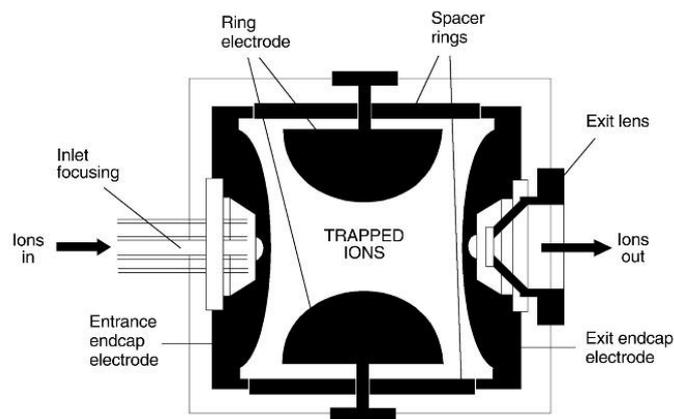


Figura 14. Trappola ionica quadrupolare (www.jaaos.com)

La frammentazione degli ioni può essere ripetuta molte volte e prende il nome di "tandem mass spectrometry", indicato come MS^n , dove con $n > 2$ si individuano le frammentazioni successive alla prima. Il detector trasforma i segnali ionici in segnali elettrici e li invia ad un computer. Gli ioni in uscita dall'analizzatore sono suddivisi in base al loro rapporto massa/carica (m/z), dove la carica acquisita durante la fase di ionizzazione è solitamente pari a uno; pertanto il valore m/z rilevato corrisponde alla massa della molecola analizzata più o meno la massa dell'atomo di idrogeno che stabilizza lo ione molecolare. L'output dello spettrometro di massa è così raffigurato in un cromatogramma, con in ascissa il tempo di ritenzione e in ordinata l'intensità del segnale dello ione rilevato. Tali dati, rafforzati dal profilo di frammentazione, permettono l'identificazione univoca di una molecola (Dettmer et al., 2007). Mentre la spettrometria di massa si presta molto bene per analisi di tipo qualitativo, una tecnica idonea per la

quantificazione dei metaboliti è l'HPLC-DAD (*Diode Array Detector*), ovvero la cromatografia liquida accoppiata ad un rivelatore basato sulla misura dell'assorbanza nell'intervallo di lunghezze d'onda dell'UV-visibile (190 - 600 nm; Fig.15). L'assorbanza indica la capacità di una sostanza di assorbire una radiazione luminosa; tale grandezza è in relazione lineare con la concentrazione della sostanza secondo la legge di Lambert-Beer (Silberberg, 2004) e selezionando una particolare lunghezza d'onda in cui una molecola presenta il suo massimo di assorbimento, la si può quantificare. Nel dettaglio, una radiazione policromatica, emessa dalla sorgente UV-visibile, viene fatta parzialmente assorbire in una cella contenente il campione, venendo poi dispersa su una serie di fotodiodi (*diode array*) che convertono il segnale ottico in elettrico, trasmettendolo al computer.

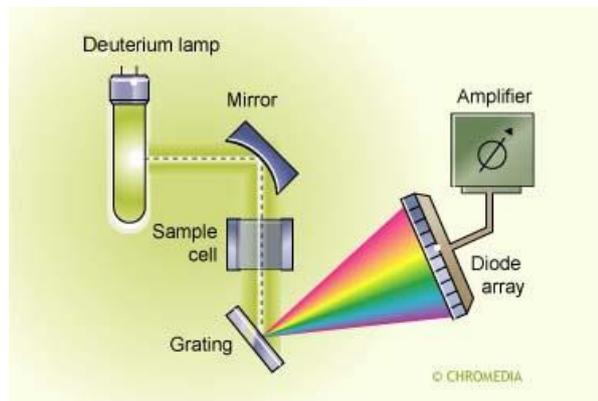


Figura 15. Schema di rivelatore DAD (www.chromedia.org)

L'output dell'analisi è un cromatogramma bidimensionale, recante in ascissa il tempo di ritenzione ed in ordinata il *range* di lunghezze d'onda considerato e rappresenta una mappa cromatografica dell'assorbanza del campione. Selezionando specifiche lunghezze d'onda (ad esempio quella alla quale una determinata molecola ha il suo massimo di assorbimento) il computer restituisce un profilo con il tempo di ritenzione in ascissa e l'intensità di assorbimento rilevata in ordinata. In questo modo l'eluizione della molecola è rappresentata mediante un picco e, calcolandone per integrazione l'area, è possibile determinare la quantità della molecola ricorrendo al metodo delle curve di calibrazione. Le tecniche di HPLC-ESI-MS e HPLC-DAD forniscono in questo modo dati tra loro complementari, in grado di creare un profilo metabolico estremamente solido e facilmente riproducibile, richiedendo al tempo stesso minime quantità di materiale (De la Torre-Carbot et al., 2005).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Questo lavoro è stato svolto presso il Laboratorio di Biodiversità e conservazione del germoplasma vegetale del Dipartimento STEBICEF dell'Università di Palermo ma l'attività sperimentale è stata svolta prevalentemente presso il Laboratorio di Biologia Vegetale e Metabolomica del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona.

L'oggetto di studio è stata la caratterizzazione quali-quantitativa dei metaboliti secondari contenuti nei frutti di alcune varietà, autoctone e selezionate, di ciliegia.

La ciliegia risulta essere una buona fonte di antociani e flavonoidi e, poiché appaiono ancora scarse e insufficienti le notizie in nostro possesso sui differenti profili metabolomici, peculiari di ciascuna delle numerose varietà coltivate, si è ritenuto utile lo studio dei metabolomi di 20 differenti cultivar di ciliegia, coltivate in due diverse aree geografiche: Sicilia e Veneto.

Attuando la comparazione dei metabolomi dei frutti di diverse cultivar di ciliegia si vuole caratterizzare le diverse varietà alla luce della diversa composizione metabolomica, espressione del genotipo che le caratterizza.

Tale attività si propone l'obiettivo di approfondire le conoscenze relative al contenuto in metaboliti secondari dell'alimento "ciliegia" principalmente riferito al contenuto in polifenoli dato l'alto contenuto di flavonoidi, antociani e acidi idrossicinnamici evidenziato nei precedenti studi (Ballistreri et al., 2013) e di fornire un ulteriore strumento per la valorizzazione di genotipi, non solo per le loro caratteristiche agronomiche e organolettiche, ma anche per le potenziali caratteristiche nutrizionali benefiche riferite al contenuto in metaboliti.

In questo esperimento di metabolomica *untargeted* è stata utilizzata la tecnica HPLC accoppiata a spettrometro di massa che ha fornito dati di tipo qualitativo, consentendo quindi una comparazione relativa dei campioni; si è scelto poi di validare tali dati con un'analisi di tipo quantitativo utilizzando l'HPLC accoppiata a rivelatore *diode array*.

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha permesso di identificare quelle molecole che sono caratteristiche di una particolare varietà o di un gruppo.

Si è ottenuto così un quadro solido e completo, che fornisce chiaramente le peculiarità del profilo metabolico di ciascuna varietà oggetto di studio. Inoltre, i risultati ottenuti potranno offrire successivamente ulteriori spunti utili allo studio degli effetti che queste sostanze possono sortire sull'organismo umano.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale, campionamento e l'analisi della qualità della frutta

Durante le annate 2014-2015 sono state campionati frutti di ciliegia appartenenti a 20 differenti varietà (*Bella Italia, Black Star, Cappuccia, Durona del Chiampo, Durone precoce Romana, Durone Rosso, Early Bigi® Bigi Sol*, Ferrovia, Francese, Giorgia, Grace Star, Kordia, Lapins, Milanese, Regina, Roana, Sandra, Sandra Tardiva, Sweet Early® Panaro 1* e Van*) due delle quali (*Early Bigi® Bigi Sol* e Ferrovia*) sono state prelevate sia in aziende site in Sicilia che in Veneto. Il reperimento dei campioni per le analisi è riepilogato nella seguente tabella (Fig.16) nella quale sono riportate le varietà campionate, l'epoca di prelevamento ed i produttori coinvolti.

Cultivar	Produttori	Raccolta 2014	Raccolta 2015
Bella Italia	H, J	29 maggio - 10 giugno	8 giugno - 18 giugno
Black Star	B, L	28 maggio - 6 giugno	5 giugno -16 giugno
Cappuccia Siciliana	N	26 giugno	30 giugno
Durona del Chiampo	C	11 giugno	17 giugno
Durone rosso	A, F, H, I	4 giugno - 17 giugno	16 giugno -22 giugno
Early Bigi® Bigi Sol*	E, I, K	14 maggio - 19 maggio	22 maggio - 27 maggio
Early Bigi® Bigi Sol* Siciliana	M	6 giugno	8 giugno
Ferrovia	A, F, L	5 giugno – 17 giugno	4 giugno – 22 giugno
Ferrovia Siciliana	N	26 giugno	30 giugno
Francese	E, H, J, L	13 maggio - 22 maggio	19 maggio - 25 maggio
Giorgia	I, K	28 maggio - 29 maggio	5 giugno - 8 giugno
Grace Star	E, I, L	28 maggio - 3 giugno	3 giugno - 4 giugno
Kordia	E, I	4 giugno - 13 giugno	17 giugno - 19 giugno
Lapins	I	4 giugno	17 giugno
Milanese	E	30 maggio	3 giugno
Regina	A, B, E	6 giugno - 13 giugno	16 giugno - 19 giugno
Roana	G	23 maggio	25 maggio
Romana	D, E, F, G, H	22 maggio- 6 giugno	3 giugno - 9 giugno
Sandra	G, I, J, K	13 maggio - 19 maggio	20 maggio - 27 maggio
Sandra tardiva	H	10 giugno	18 giugno
Sweet Early® Panaro 1*Siciliana	M	6 giugno	8 giugno
Van	D, I	3 giugno - 4 giugno	9 giugno - 17 giugno

Figura 16. Calendario di campionamento con varietà e produttori coinvolti

Le aziende che hanno fornito il materiale da campionare sono state 15: 13 di queste si trovano in provincia di Vicenza, nel comprensorio di produzione della ciliegia IGP di

Marostica, mentre altre 2 si trovano in provincia di Palermo nei territori di Altofonte e Chiusa Sclafani.

Il prelevamento del materiale vegetale è stato effettuato in azienda (Fig.17), in corrispondenza della maturazione di consumo.



Figura 17. Raccolta manuale dei campioni di *Prunus avium L.*

Dopo un'attenta ispezione del frutteto, sono stati raccolti 50 frutti per pianta da un massimo di 20 piante diverse (quando possibile), mantenendo i frutti distinti, in maniera tale da costituire diversi pool rappresentativi di 20 piante.

Gli alberi da campionare sono stati individuati tenendo conto dell'età e della diversa posizione che avevano all'interno ceraseto.

Le ciliegie completamente mature ed integre sono state prelevate dalle diverse parti di ogni pianta, raccolte in diversi sacchetti di carta etichettati, ognuno rappresentante l'albero campionato.

Terminata la raccolta, i campioni sono stati immediatamente trasportati in laboratorio per procedere alle successive fasi di campionamento.

In laboratorio, da ogni sacchetto, rappresentante il singolo albero, sono stati prelevati un numero uguale di frutti per costituire pool di campionamento pari a 50 frutti.

La procedura è stata ripetuta tre volte al fine di ottenere tre pool di 50 frutti ciascuno, costituenti le repliche biologiche da utilizzare per l'analisi metabolomica.

Si precisa che per quelle cultivar che sono state conferite da diversi produttori della stessa area geografica, sono stati costituiti dei pool di 50 frutti, dove ciascun cerasicoltore è rappresentato in ugual parte.

I campioni destinati all'analisi metabolomica, sono stati rapidamente denocciolati con uno Stoner manuale (Westmark Cherry stoner) sezionati in quattro porzioni uguali (Fig.18);

due di queste sono state immerse in azoto liquido in due becker distinti, al fine di costituire i due replicati tecnici dello stesso replicato biologico.



Figura 18. Sezionamento di una ciliegia

Terminato il sezionamento delle ciliegie, i campioni congelati sono stati trasferiti, dentro sacchetti di plastica, resistenti alle basse temperature, nel congelatore a -80°C .

La procedura è stata ripetuta per i tre replicati biologici.

Quindi, per ciascun campione sono stati preparati 3 pools di circa 100-200 g ciascuno, riproducenti i tre replicati biologici, ciascuno dei quali ha fornito un duplice replicato tecnico. Soltanto un replicato tecnico è stato analizzato, l'altro è stato utilizzato come *backup*.

Tutto il materiale è stato conservato in freezer a -80°C , per minimizzare i possibili processi degradativi.

Per ciascuna varietà campionata, inoltre, è stato costituito un quarto pool di 30 ciliegie (Fig.19) destinato alla determinazione del pH e del grado zuccherino.



Figura 19. Pool utilizzato per la determinazione del pH e del °Brix

In questo caso, i campioni sono stati pestellati in un mortaio a gruppi di 6 frutti. Il succo ottenuto è stato usato per la determinazione del pH con un pHmetro standard "MicropH 2001, Crison" e il grado zuccherino espresso in °Brix con un rifrattometro digitale "DBR35/45/Salt New".

3.2 Preparazione delle polveri

Terminata la stagione di raccolta dei campioni, si è proceduto alla preparazione delle polveri a partire dal materiale in precedenza congelato.

Ogni replica tecnica, contenente le 50 porzioni di ciliegia, è stata polverizzata in azoto liquido attraverso un mulino "IKA mill model A1"; le polveri, così ottenute, rappresentanti le repliche biologiche dei campionamenti sono state raccolte dentro delle falcon da 50 ml, etichettate e conservate a -80 ° C.

3.3 Preparazione estratti metanolici per analisi HPLC-DAD e HPLC-MS

Per ciascun replicato biologico, è stata analizzata una sola replica tecnica.

Preliminarmente, sono state fatte delle prove di estrazione con 3, 10 e 15 volumi di metanolo freddo acidificato con 1% (v / v) di HCl (37%).

Poiché non è stata rilevata alcuna differenza significativa riferita all'utilizzo dei tre diversi volumi di estrazione, si è adottato come quantitativo un volume di estrazione pari a 3 volte il peso della polvere pesata.

Per l'estrazione sono stati utilizzati circa 300 mg di polvere congelata ottenuta da ciascuna delle tre repliche biologiche. Le polveri sono state diluite con tre volumi di metanolo acidificato (MeOH:HCl; 99:1) e successivamente, agitate vigorosamente con miscelatore di tipo "Vortex" per un minuto e sonicate a 40 kHz in un bagno ad ultrasuoni in ghiaccio (Falc Instruments, Bergamo, Italia) per 15 minuti e poi centrifugate due volte per 10 minuti a velocità massima a 4 ° C; il volume del surnatante è stato prelevato, misurato e conservato in provette di vetro a -20 ° C.

Gli estratti metanolici erano stati preliminarmente diluiti 1: 2, 1: 3, 1: 5 e 1:10 con acqua di grado LC-MS, filtrata con Minisart RC 4 filtri (pori di 0,2 µm, Sartorius) e poi analizzati mediante HPLC-MS e HPLC-DAD. Poiché non è stata osservata nessuna differenza significativa nella qualità dell'analisi utilizzando i diversi rapporti di diluizione, abbiamo

effettuato LC-MS e analisi LC-DAD adottando le seguenti diluizioni 1: 3 e 1: 2, rispettivamente.

3.4 Analisi HPLC-DAD

L'analisi quantitativa dei polifenoli è stata condotta attraverso l'utilizzo di due strumenti, un *Beckman Coulter System Gold 126* accoppiato a un *Gold 168 Diode Array Detector* (*Beckman Coulter, Fullerton, CA*) collegati ad un autocampionatore refrigerato.

Per l'analisi sono stati necessari due solventi:

- solvente A composto per il 94.5 % (v/v) da H₂O "LC-MS-grade", per il 5% (v/v) da acetonitrile "LC-MS-grade" e per lo 0.5 % (v/v) da acido formico;
- solvente B composto per il 100 % da acetonitrile.

L'eluizione secondo gradiente è stata effettuata mediante l'azione di questi due solventi come segue: fra 0 e 10% B in 2 minuti, dal 10 al 20% B in 10 min, dal 20 al 25% B in 2 min, da 25 a 70% B in 7 min, eluizione isocratica al 70% B per 5 minuti, dal 70% al 90% B in 1 min, eluizione isocratica al 90% B per 4 min, da 90% B a 0% B in 1 min.

La colonna è stata equilibrata per 18 minuti a 100% A. L'analisi cromatografica è stata acquisita per 45 minuti.

La separazione dei metaboliti è stata effettuata con una precolonna C18 (7 x 2,1 mm) e una colonna "Alltima HP C18" analitica (150 x 2,1 mm, particelle 3 micron) (Alltech Associates Inc, Deerfield, IL). Da ogni campione sono stati prelevati per l'iniezione in colonna 30 µL tramite un autocampionatore refrigerato.

Il metodo analitico per la separazione delle molecole prevede un'eluizione secondo gradiente, ottenuta aumentando la percentuale di solvente B (meno polare) nel tempo. Le molecole sono diversamente tratteneute o eluite dalla fase stazionaria della colonna cromatografica al variare della polarità della fase mobile fluente al suo interno (principio della fase inversa). In questo caso, all'aumentare del solvente B decresce la polarità della fase mobile favorendo così l'eluizione delle molecole più polari all'inizio dell'analisi cromatografica, mentre le molecole meno polari eluiranno verso la fine dell'analisi).

In uscita dalla colonna cromatografica è presente lo strumento Beckman Coulter Gold 168 Diode Array Detector (DAD) in grado di misurare l'assorbanza dei metaboliti nel range di lunghezze d'onda di 190-600 nm (UV-vis). Tale strumento utilizza per l'emissione di radiazione nel visibile una lampada al tungsteno e nell'ultravioletto una lampada al

deuterio. Il Software 32 Karat versione 7.0 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) ha registrato e raccolto i dati cromatografici.

Le curve di calibrazione, con diluizioni seriali di acido 3-O-caffeoil chinico (acido clorogenico), acido p-cumarico, cianidina 3-O-glucoside e gli standard autentici quercetina (Sigma), sono state utilizzate per la quantificazione dei metaboliti.

Sono state scelte le seguenti lunghezze d'onda per la quantificazione: 320 nm per l'acido 3-O-caffeoil chinico e per l'acido p-cumarico ; 350 nm per le quercetine; 520 nm per la cianidina 3-O-glucoside.

L'acido 3-O caffeoil chinico (acido clorogenico) e l'acido 5-O-caffeoil chinico (acido neoclorogenico) sono stati quantificati come equivalenti di acido 3-O-caffeoil chinico (acido clorogenico), l'acido cumaroil chinico come equivalenti di acido p-cumarico, le quercetine come quercetina equivalente, gli antociani come equivalenti cianidina-3-O-glucoside.

3.5 Analisi HPLC-ESI-MS *untargeted*

L'analisi HPLC-ESI-MS *untargeted* è stata eseguita mediante l'utilizzo di un Beckman Coulter System Gold 127 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) dotato di un autocampionatore refrigerato, con lo stesso metodo colonna e eluizione cromatografica sopra descritto per l'analisi HPLC-DAD. Il sistema HPLC è stato associato in serie ad uno spettrometro di massa con un Esquire 6000 ESI-MS Bruker a trappola ionica (Bruker Daltonics).

Durante l'analisi cromatografica, la prestazione dello strumento è stata monitorata utilizzando due tipi di controllo di qualità QC1 e QC2.

Il QC1 è stato ottenuto dalla miscela di sei standard commerciali autentici (acido alfa-resorcilico 0,1 mg/mL, acido 3-O-caffeoil chinico 0,02 mg/mL, daidzeina 0,1 mg/mL, kaempferolo-3-O-rutinoside 0,070 mg /mL, resveratrolo 0,020 mg / mL e sakuranetin 0,01 mg/mL disciolti in metanolo e diluiti 1: 2 con acqua di grado LC-MS, QC 1).

Il QC2 invece è stato ottenuto da una miscela comprendente uguali quantità di polvere congelata proveniente da tutte le cultivar di ciliegio campionate. È stato applicato un protocollo di estrazione identico a quello già descritto per l'analisi dei polifenoli e diluito 1:3 (v/v) con acqua di grado LC-MS (QC2).

I campioni sono stati analizzati in gruppi di undici, compresi un QC1 e un QC2 posti all'inizio dell'analisi gruppo, seguito da un ciclo di lavaggio della macchina. La sequenza di analisi del campione è stata completamente randomizzata.

I volumi di iniezione sono stati di 20 µL per QC1 e di 30 µL di QC2. Le analisi sono state eseguite in modo alternato, impostando un intervallo di scansione di 50-1500 Da e una massa bersaglio di 400 m/z.

I dati MS sono stati registrati dal software di controllo Esquire 5.2 e quindi il trattamento con il 3,2 software di analisi dati (Bruker Daltonics GmbH, Brema, Germania).

Ulteriori analisi sono state eseguite in modalità di massa tandem (MS/MS e MS³) al fine di agevolare l'annotazione del metabolita. L'ampiezza della frammentazione è stata impostata a 1 V. L'azoto è stato usato come nebulizzante e gas di essiccazione. I parametri di sorgente di ioni sono stati: 50 psi a 350 ° C per nebulizzazione gas e 10 L / min per l'essiccazione del gas. La CID è stata eseguita con elio come gas di collisione.

3.6 Elaborazione ed interpretazione dei dati

3.6.1 Identificazione delle molecole rilevate nei campioni

Al fine di identificare una molecola mediante HPLC-ESI-MS è necessario conoscere tre parametri fondamentali:

- *tempo di ritenzione*, dipendente dal metodo cromatografico adottato e dalla polarità della molecola stessa e della fase mobile;
- *m/z* della molecola, dipendente dal suo peso molecolare e dalla carica acquisita durante la ionizzazione nella sorgente;
- *pattern di frammentazione*, specifico della molecola dipendente dalle condizioni di frammentazione impostate e dalla tipologia di spettrometro utilizzata.

Questi tre parametri sono ortogonali e consentono l'identificazione di un metabolita attraverso la comparazione con una libreria di riferimento contenente una serie di molecole note (standard autentici) analizzate con lo stesso metodo.

In assenza di un riscontro diretto con i composti riportati in libreria si è proceduto ad identificare putativamente la molecola attraverso database pubblici di metabolomica, quale, ad esempio, MassBank (www.massbank.jp) oppure consultando articoli pubblicati su riviste di settore riportanti una dettagliata descrizione del *pattern* di frammentazione. Ovviamente in questo caso l'identificazione è considerata putativa, poiché possono

variare sia le metodiche sia le condizioni della strumentazione analitica, che influenzano significativamente il tempo di ritenzione e il profilo di frammentazione di una molecola. Perdite neutrali di 132, 146 e 162 Da, sono state considerate come perdita di pentosi, esosi desossiesosi e zuccheri, rispettivamente. I frammenti di m/z 179 (MS/MS)→135 (MS3), 163→119, 191→173, 193→134, 149, 178 sono stati usati per annotare acido caffeico, cumarico, chinico e derivato dell'acido ferulico.

3.6.2 Elaborazione dei cromatogrammi HPLC-ESI-MS mediante MZmine

I file dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi HPLC-ESI-MS sono stati convertiti in formato ".cdf" per poter essere successivamente elaborati con il software MZmine (<http://mzmine.sourceforge.net/>) che provvederà al rilevamento automatico di m/z , alla deconvoluzione dei dati e all'allineamento dei picchi.

Mediante una serie di *tools* bioinformatici questo ha consentito di eliminare il rumore di fondo causato ad esempio da impurità nei solventi, eliminare i segnali ridondanti degli isotopi, allineare i profili cromatografici secondo il tempo di ritenzione delle molecole rilevate per poter procedere al calcolo dell'area dei relativi picchi.

Calcolata l'area ed estrapolati i corrispondenti dati, si è creata una matrice, esportabile in formato Excel, contenente le aree dei picchi delle molecole allineate nei vari campioni con i pertinenti valori di m/z e tempo di ritenzione rilevati.

La matrice dei dati ottenuti è stata utilizzata per le elaborazioni grafiche e le analisi statistiche.

3.6.3 Validazione dei dati di spettrometria di massa

Dopo aver identificato le principali molecole presenti nei campioni si è proceduto con la loro conferma analizzando lo spettro di assorbimento UV-vis rilevato con l'analisi HPLC-DAD, caratteristico di ogni molecola. Inoltre sono state misurate le aree dei picchi delle molecole identificate al fine di compararle con le aree rilevate per le stesse molecole dall'analisi HPLC-ESI-MS mediante la costruzione di una "*heat map*".

3.6.4 Analisi statistica multivariata

Al fine di interpretare le variazioni nei metabolomi delle diverse varietà di ciliegia oggetto di analisi, si è adottato un approccio di analisi statistica multivariata.

La matrice di dati ottenuta per le molecole ionizzate in modalità negativa nell'analisi HPLC-ESI-MS è stata analizzata con il software SIMCA-P di Umetrics (Sweden) attraverso i metodi statistici PCA (analisi delle componenti principali) e O2PLS-DA (*orthogonal projections to latent structures discriminant analysis*).

Queste analisi sono state utilizzate con lo scopo di semplificare la grande quantità di dati contenuti nella matrice, individuando delle variabili, definite componenti principali, in grado di discriminare i differenti campioni sulla base dei metaboliti in essi contenuti.

L'analisi O2PLS-DA ha consentito in particolare di stabilire il grado di correlazione tra una classe di campioni e le molecole in modo da comprendere quali siano i metaboliti che più la caratterizzano. L'intero set di dati è stato centrato e scalato in Pareto. La validazione dei modelli è stata effettuata con un test ANOVA ($p < 0.05$) per il modello O2PLS-DA e con un *permutation test* (200 permutazioni) per il corrispondente modello di PLS-DA.

4. RISULTATI

4.1 Analisi dei dati qualitativi riferiti a contenuto zuccherino e pH

Per ciascuna varietà sono stati determinati, con la metodologia precedentemente illustrata, il contenuto in zuccheri e il pH.

Di seguito si riporta la tabella (Fig.20) riepilogante tutti i valori medi determinati.

Cultivar	Produttori	SSC (°Brix) 2014	SSC (°Brix) 2015	pH 2014	pH 2015
Bella Italia	H, J	16,91 ± 2,49	19,45 ± 1,53	3,61 ± 0,06	3,41 ± 0,00
Black Star	B, L	15,97 ± 0,30	14,83 ± 0,25	3,98 ± 0,01	3,80 ± 0,06
Cappuccia Siciliana	N	18,83 ± 0,75	18,10 ± 0,35	4,10 ± 0,02	3,93 ± 0,03
Durona del Chiampo	C	19,73 ± 0,53	17,45 ± 0,80	3,62 ± 0,08	3,42 ± 0,03
Durone rosso	A, F, H, I	16,24 ± 1,31	17,84 ± 2,00	3,66 ± 0,07	3,50 ± 0,08
Early Bigi	E, I, K	12,70 ± 2,20	11,90 ± 1,01	3,79 ± 0,09	3,77 ± 0,16
Early Bigi Siciliana	M	14,23 ± 0,31	13,83 ± 0,31	4,11 ± 0,03	4,11 ± 0,02
Ferrovia	A, F, L	17,78 ± 1,68	16,76 ± 1,07	3,69 ± 0,07	3,54 ± 0,11
Ferrovia Siciliana	N	18,07 ± 0,56	16,30 ± 0,10	3,90 ± 0,02	3,84 ± 0,02
Francese	E, H, J, L	13,22 ± 2,10	14,65 ± 1,09	3,80 ± 0,13	3,56 ± 0,12
Giorgia	I, K	15,93 ± 1,17	15,28 ± 3,60	3,65 ± 0,06	3,62 ± 0,03
Grace Star	E, I, L	15,80 ± 2,28	15,18 ± 1,17	3,54 ± 0,10	3,45 ± 0,13
Kordia	E, I	18,85 ± 0,82	16,12 ± 0,60	3,63 ± 0,19	3,63 ± 0,18
Lapins	I	15,73 ± 0,06	15,37 ± 0,42	3,71 ± 0,01	3,70 ± 0,01
Milanese	E	15,82 ± 1,02	15,95 ± 0,55	3,53 ± 0,05	3,51 ± 0,04
Regina	A, B, E	20,05 ± 0,54	16,73 ± 1,71	3,72 ± 0,06	3,63 ± 0,04
Roana	G	14,45 ± 0,53	13,87 ± 0,73	3,52 ± 0,05	3,52 ± 0,03
Romana	D, E, F, G, H	16,70 ± 0,99	16,78 ± 2,05	3,42 ± 0,12	3,45 ± 0,12
Sandra	G, I, J, K	13,12 ± 1,09	12,40 ± 0,78	3,89 ± 0,14	3,77 ± 0,15
Sandra tardiva	H	18,02 ± 0,65	19,6 ± 0,73	3,60 ± 0,03	3,40 ± 0,02
Sweet Early Siciliana	M	15,77 ± 0,32	13,77 ± 0,35	4,20 ± 0,03	4,04 ± 0,03
Van	D, I	17,2 ± 3,96	18,25 ± 0,91	3,74 ± 0,21	3,65 ± 0,11

Figura 20. Contenuto zuccherino (°Brix) e pH. I valori sono espressi come media delle due annate ± deviazione standard

In prima analisi, i risultati riferiti a parametri qualitativi, come il contenuto in zuccheri e il pH, confermano una differenziazione tra le varietà.

Il contenuto zuccherino ha risentito del fattore annata, infatti, i valori determinati nell'annata 2014 sono mediamente maggiori di quelli individuati durante l'annata 2015, ad eccezione di varietà come Bella Italia, Durone Rosso, Francese, Milanese e Sandra Tardiva, dove si è registrata un'inversione di tendenza (Fig. 21).

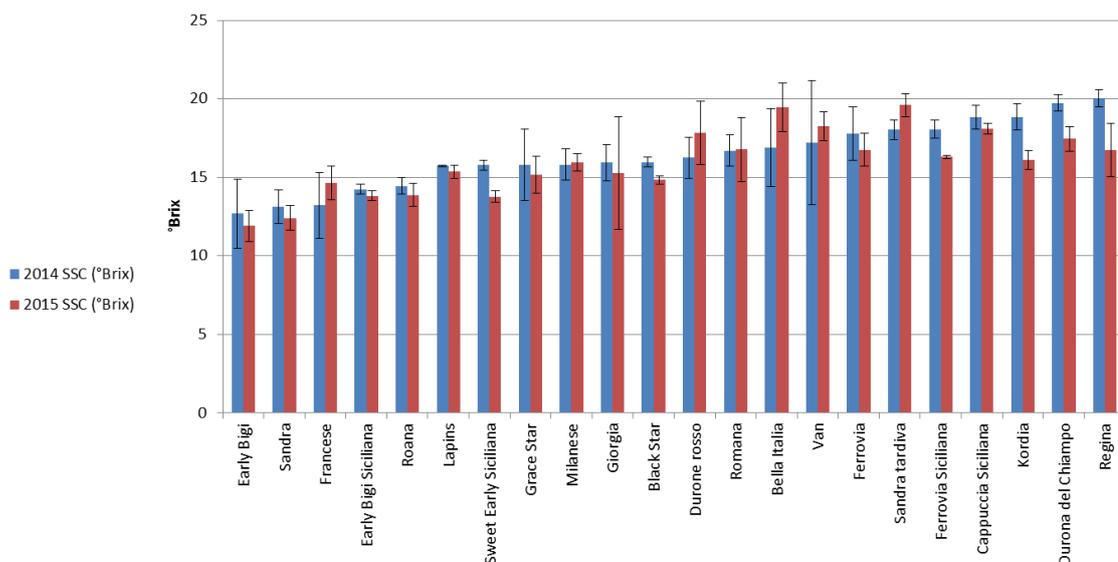


Figura 21. Contenuto zuccherino espresso in °Brix riferiti alle due annate. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard

Le varietà tardive hanno registrato valori più alti rispetto alle varietà precoci che invece sono contraddistinte da un contenuto zuccherino minore e da una più elevata acidità. Anche quest'ultima ha risentito dell'effetto annata, in quanto sono stati evidenziati valori superiori nell'annata 2014 e minori nell'annata 2015 (Fig.22).

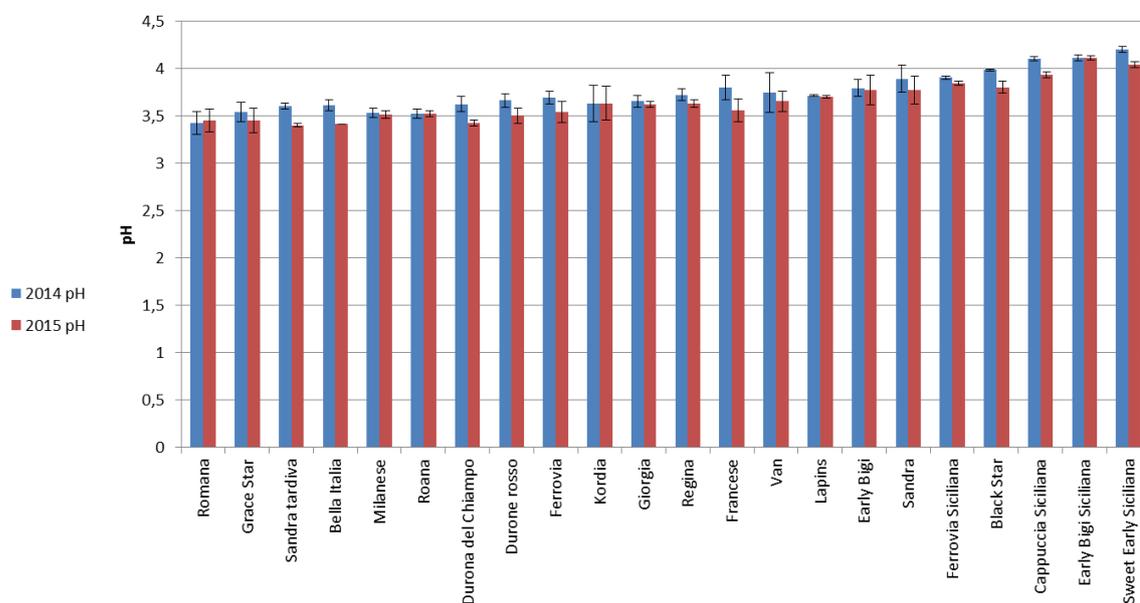


Figura 22. Valori di pH riferiti alle due annate. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard

Facendo una valutazione del contenuto medio in zuccheri delle diverse varietà possiamo affermare che questo incrementa lungo il calendario di maturazione, con valori minimi nelle varietà precoci e massimi nelle varietà tardive (Fig.23).

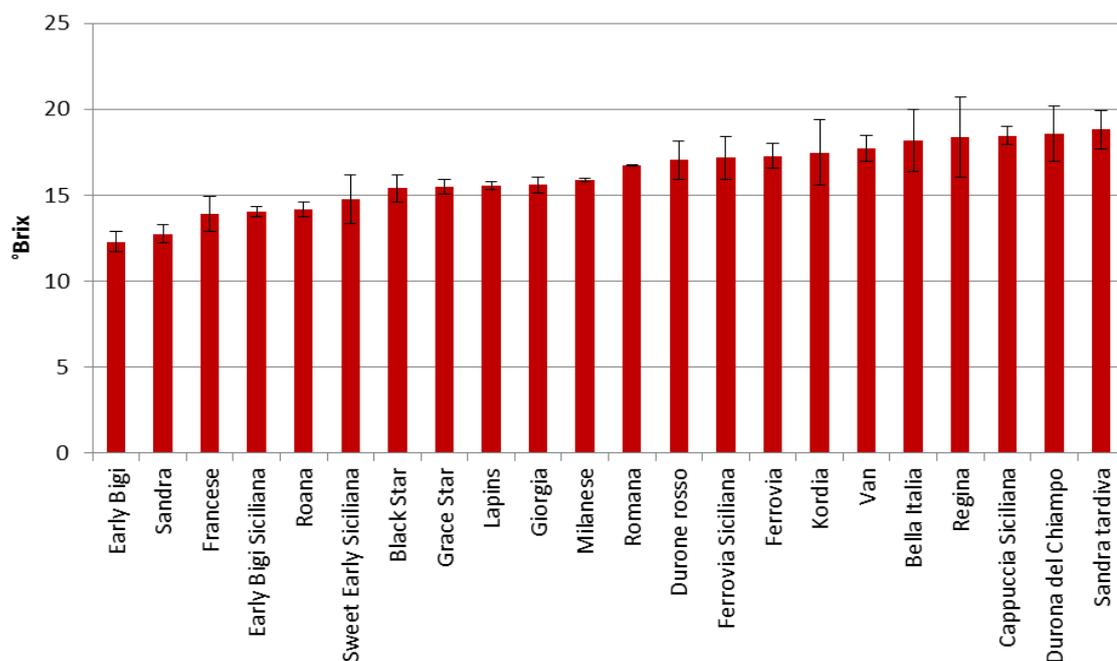


Figura 23. Contenuto zuccherino espresso in °Brix riferito alla media delle due annate. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard

Per quanto riguarda il pH, seppur con lievissime differenze, valori medi minori si registrano nel Durone precoce Romana, mentre le varietà coltivate in Sicilia presentano una minore acidità (Fig.24).

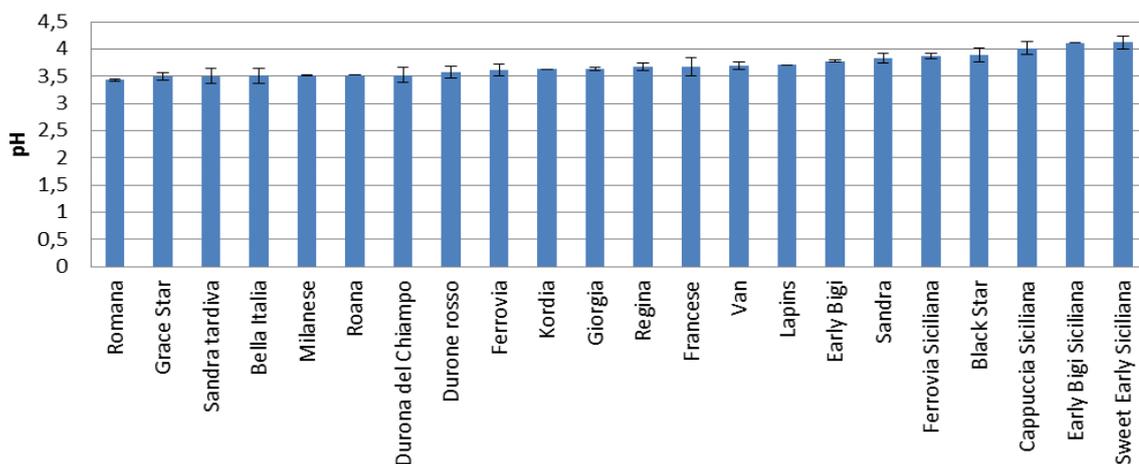


Figura 24. Valori medi di pH riferiti alla media delle due annate. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard

4.2 Profilo dei campioni

La fase iniziale di questo lavoro ha previsto l'identificazione dei metaboliti contenuti nelle drupe di ciliegia, in modo da avere una panoramica generale del profilo metabolico dei campioni per consentirne la successiva comparazione.

Gli estratti metanolici, ottenuti con le modalità descritte, sono stati analizzati mediante HPLC-ESI-MS.

Questa pratica rappresenta attualmente, nel campo della metabolomica, una tecnica ad alta risoluzione ed estremamente sensibile, datta quindi a rilevare elevati quantitativi di molecole in un campione (Villas-Boas *et al.*, 2005).

L'*output* di questa analisi si presenta sotto forma di un "*base peak chromatogram*", ovvero un cromatogramma.

Per ciascuna cultivar, le tre repliche biologiche hanno mostrato profili cromatografici sostanzialmente sovrapposti, indicandoci così che 50 frutti sono stati sufficienti a ottenere un'analisi affidabile e rappresentativa. Inoltre, i profili di ogni cultivar erano molto simili nelle due annate, mentre i profili delle diverse cultivar erano diversi e distinguibili; esempi relativi alle tre cultivar Early Bigi, Francese e Sandra tardiva sono riportati nella figura seguente (Fig.25).

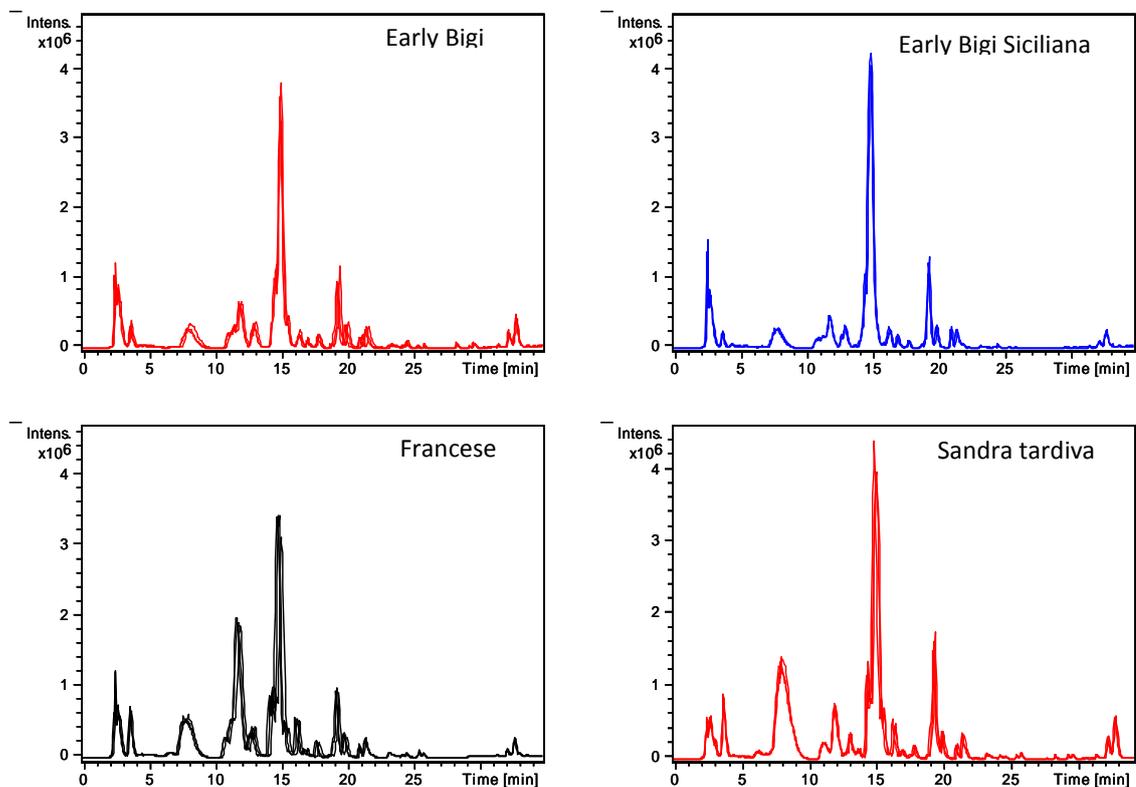


Figura 25. Cromatogrammi HPLC-ESI-MS rappresentativi (Early Bigi, Early Bigi Siciliana, Francese e Sandra Tardiva)

Le repliche biologiche dell'Early Bigi provenienti dal ceraseto situato in provincia di Palermo hanno fornito dei cromatogrammi molto simili a quelli dei campioni veneti della stessa varietà, confermando che l'impronta genetica ha giocato un ruolo preponderante rispetto all'ambiente di coltivazione nell'espressione metabolica.

I cromatogrammi riportano in ascissa il tempo di ritenzione, cioè il tempo di eluizione delle molecole dalla colonna cromatografica, ed in ordinata l'intensità del segnale rilevato. Le molecole eluiscono in tempi diversi a seconda della loro polarità. Il tempo di ritenzione, il rapporto massa/carica (m/z), e il profilo di frammentazione rilevati per ogni molecola permettono di creare una sorta di impronta digitale della stessa; confrontando tali informazioni con quelle riportate in letteratura scientifica e nei database *online* quale Massbank, si è potuto compiere un'identificazione putativa di molte delle molecole rilevate. Su un totale di 203 segnali rilevati, sono state attribuite 67 identificazioni putative (Fig.26).

ID	RT	m/z (-)	IDENTIFICAZIONE PUTATIVA	CLASSE
1	3,80	370,93	acido caffeoil chinico derivato	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
2	3,94	335,06	acido idrossibenzoico esoso addotto cloro	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
3	6,26	515,02	acido caffeoil chinico esoso 1	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
4	6,77	353,08	acido caffeoil chinico 1	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
5	7,18	514,97	acido caffeoil chinico esoso 2	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
6	7,76	514,91	acido caffeoil chinico esoso 3	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
7	7,80	353,02	acido caffeoil chinico 2	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
8	7,93	706,82	acido caffeoil chinico addotto	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
9	10,94	577,00	procianidina P2-	procianidine e flavan-3-oli
10	10,97	487,02	acido idrossibenzoico derivato addotto cloro	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
11	11,77	674,84	acido cumaroil chinico 1 addotto	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
12	11,79	337,02	acido cumaroil chinico 1	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
13	11,88	476,98	triidrossiflavone-O-esoside addotto formico	flavonoidi
14	11,89	467,02	triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	flavonoidi
15	11,89	469,94	triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	flavonoidi
16	11,90	467,94	diidrossiflavanone-O-esoside addotto cloro	flavonoidi
17	11,90	468,94	triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	flavonoidi
18	12,50	340,99	acido caffeico esoso	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
19	12,69	289,09	catechina	procianidine e flavan-3-oli
20	12,70	325,05	catechina addotto cloro	procianidine e flavan-3-oli
21	12,70	325,05	procianidina P2-	procianidine e flavan-3-oli
22	12,70	327,02	catechina addotto cloro	procianidine e flavan-3-oli
23	12,91	707,87	acido caffeoil chinico 2 addotto	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
24	12,92	706,99	acido caffeoil chinico addotto	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
25	12,93	352,98	acido caffeoil chinico 3	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
26	13,06	865,01	procianidina P3-	procianidine e flavan-3-oli
27	14,03	439,00	triidrossiflavone-O-pentoside addotto cloro	flavonoidi
28	14,05	437,15	triidrossiflavone-O-pentoside addotto cloro	flavonoidi

29	14,25	577,01	procianidina P2-	procianidine e flavan-3-oli
30	14,29	367,08	acido feruloil chinico	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
31	14,39	337,10	acido cumaroil chinico 2	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
32	14,46	484,91	cianidina 3-O-glucoside addotto cloro	antocianine
33	14,46	483,93	cianidina 3-O-glucoside addotto cloro	antocianine
34	14,47	464,99	cianidina 3-O-glucoside addotto idrato	antocianine
35	14,48	482,96	cianidina 3-O-glucoside addotto cloro	antocianine
36	14,48	447,04	cianidina O-glucoside	antocianine
37	14,83	649,92	cianidina O-rutinoside idrato addotto cloro	antocianine
38	14,83	611,01	cianidina O-rutinoside addotto idrato	antocianine
39	14,84	595,98	cianidina-O-rutinoside, isotopo	antocianine
40	14,84	593,11	cianidina-O-rutinoside	antocianine
41	14,84	648,91	cianidina O-rutinoside idrato addotto cloro	antocianine
42	14,84	646,94	cianidina O-rutinoside idrato addotto cloro	antocianine
43	14,86	647,93	cianidina O-rutinoside idrato addotto cloro	antocianine
44	14,95	352,96	acido caffeoil chinico 4	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
45	15,35	288,99	epicatechina	procianidine e flavan-3-oli
46	15,36	324,97	epicatechina addotto cloro	procianidine e flavan-3-oli
47	15,37	326,94	epicatechina addotto cloro	procianidine e flavan-3-oli
48	15,48	676,91	acido cumaroil chinico 1 addotto	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
49	15,64	336,99	acido cumaroil chinico 3	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
50	15,79	577,98	pelargonidina-O-rutinoside	antocianine
51	16,19	865,05	procianidina P3-	procianidine e flavan-3-oli
52	16,27	625,06	peonidina-rutinoside addotto idrato	antocianine
53	16,28	607,09	peonidina rutinoside	antocianine
54	16,77	1153,06	procianidina P4-	procianidine e flavan-3-oli
55	16,80	576,95	procianidina P2-	procianidine e flavan-3-oli
56	16,86	771,09	quercetina-O-rutinoside-O-esoside	flavonoidi
57	17,01	403,02	acido siringico derivato esoso	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
58	17,68	367,05	acido caffeoil chinico metil derivato	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
59	19,16	609,11	quercetina-O-rutinoside	flavonoidi
60	19,76	463,01	quercetina-3-O-glucoside	flavonoidi
61	20,83	593,14	canferolo-O-rutinoside	flavonoidi
62	21,27	514,98	acido dicaffeoil chinico	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
63	23,05	498,99	acido cumaroil caffeoil chinico	acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici
64	24,29	453,31	triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	flavonoidi
65	24,29	463,18	diidrossiflavanone-O-esoside addotto formico	flavonoidi
66	25,51	447,10	canferolo-O-esoside	flavonoidi
67	25,52	483,08	catechina/epicatechina derivato	procianidine e flavan-3-oli

Figura 26. Elenco metaboliti identificati con corrispondente tempo di ritenzione (RT), rapporto massa/carica delle molecole ionizzate in modalità negativa (m/z (-)) e classe di riferimento

I metaboliti identificati in ciliegia con la tecnica HPLC-ESI-MS sono polifenoli rilevati appartenenti alle classi delle antocianine, acidi idrossicinnamici e idrossibenzoici, flavonoidi e procianidine e flavan-3-oli.

4.3 Analisi quantitative mediante HPLC-DAD

Le analisi quantitative dei principali metaboliti determinati attraverso HPLC-DAD sono riassunte di seguito (Fig.27).

	Bella Italia	Black Star	Cappuccia Siciliana	Durona del Chiampo	Durone rosso
acido caffeoil chinico 2 (acido neoclorogenico)	35,33 ± 2,00	20,46 ± 1,38	45,09 ± 5,62	8,56 ± 1,21	10,85 ± 0,69
acido cumaroil chinico	10,86 ± 0,94	2,56 ± 0,47	6,04 ± 0,35	9,89 ± 1,01	10,28 ± 0,47
acido caffeoil chinico 3 (acido clorogenico)	2,95 ± 0,22	1,09 ± 0,06	1,92 ± 0,52	1,34 ± 0,19	1,99 ± 0,19
cianidina-3-O-glucoside+cianidina-3-O-rutinoside	60,14 ± 4,34	29,26 ± 6,43	57,65 ± 6,60	44,64 ± 8,72	54,00 ± 3,93
peonidina-O-rutinoside	0,76 ± 0,06	1,22 ± 0,28	1,23 ± 0,32	1,76 ± 1,04	1,12 ± 0,47
quercetina-O-rutinoside	2,98 ± 0,35	2,08 ± 0,16	0,14 ± 0,07	2,85 ± 0,64	2,57 ± 0,40
quercetina-3-O-glucoside	0,53 ± 0,34	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,09	0,17 ± 0,18	0,21 ± 0,26
	Early Bigi	Early Bigi Siciliana	Ferrovia	Ferrovia Siciliana	Francese
acido caffeoil chinico 2 (acido neoclorogenico)	5,21 ± 0,90	8,59 ± 5,40	12,73 ± 2,23	34,93 ± 2,91	11,36 ± 0,86
acido cumaroil chinico	6,75 ± 2,20	10,24 ± 7,90	10,47 ± 0,41	3,71 ± 0,51	18,38 ± 0,84
acido caffeoil chinico 3 (acido clorogenico)	1,80 ± 0,20	2,11 ± 0,55	1,91 ± 0,13	2,64 ± 0,50	2,31 ± 0,25
cianidina-3-O-glucoside+cianidina-3-O-rutinoside	59,44 ± 5,31	55,67 ± 16,69	39,37 ± 4,33	29,82 ± 2,06	56,87 ± 3,04
peonidina-O-rutinoside	1,50 ± 0,11	2,68 ± 0,60	0,63 ± 0,31	1,19 ± 0,27	0,97 ± 0,14
quercetina-O-rutinoside	2,72 ± 0,34	0,45 ± 0,18	2,35 ± 0,30	0,67 ± 1,68	2,45 ± 0,25
quercetina-3-O-glucoside	0,71 ± 0,12	0,57 ± 0,23	0,03 ± 0,10	0,46 ± 0,37	1,13 ± 0,54
	Giorgia	Grace Star	Kordia	Lapins	Milanese
acido caffeoil chinico 2 (acido neoclorogenico)	11,71 ± 1,34	25,13 ± 3,68	15,50 ± 4,93	32,62 ± 2,24	13,35 ± 6,83
acido cumaroil chinico	11,98 ± 1,69	4,16 ± 0,16	13,01 ± 0,70	3,96 ± 0,14	10,24 ± 3,32
acido caffeoil chinico 3 (acido clorogenico)	1,35 ± 0,13	2,18 ± 0,24	1,59 ± 0,18	2,12 ± 0,19	1,67 ± 0,14
cianidina-3-O-glucoside+cianidina-3-O-rutinoside	42,67 ± 2,35	24,50 ± 1,68	77,44 ± 14,02	36,86 ± 2,88	17,37 ± 3,23
peonidina-O-rutinoside	1,50 ± 0,13	1,03 ± 0,07	3,39 ± 0,41	1,25 ± 0,26	0,18 ± 0,21
quercetina-O-rutinoside	2,39 ± 0,13	1,39 ± 0,12	3,54 ± 0,36	1,61 ± 0,31	1,63 ± 0,52
quercetina-3-O-glucoside	0,03 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Regina	Roana	Romana	Sandra	Sandra tardiva
acido caffeoil chinico 2 (acido neoclorogenico)	13,13 ± 1,93	10,71 ± 1,03	16,73 ± 1,03	27,94 ± 1,38	47,94 ± 5,84
acido cumaroil chinico	14,88 ± 1,73	14,08 ± 3,64	17,57 ± 1,19	11,03 ± 0,83	7,84 ± 1,79
acido caffeoil chinico 3 (acido clorogenico)	1,90 ± 0,31	1,93 ± 0,43	2,32 ± 0,28	1,49 ± 0,13	2,53 ± 0,39
cianidina-3-O-glucoside+cianidina-3-O-rutinoside	36,68 ± 2,18	86,67 ± 2,30	24,83 ± 1,34	49,56 ± 5,46	104,01 ± 9,55
peonidina-O-rutinoside	0,69 ± 0,26	1,68 ± 0,58	0,89 ± 0,11	0,78 ± 0,28	1,38 ± 0,08
quercetina-O-rutinoside	2,35 ± 0,77	4,33 ± 0,34	2,09 ± 0,23	2,49 ± 0,36	5,81 ± 0,50
quercetina-3-O-glucoside	0,00 ± 0,00	0,87 ± 0,22	0,05 ± 0,10	1,19 ± 0,86	1,09 ± 0,17
	Sweet Early Siciliana	Van			
acido caffeoil chinico 2 (acido neoclorogenico)	4,56 ± 0,42	31,31 ± 3,14			
acido cumaroil chinico	3,21 ± 0,14	3,48 ± 0,87			
acido caffeoil chinico 3 (acido clorogenico)	1,34 ± 0,88	2,05 ± 0,30			
cianidina-3-O-glucoside+cianidina-3-O-rutinoside	55,64 ± 11,31	54,29 ± 4,54			
peonidina-O-rutinoside	1,94 ± 0,65	1,96 ± 0,14			
quercetina-O-rutinoside	1,26 ± 1,94	2,79 ± 0,36			
quercetina-3-O-glucoside	0,82 ± 0,28	0,42 ± 0,31			

Figura 27. Valori medi del contenuto in metaboliti espressi in mg/100g di peso fresco +/- la deviazione standard

Si tenga presente che l'identificazione dei metaboliti è avvenuta comparando i cromatogrammi ottenuti con la tecnica HPLC-DAD e i relativi spettri di assorbanza UV/VIS (da 190 a 600 nm di lunghezza d'onda) con i cromatogrammi e gli spettri di massa ottenuti con la tecnica HPLC-MS, che consente di identificare i metaboliti in base al loro

tempo di ritenzione, rapporto massa/carica (m/z) e pattern di frammentazione (ms/ms, ms³).

I valori sono espressi in mg/100g di peso fresco, e rappresentano le medie delle repliche biologiche +/- la deviazione standard.

I metaboliti identificati in ciliegia con la tecnica HPLC-DAD sono polifenoli appartenenti alle classi delle antocianine, acidi idrossicinnamici e flavonoidi (in particolare, flavonoli), l'istogramma di seguito riportato rappresenta i diversi livelli di metaboliti distinti per varietà di ciliegia (Fig.28).

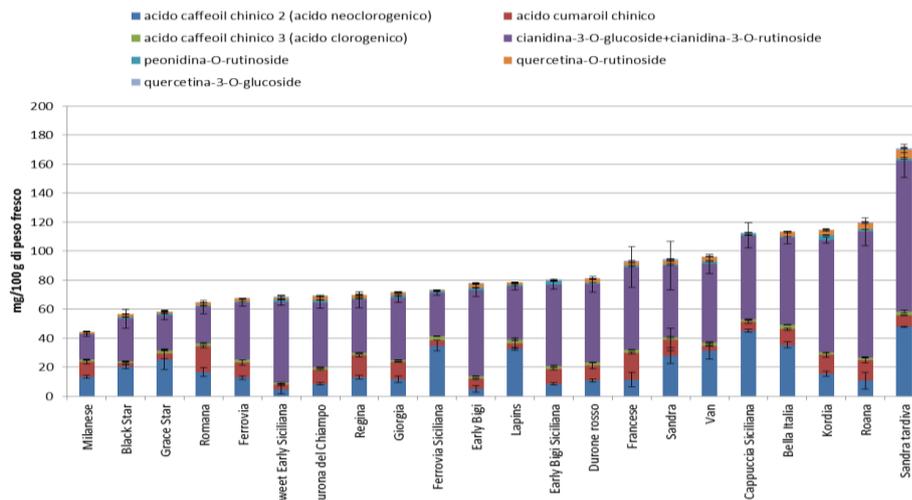


Figura 28. Livelli di accumulo medi +/- la deviazione standard per classe polifenolica e varietà di ciliegia.

Per quanto riguarda le antocianine, il loro livello medio (considerando entrambe le annate) nelle diverse varietà è riportato nel grafico ad istogrammi seguente (Fig.29).

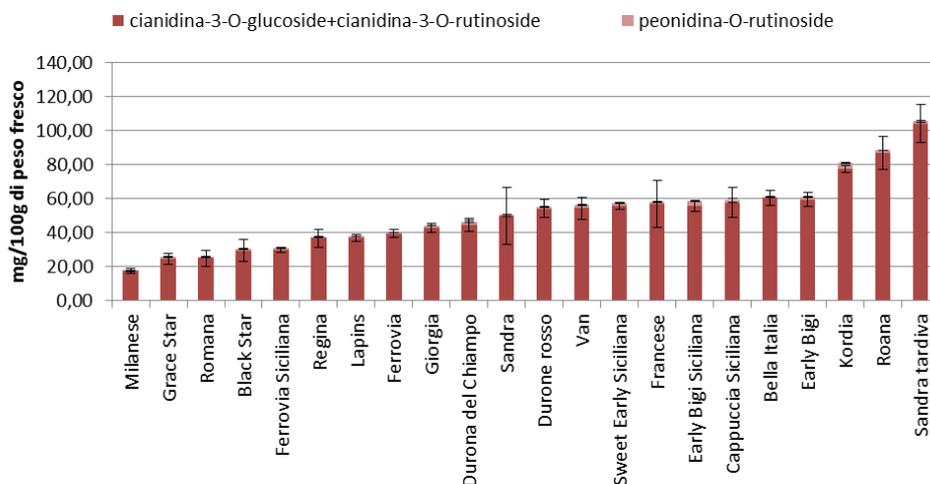


Figura 29. Livelli di accumulo di antocianine medi +/- la deviazione standard per varietà di ciliegia.

E' evidente come i livelli di antocianine siano molto differenti nelle diverse varietà, dalla varietà Milanese che accumula mediamente circa 18 mg di antociani totali, alla varietà Sandra tardiva che ne accumula addirittura 105 mg.

Nei due grafici che seguono sono riportati i valori medi di accumulo degli acidi idrossicinnamici (Fig.30) e dei flavonoidi (Fig.31).

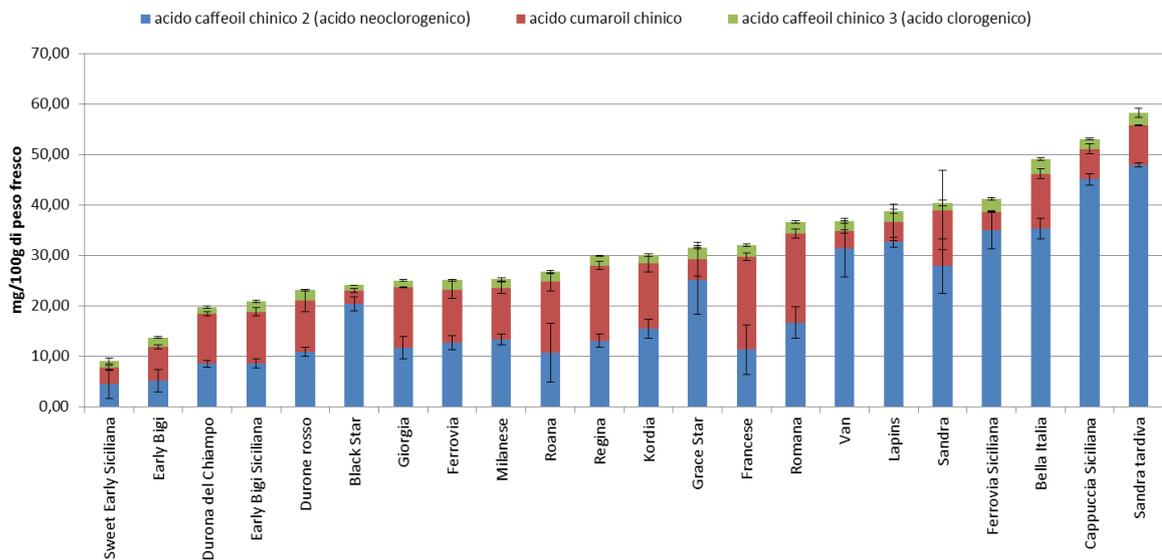


Figura 30. Livelli di accumulo di acidi idrossicinnamici medi +/- la deviazione standard per varietà di ciliegia.

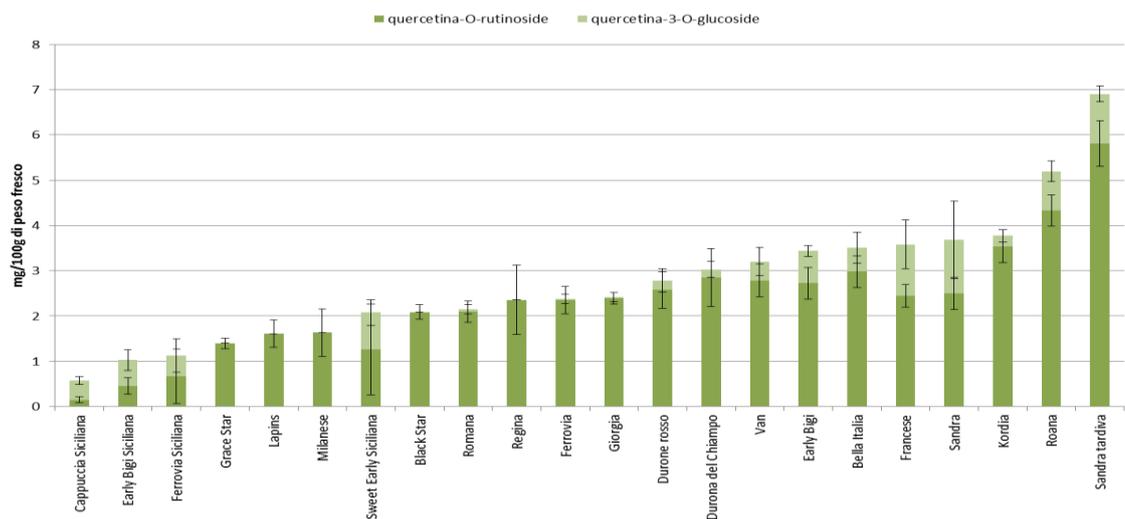


Figura 31. Livelli di accumulo di flavonoli medi +/- la deviazione standard per varietà di ciliegia.

Anche per quanto riguarda l'accumulo di acidi idrossicinnamici e di flavonoli le quantità medie variano molto nelle diverse varietà ma in entrambe primeggia Sandra Tardiva.

4.4 Comparazione dei metabolomi mediante HPLC-ESI-MS

La comparazione fra le diverse varietà è illustrato nelle figure seguenti (Figg.32 e 33). I livelli delle classi dei metaboliti per varietà di ciliegia analizzata sono rappresentate nel grafico sottostante e nella *heat map* per classi di metaboliti.

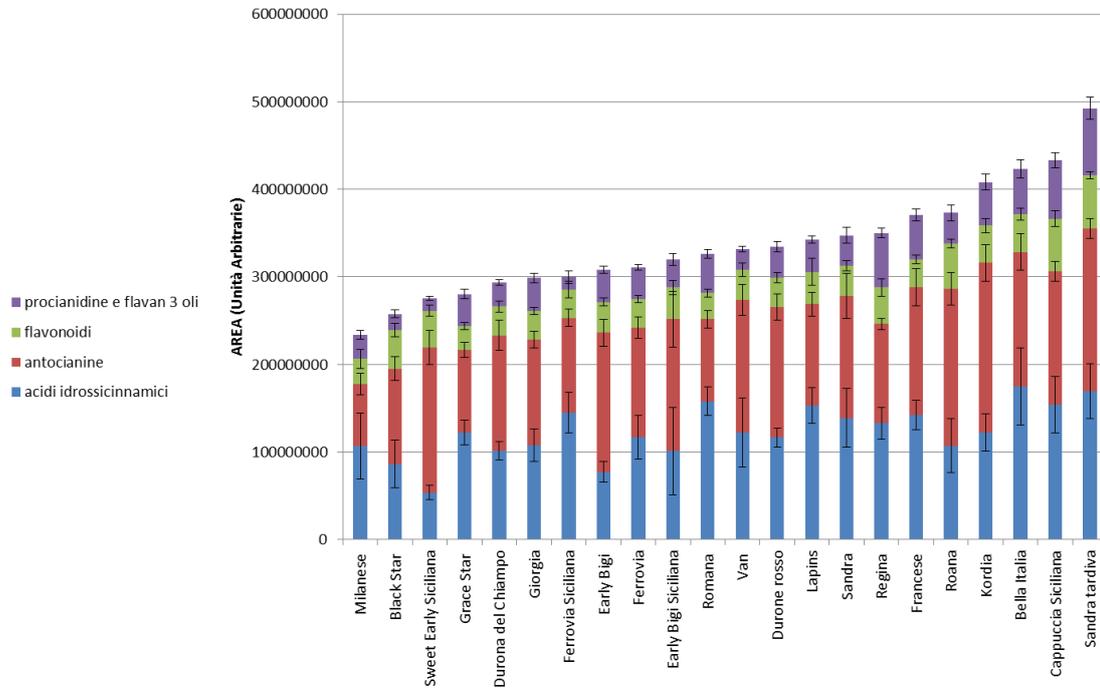


Figura 32. Livelli di accumulo medi +/- la deviazione standard per classe polifenolica e varietà di ciliegia.

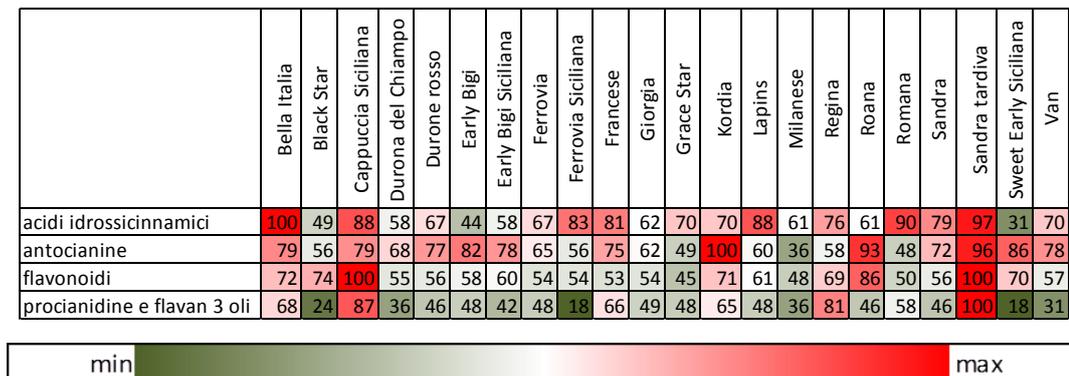


Figura 33. *Heat map* riguardante la comparazione dei livelli di accumulo delle differenti classi di polifenoli nelle diverse varietà di ciliegia ottenuti mediante HPLC-ESI-MS

I livelli dei singoli metaboliti e delle diverse classi di appartenenza in relazione alle differenti varietà campionate è mostrata nelle anche come “*heat map*” (Figg.33 e 34); e il livello di ciascun metabolita e/o classe è espresso come percentuale nelle diverse varietà i quantitativi minimi sono colorati in verde scuro, mentre quelli massimi (=100%) in rosso.

	Bella Italia	Black Star	Cappuccia Siciliana	Duorna del Chiampo	Durone rosso	Early Bigi	Early Bigi Siciliana	Ferrovia	Ferrovia Siciliana	Francese	Giorgia	Grace Star	Kordia	Lapins	Milanese	Regina	Roana	Romana	Sandra	Sandra tardiva	Sweet Early Siciliana	Van
acido caffeoil chinico 2	83	40	92	31	39	20	31	31	83	27	36	66	45	92	29	39	22	53	62	100	16	66
acido caffeoil chinico 3	100	55	74	60	77	77	89	86	96	93	57	85	65	91	70	80	73	88	76	79	72	84
acido caffeoil chinico addotto	100	28	61	28	59	58	85	67	93	82	30	67	41	77	50	63	61	80	52	68	52	64
acido caffeoil chinico metil derivato	100	44	47	67	74	72	54	77	64	86	52	79	47	89	68	65	72	81	63	70	39	62
acido caffeoil chinico 1	75	100	78	37	35	19	28	72	66	56	33	82	34	76	54	48	22	64	72	66	13	82
acido caffeoil chinico esoso 2	29	47	84	29	19	3	6	20	87	4	44	38	34	59	23	35	5	22	6	100	8	35
acido caffeoil chinico esoso 1	45	35	69	12	15	2	5	16	60	8	30	22	36	50	33	23	5	27	8	100	4	59
acido caffeoil chinico 4	87	78	51	80	93	74	82	100	85	100	63	91	67	79	75	91	67	87	68	64	82	69
acido caffeoil chinico 2 addotto	100	36	72	35	66	65	75	72	88	82	39	68	51	74	57	82	68	80	61	74	48	72
acido caffeico esoso	46	63	80	34	30	15	19	33	79	14	48	38	53	61	40	60	9	35	18	100	20	51
acido caffeoil chinico esoso 3	62	38	52	14	26	6	10	38	51	11	43	16	64	25	64	50	12	60	13	84	7	100
acido caffeoil chinico addotto	100	14	83	7	14	4	4	12	37	16	9	10	15	77	22	8	10	23	30	87	1	47
acido caffeoil chinico derivato	27	35	59	27	14	7	51	39	100	10	21	31	17	35	23	22	12	23	23	43	49	27
acido feruloil chinico	81	68	88	29	30	14	18	36	87	27	31	81	30	100	40	34	25	42	71	88	8	74
acido dicaffeoil chinico	77	60	66	29	66	70	59	69	100	60	46	74	56	84	40	56	39	55	44	77	52	83
acido cumaroil chinico 1	59	16	29	60	59	42	56	62	20	100	58	25	62	22	58	76	72	89	59	32	23	21
acido cumaroil chinico 1 addotto	38	4	8	30	37	19	36	40	5	100	41	7	45	7	39	61	49	74	42	17	6	8
acido cumaroil caffeoil chinico	100	29	41	54	96	82	48	82	41	88	56	43	73	48	49	79	62	85	65	89	39	44
acido cumaroil chinico 3	59	16	18	69	63	37	37	76	13	79	56	21	65	25	100	85	86	98	37	44	22	18
acido cumaroil chinico 2	47	15	17	90	82	31	40	98	15	56	71	15	95	16	88	100	90	92	16	23	33	19
acido cumaroil chinico 1 addotto	38	27	13	32	52	52	12	43	3	41	32	18	41	29	27	54	100	26	37	59	7	52
acido siringico derivato esoso	67	10	8	65	64	62	66	70	64	47	29	63	100	57	62	95	69	37	6	74	76	54
acido idrossibenzoico derivato addotto cloro	18	57	100	23	55	14	30	43	20	99	63	25	48	38	28	7	72	28	66	43	7	27
acido idrossibenzoico esoso addotto cloro	45	58	100	55	36	22	72	51	47	21	42	41	27	86	35	77	16	51	66	65	67	24
cianidina-O-rutinoside	77	62	88	72	82	75	77	72	64	65	68	54	100	67	42	67	93	53	64	97	84	80
cianidina-O-rutinoside addotto idrato	72	44	78	55	68	65	62	55	46	49	55	37	100	51	31	52	87	42	47	98	69	70
cianidina-O-rutinoside, isotopo	69	60	83	55	86	84	76	62	53	71	69	59	90	63	48	52	100	61	54	100	58	91
cianidina-O-rutinoside idrato addotto cloro	36	66	100	73	75	57	74	71	63	69	69	50	79	63	33	65	75	40	74	78	82	54
cianidina-O-rutinoside idrato addotto cloro	39	69	100	73	87	56	71	68	62	66	69	47	79	74	23	68	87	32	62	61	92	58
cianidina-O-rutinoside idrato addotto cloro	40	73	100	77	82	61	90	89	71	78	70	58	85	80	34	79	78	35	66	87	91	62
cianidina O-rutinoside idrato addotto cloro	50	86	96	91	89	59	84	94	89	76	79	83	90	100	46	98	96	46	93	71	92	85
pelargonidina-O-rutinoside	82	41	75	53	90	47	54	64	44	47	41	30	100	61	22	74	90	35	34	85	66	73
peonidina- rutinoside isomero trans	17	48	36	55	34	44	40	21	54	24	43	38	100	44	11	22	47	33	20	22	76	68
peonidina rutinoside addotto idrato isomero trans	16	42	34	54	30	40	35	19	47	20	43	31	100	37	8	19	39	28	17	16	71	58
cianidina O-glucoside	73	17	21	30	41	85	65	24	10	100	22	14	47	15	11	13	69	26	91	64	64	42
cianidina 3-O-glucoside addotto idrato	83	12	15	23	35	87	55	15	4	100	16	9	46	10	7	10	69	22	90	73	53	34
cianidina 3-O-glucoside addotto cloro	30	16	18	26	28	58	58	23	9	100	20	14	30	14	5	12	48	15	73	44	58	38
cianidina 3-O-glucoside addotto cloro	27	17	23	31	30	53	49	25	9	100	23	16	26	16	7	14	46	19	76	44	62	30
cianidina 3-O-glucoside addotto cloro	38	12	23	37	38	65	72	34	9	100	25	16	43	14	6	16	55	13	87	57	59	39
quercetina-O-rutinoside	69	45	84	62	59	61	60	53	46	54	52	34	77	42	41	53	90	49	55	100	71	60
quercetina-3-O-glucoside	62	15	39	29	36	75	55	22	13	100	19	10	40	12	12	15	75	25	100	80	57	41
quercetina-O-rutinoside-O-esoside	97	73	84	71	91	78	96	91	83	73	60	49	67	69	51	88	79	60	86	73	100	59
canferolo-O-rutinoside	93	57	77	68	66	38	75	80	57	39	51	39	51	35	90	90	52	100	46	50	90	45
canferolo-O-esoside	54	10	100	17	20	16	8	15	11	10	17	7	26	7	33	37	38	37	32	39	17	7
triidrossiflavone-O-esoside addotto formico	64	83	95	25	31	26	20	28	41	10	56	49	57	71	48	75	83	37	19	100	23	49
triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	19	100	100	22	20	16	23	27	48	9	40	49	36	78	24	59	41	11	14	70	26	24
triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	14	96	100	16	19	15	22	26	44	7	37	45	37	80	21	60	39	9	14	70	28	27
triidrossiflavone-O-pentoside addotto cloro	25	100	64	41	29	23	43	34	42	19	22	32	30	54	48	53	23	21	14	27	38	24
triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	27	71	100	23	27	16	21	30	48	12	47	50	38	77	23	58	48	7	19	75	31	27
triidrossiflavone-O-pentoside addotto cloro	18	61	38	25	17	13	28	20	28	12	14	18	19	33	28	28	13	8	16	22	16	20
triidrossiflavone-O-esoside addotto cloro	20	99	100	21	13	11	22	25	41	17	35	56	49	57	36	42	46	16	18	58	26	20
diidrossiflavanone-O-esoside addotto cloro	52	62	33	36	54	86	72	63	74	81	38	49	59	70	33	73	45	48	44	50	100	50
diidrossiflavanone-O-esoside addotto formico	72	36	19	22	43	100	43	35	37	48	21	30	56	40	31	48	31	53	30	38	64	46
epicatechina	77	22	73	29	47	49	40	48	21	54	54	46	55	48	33	72	46	59	36	100	18	34
epicatechina addotto cloro	45	36	100	42	55	49	56	68	32	79	70	63	53	67	33	97	43	46	48	90	30	34
epicatechina addotto cloro	52	40	100	47	64	59	67	76	35	88	73	67	60	70	40	93	49	53	51	93	36	34
catechina	65	28	46	17	43	77	58	38	11	100	21	35	71	26	30	63	70	52	90	34	25	24
catechina addotto cloro	39	33	42	25	40	59	62	41	12	100	32	41	60	30	26	63	56	34	80	25	30	23
catechina/epicatechina derivato	14	10	100	16	12	7	6	14	5	12	19	6	17	7	13	29	18	14	22	29	2	3
procianidina P2-	50	15	76	37	35	28	27	40	15	40	54	43	47	46	33	73	28	52	17	100	10	25
procianidina P2-	81	31	83	34	54	61	53	48	16	80	29	59	100	55	34	87	59	57	68	84		

Le analisi condotte mostrano un chiaro e forte pattern varietale di accumulo dei metaboliti secondari. In particolare, le diverse varietà mostrano attitudini differenti e ben distinte nell'accumulo di antocianine rutinoside, antocianine glucoside, derivati dell'acido cumarico, derivati dell'acido caffeico, flavonoli, altri flavonoidi, procianidine e flavan-3-oli. Si noti come Sandra tardiva, Cappuccia Siciliana e Bella Italia, seguite da Kordia, Roana, Regina e Francese, si presentano, in generale, le varietà più ricche di tutte le classi di metaboliti secondari (Figg.32, 33 e 34). Di contro, le cultivar con bassi livelli di polifenoli sono Milanese, seguito da Black Star, Sweet Early Siciliana, Grace Star, Durona del Chiampo e Giorgia. Le restanti cultivar hanno mostrato livelli intermedi di polifenoli.

Quando l'analisi è sui singoli metaboliti si osserva come, i derivati dell'acido caffeico ed i derivati dell'acido cumarico si comportano in modo indipendente, e quindi ci sono varietà capaci di accumulare alti livelli di derivati dell'acido caffeico ma non dell'acido cumarico (ad esempio Cappuccia Siciliana, Grace Star, Lapins, Sandra tardiva e Van) e vice-versa (Roana), mentre altre varietà (Ferrovia, Regina) accumulano insieme derivati sia dell'acido cumarico sia dell'acido caffeico.

Per quanto riguarda le antocianine, ci sono varietà che prediligono i rutinosidi di tutte le antocianine (Durone rosso, Kordia, Roana) e altre che prediligono i glucosidi (Sandra, Francese, Early Bigi), ed altre ancora che sono caratterizzate da minor accumulo di tutte le antocianine (Black Star, Grace Star, Milanese e Romana).

Per quanto riguarda i flavonoidi, in particolare, Bella Italia, Durone Rosso e Sandra accumulano alte quantità dei flavonoli quercetina e canferolo ma non degli altri flavonoidi, mentre Black Star, Grace Star e Lapins accumulano molto gli altri flavonoidi e poco i flavonoli quercetina e canferolo.

4.5 Validazione dei dati HPLC-ESI-MS mediante tecnica HPLC-DAD

La spettrometria di massa è una tecnica di rivelazione che, come discusso precedentemente, consente di identificare con estrema precisione i metaboliti di una miscela.

Tuttavia, le sue performance quantitative sono soggette ad alcune limitazioni in quanto durante la fase di ionizzazione, i metaboliti possono competere tra loro per l'acquisizione della carica, soprattutto quando più molecole eluiscono con lo stesso tempo di ritenzione.

Ciò comporta errori di sottostima o sovrastima, in quanto alcune molecole ionizzate possono essere rilevate dal detector mentre altre no.

Tale effetto di competizione per l'acquisizione della carica è noto come effetto matrice/soppressione ionica (Taylor, 2005).

Questo è il motivo per cui la tecnica HPLC-ESI-MS può fornire solo dati semi-quantitativi consentendo la comparazione relativa dei metaboliti contenuti nei campioni e non la loro quantificazione assoluta.

Pertanto è preferibile associare alla spettrometria di massa una tecnica di quantificazione più robusta, come ad esempio quella basata su rivelatori tipo *diode array*, al fine di validarne i dati.

Con questo scopo, gli estratti metanolici dei campioni di ciliegia sono stati analizzati mediante la tecnica HPLC-DAD misurando l'assorbanza delle molecole in essi contenuti nel *range* di lunghezze d'onda tra 190 e 600 nm, ovvero il *range* UV-visibile.

Le identificazioni dei vari gruppi di metaboliti si sono basate sulle proprietà di questi ultimi di assorbire la radiazione magnetica in regioni specifiche in conseguenza della loro struttura chimica: i flavan-3-oli e le procianidine assorbono a 280 nm, gli acidi idrossicinnamici attorno a 320 nm e i flavonoidi intorno a 350 nm.

Sono poi state misurate per integrazione le aree dei picchi ottenuti per i principali metaboliti identificati, consentendo così di valutarne i diversi quantitativi.

Al fine di formalizzare questa analogia riscontrata per i dati ottenuti tra HPLC-DAD e quelli ottenuti mediante HPLC-ESI-MS, si è sviluppata una "*heat map*" che rappresenta un *output* per confrontare in modo preciso i dati ottenuti dalle due tecniche.

La figura 35 riporta i valori delle aree dei principali metaboliti rilevati per ogni varietà, espressi come percentuale rispetto al valore massimo rilevato; l'assegnazione di un codice a colori consente di visualizzare in modo immediato le similitudini e le differenze tra i campioni.

È possibile osservare come i pattern così determinati siano molto simili in entrambe le tecniche con una tendenza (attesa) del detector MS, rispetto al detector DAD, ad appiattare le differenze.

Pertanto, in questo esperimento, si possono ritenere validi, per la comparazione dei campioni, i dati semi-quantitativi ottenuti mediante HPLC-ESI-MS poiché in entrambe le metodiche si riflette un andamento simile dei valori riscontrati.

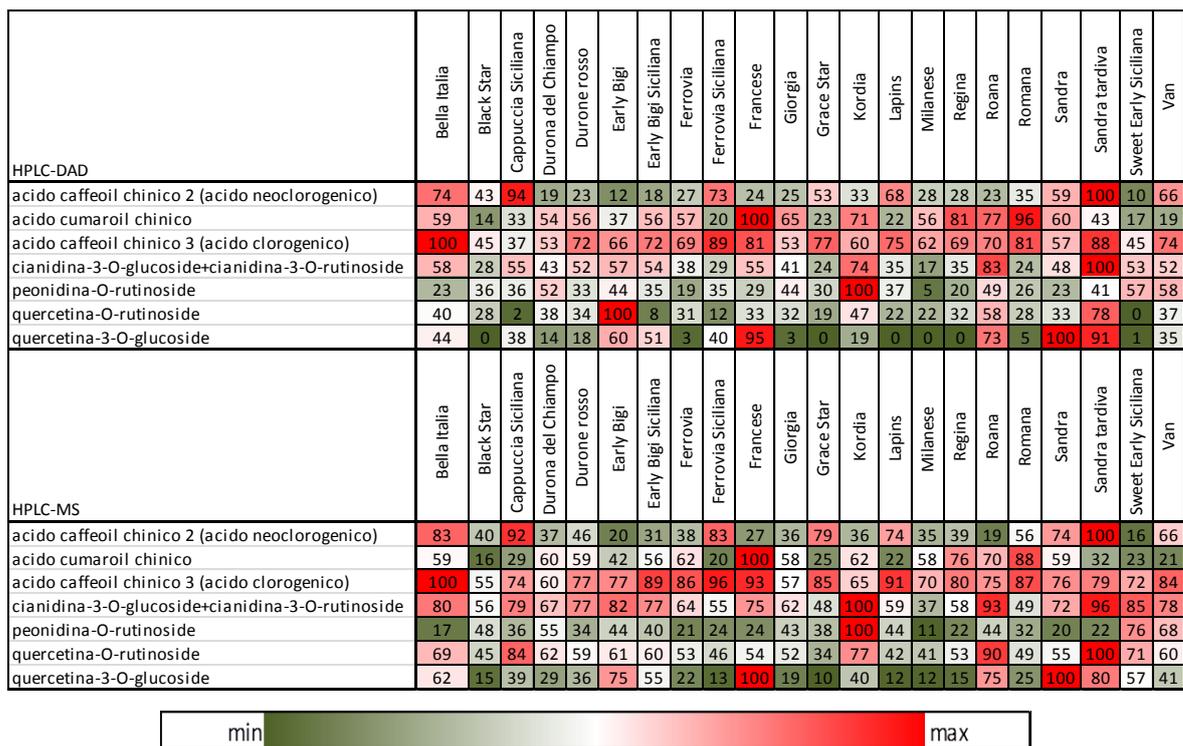


Figura 35 Heat map riguardante la comparazione dei dati ottenuti mediante HPLC-DAD e quelli ottenuti tramite HPLC-ESI-MS

4.6 Interpretazione dei dati metabolomici mediante analisi statistica multivariata

Al fine di interpretare le variazioni nei metabolomi delle diverse varietà di ciliegie, si è adottato un approccio di analisi statistica multivariata.

La matrice di dati ottenuta per le molecole ionizzate in modalità negativa nell'analisi HPLC-ESI-MS è stata analizzata con il software SIMCA-P di Umetrics (Sweden) attraverso i metodi statistici PCA (analisi delle componenti principali) e O2PLS-DA (*orthogonal projections to latent structures discriminant analysis*). Queste analisi sono state utilizzate con lo scopo di semplificare la grande quantità di dati contenuti nella matrice, individuando delle variabili, definite componenti principali, in grado di discriminare i differenti campioni sulla base dei metaboliti in essi contenuti.

L'analisi O2PLS-DA ha consentito di stabilire il grado di correlazione tra una classe di campioni e le molecole, in modo da comprendere quali siano i metaboliti che più la caratterizzano.

Ogni modello statistico, così generato, è stato validato compiendo 200 test di permutazione sul *dataset* iniziale in grado di valutarne la significatività e la robustezza. I

modelli statistici sono stati considerati validi se in grado di superare il test della varianza ANOVA con un valore $p < 0.05$.

Le analisi qualitative dei principali metaboliti, determinati attraverso HPLC-ESI-MS, hanno consentito di effettuare 67 identificazioni su 203 segnali rilevati, comprendenti isotopi e addotti riferiti a 38 metaboliti differenti, appartenenti principalmente alle classi degli antociani, flavonoidi, procianidine/flavan-3-oli, acidi idrossicinamici ed idrossibenzoici.

Per la comparazione dei campioni in relazione ai metaboliti individuati, dato l'alto numero di campioni (20 varietà x 2 annate x 3 repliche biologiche) è stato utilizzato un approccio di studio statistico multivariato.

Sulla matrice dei dati, ottenuta a seguito dell'esperimento con metodologia HPLC-ESI-MS, è stata condotta l'analisi delle componenti principali (PCA), un'analisi di tipo "unsupervised", cioè senza l'immissione di informazioni sui campioni da parte dell'utente, che ha avuto come obiettivo la semplificazione dei dati di origine senza perdere l'informazione in essi contenuta (Ringnér, 2008). Il modello PCA a componenti multiple ottenuto è stato in grado di spiegare il 79,3 % della varianza totale.

Nel set di dati, a partire dalle variabili originarie (i metaboliti quantificati in modo relativo attraverso l'area dei picchi cromatografici, in unità arbitrarie), sono state create delle nuove variabili, definite componenti principali. Il risultato è uno "score plot" come quello mostrato in figura 36 ovvero un piano cartesiano definito da due componenti raffigurate in modo ortogonale, che mostra un raggruppamento dei campioni sulla base dei metaboliti in essi contenuti.

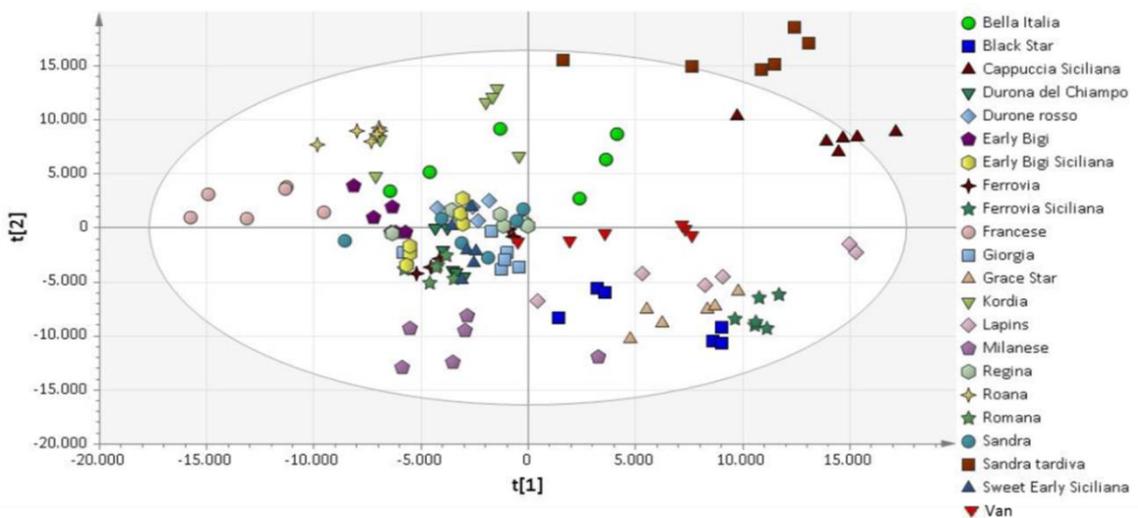


Figura 36. Score plot risultante dall'analisi PCA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS

La distanza tra un campione ed un altro corrisponde all'indice di similarità dei campioni stessi: campioni vicini sono molto simili, per contro, campioni molto distanti saranno molto differenti.

Nel nostro modello è evidente il raggruppamento dei campioni per varietà a conferma che le varietà, indipendentemente dall'annata, sono caratterizzate dai metaboliti in essi contenuti.

In questo modello ottenuto si possono osservare le correlazioni esistenti tra le prime due componenti principali.

Data la distribuzione dei campioni, la prima componente principale fornisce l'informazione relativa all'epoca di maturazione cultivar – dipendente, distribuendo le varietà precoci, come ad esempio la Francese, in posizione diametralmente opposta a quella della Cappuccia o della Sandra Tardiva che risultano invece essere varietà tardive.

La seconda componente probabilmente riflette il contenuto di antociani che conferisce la colorazione al frutto infatti vede la Milanese, una ciliegia a polpa bianca in antitesi con la Sandra Tardiva che possiede polpa e buccia intensamente colorate.

Alcune varietà, come Cappuccia e Sandra Tardiva, si dispongono al di fuori dell'area delimitata dall'ellisse, definendosi come "*outliers*". Questa anomala disposizione ci permette di prendere in esame questi campioni e valutarne il loro comportamento come anomalia o come peculiarità caratteristica meritevole di approfondimenti. Sulla base delle osservazioni effettuate su questo modello statistico non supervisionato si è scelto di proseguire l'analisi indirizzandola con un criterio ben definito.

I raggruppamenti osservati nell'analisi PCA sono stati indagati ulteriormente ad un livello più approfondito di analisi statistica mediante la tecnica O2PLS-DA (*orthogonal projections to latent structures discriminant analysis*).

Tenendo conto delle date di raccolta dei nostri campioni, si è voluto condurre l'analisi focalizzandola su tre distinti gruppi di varietà accomunati dallo stesso periodo di raccolta, quindi si è voluto applicare un approccio di tipo "*supervised*", nel quale i campioni si raggruppano in classi per validare l'ipotesi precostruite.

Tale analisi elabora il set di dati cercando di determinare le variabili (i metaboliti) discriminanti le diverse classi istituite (Liland, 2011). I modelli O2PLS-DA sono stati convalidati con un test ANOVA ($p < 0.01$) e con un *permutation test* (200 permutazioni) per il corrispondente modello di PLS-DA.

I gruppi analizzati sono i seguenti:

1. **Gruppo Precoci** (Early Bigi, Early Bigi Siciliana, Francese, Sandra e Sweet Early)
2. **Gruppo Intermedie** (Bella Italia, Black Star, Giorgia, Grace Star, Milanese, Roana, Romana e Van)
3. **Gruppo Tardive** (Cappuccia, Durona del Chiampo, Durone Rosso, Ferrovia, Ferrovia Siciliana, Lapins, Kordia, Regina, e Sandra Tardiva)

Gruppo Precoci

La prima analisi ha confrontato le varietà rientranti in un'epoca di raccolta precoce. Le varietà analizzate mediante un modello O2PLS-DA (*Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis*) sono Early Bigi, Early Bigi Siciliana, Francese, Sandra e Sweet Early. Lo *score plot* ad essa riferito mostra Sandra e Francese ben separate lungo la componente principale 2, ed entrambe risultano ben differenziate rispetto alla componente 1 con la Sweet Early Siciliana. Le due Early Bigi, invece, lungo entrambe le componenti, hanno caratteristiche intermedie (Fig.37).

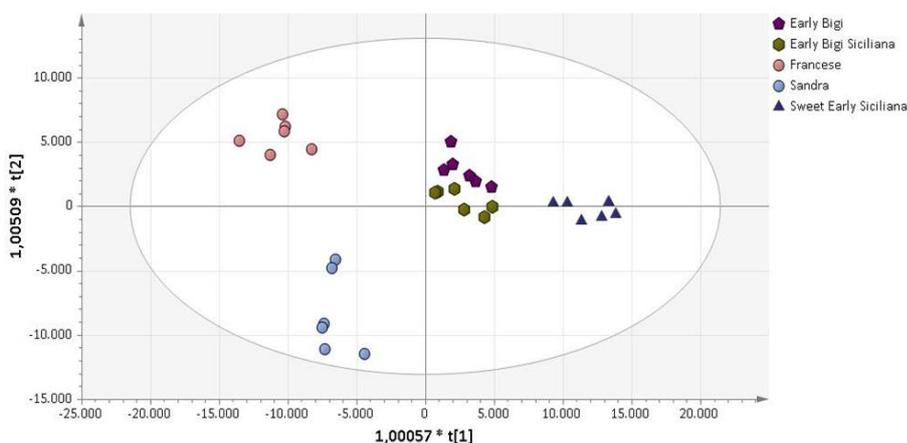


Figura 37. *Score plot* risultante dall'analisi O2PLS-DA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (A)

Il passo successivo è quello di determinare quali sono i metaboliti che correlano maggiormente con una classe di campioni, ovvero che la caratterizzano.

Si ricorre ad una rappresentazione grafica denominata "*loading plot*" che mette in relazione i valori $pq(\text{corr})$, ovvero i valori che esprimono il grado di correlazione dei

metaboliti (la componente q del modello) con le classi di campioni, ovvero, in questo caso, le varietà (la componente p del modello).

Il *loading plot* dell'analisi discriminante (O2PLS-DA) consente di vedere quali metaboliti (indicati con triangoli neri) caratterizzano le varietà (indicate con i pallini rossi) (Fig.38).

La distanza fra i metaboliti e le varietà riflette le loro relazioni: più i metaboliti sono vicini ad una varietà, più questi risultano caratterizzanti per la stessa. Inoltre più distanti dall'origine degli assi si dispongono le varietà maggiormente queste saranno caratterizzate e distinte in base ai loro metaboliti.

Di seguito, in figura 38, si riporta il *loading plot* riferito all'analisi O2PLS-DA effettuata sul gruppo delle varietà precoci prese in esame. È evidente come la disposizione delle classi (varietà) rifletta perfettamente quanto già osservato in precedenza, ossia Sandra e Francese ben caratterizzate, Sweet Early mediamente distinta e le Early Bigi scarsamente differenziate.

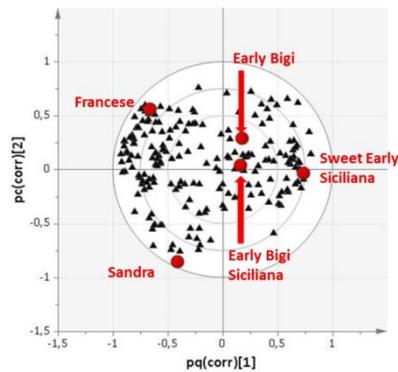


Figura 38. *Loading plot* dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (A)

Nel grafico di seguito riportato (Fig.39) i metaboliti sono colorati a seconda della classe chimica di appartenenza.

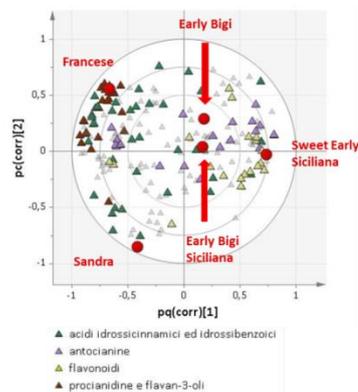


Figura 39. *Loading plot* dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (A) con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

Con i pallini rossi sono sempre indicate le varietà mentre i triangoli rappresentano i metaboliti suddivisi per famiglia chimica di appartenenza; ad ogni triangolo presente nella figura corrisponde un metabolita. In grigio chiaro sono indicati i segnali non identificati. Più un metabolita giace vicino ad una varietà e più esternamente quest'ultimo si localizza all'interno del quadrante, più questo metabolita la caratterizza in modo forte.

Francese è caratterizzata da procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici, mentre correla negativamente con i flavonoidi e antocianine (in quanto giacciono dalla parte opposta del grafico). Sweet Early invece presenta la situazione opposta in quanto correla positivamente con flavonoidi e antocianine, ma risulta poco caratterizzata da procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici. Sandra mostra un comportamento simile a Francese in quanto correla positivamente con gli acidi idrossicinnamici e le procianidine e negativamente con le antocianine e i flavonoidi ma la caratterizzazione è evidenziata in minor misura rispetto alla precedente analisi. Le due Early Bigi sono debolmente caratterizzate da antocianine, acidi idrossicinnamici e flavonoidi e correlano negativamente con le procianidine/flavan-3-oli.

È da rilevare la similarità dei campioni di Early Bigi che pur provenendo da diversi ambienti di coltivazione presentano una composizione simile in relazione ai metaboliti secondari accumulati. Ciò suggerisce che l'impronta genetica della varietà è il fattore più importante per il controllo dell'accumulo dei metaboliti secondari, e che le diverse condizioni ambientali e pedoclimatiche hanno un ruolo minore rispetto alle caratteristiche genetiche della varietà.

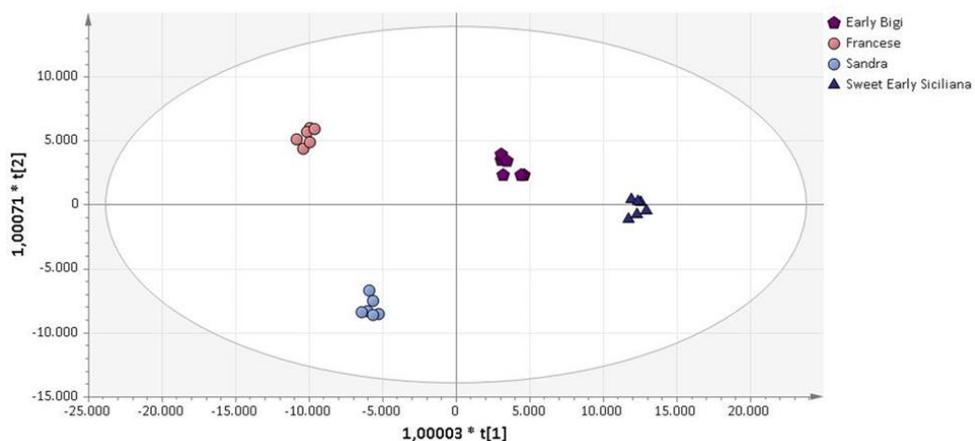


Figura 40. Score plot risultante dall'analisi O2PLS-DA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (B)

Proseguendo l'analisi eliminando dal confronto l'Early Bigi Siciliana, assistiamo alla generazione di uno *score plot* corrispondente (Fig.40) che ricalca pedissequamente quanto già osservato nella precedente comparazione.

Sandra e Francese risultano ben separate lungo la componente principale 2, ed entrambe risultano ben differenziate rispetto alla componente 1 con la Sweet Early Siciliana. Early Bigi, invece, lungo entrambe le componenti, mantiene caratteristiche intermedie. Quanto appena esposto si può evincere anche nello loading plot ad essa corrispondente (Fig.41), dove Sandra e Francese appaiono chiaramente distinte, Sweet Early mediamente caratterizzata e Early Bigi debolmente differenziata.

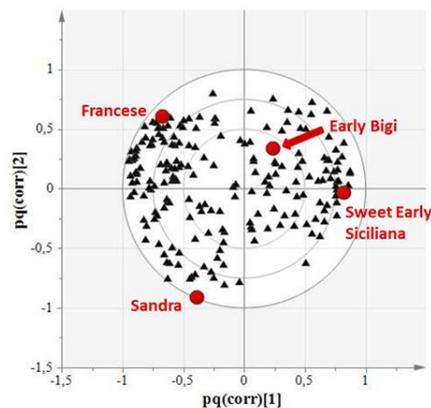


Figura 41. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (B)

Riguardo la correlazione dei metaboliti in relazione alla varietà si può osservare la diversa distribuzione nella figura seguente (Fig.42).

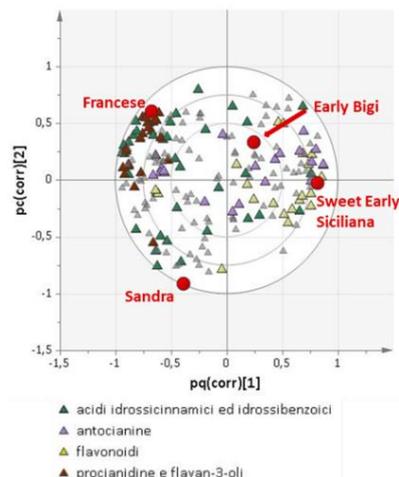


Figura 42. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (B) con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

Francese è caratterizzata da procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici, mentre correla negativamente con i flavonoidi e antocianine (in quanto giacciono dalla parte opposta del grafico). Sweet Early invece presenta la situazione opposta in quanto correla positivamente con flavonoidi e antocianine, ma risulta poco caratterizzata da procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici.

Sandra mostra un comportamento simile a Francese in quanto correla positivamente con gli acidi idrossicinnamici e le procianidine e negativamente con le antocianine e i flavonoidi ma la caratterizzazione è evidenziata in minor misura rispetto alla precedente analisi. Early Bigi permane debolmente caratterizzata da antocianine, acidi idrossicinnamici e flavonoidi e correlano negativamente con le procianidine/flavan-3-oli. Quanto detto ci conferma che Early Bigi Siciliana si inseriva in un modello statistico altamente predittivo e riproducibile che ne avvalorava ulteriormente la significatività statistica.

La stessa analisi è stata effettuata escludendo Sweet Early Siciliana, per evidenziare eventuali altre differenze fra le varietà rimanenti (Early Bigi, Early Bigi Siciliana, Francese e Sandra) (Fig.43).

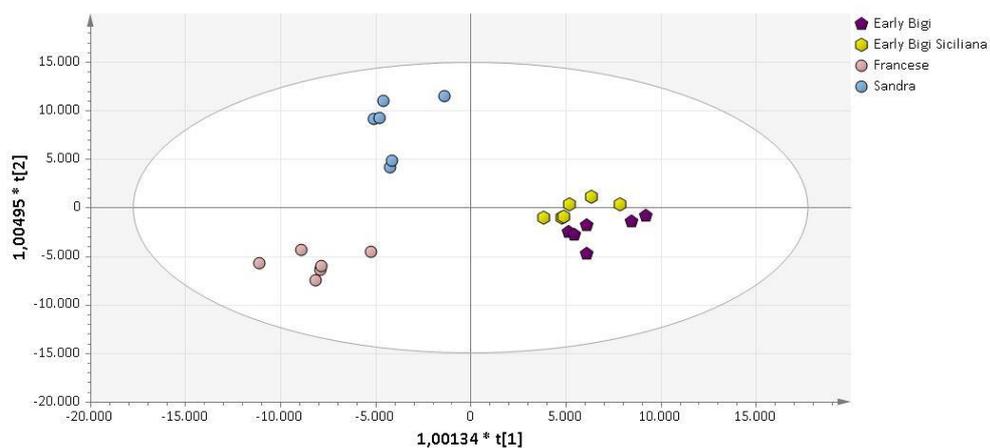


Figura 43 Score plot risultante dall'analisi O2PLS-DA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (C)

Francese e Sandra mantengono la differenziazione precedentemente osservata mentre le due Early Bigi si differenziano maggiormente per la prima componente principale rispetto a quanto osservato in precedenza.

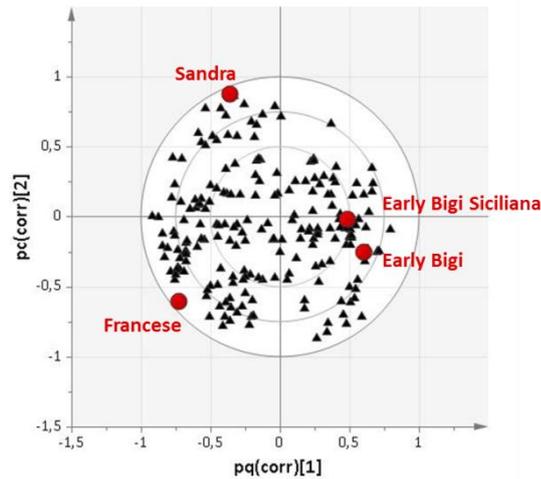


Figura 44. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (C)

Lo score plot (Fig.45) riferito alle diverse classi di metaboliti di seguito riportato ci illustra come le due Early Bigi differiscono dalle altre due varietà per la presenza di antocianine, flavonoidi e modeste quantità di acidi idrossicinnamici e per l'assenza procianidine/flavan-3-oli.

Francese mantiene la caratterizzazione precedente, contraddistinta dalla presenza di procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici e da una correlazione negativa con antocianine e flavonoidi. Sandra, invece, si identifica per modesti livelli di quasi tutte le classi di metaboliti, ad eccezione degli antociani, ed anche di diversi metaboliti non identificati

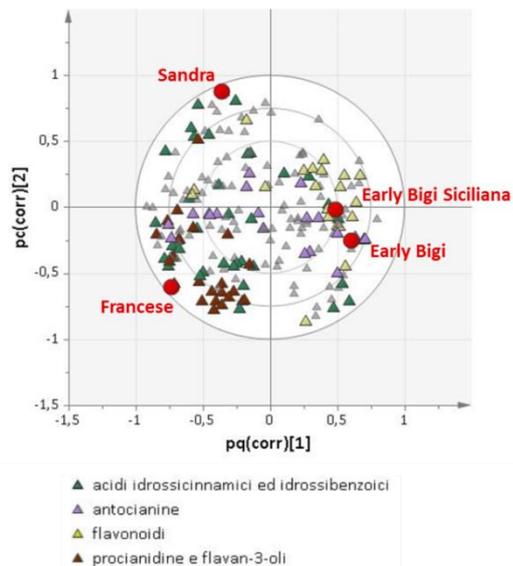


Figura 45. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo PRECOCI (C) con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

Solo quando le due Early Bigi sono analizzate da sole (Fig.46), si riscontra che la Early Bigi veronese si distingue per un maggior contenuto in antociani e flavonoidi come precedentemente osservato, mentre la siciliana presenta inoltre un modesto accumulo di procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici che in precedenza non erano stati evidenziati.

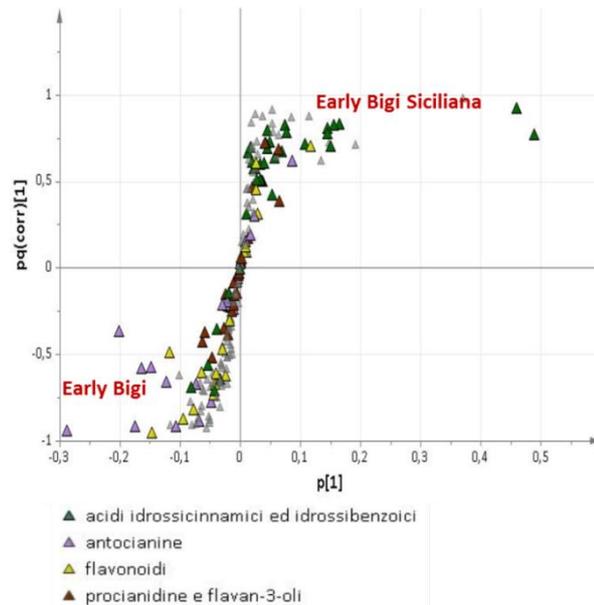


Figura 46. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita a Early Bigi e a Early Bigi Siciliana con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

Fermo restando quanto osservato precedentemente, ossia come il diverso ambiente non abbia influenzato complessivamente in modo forte il profilo metabolomico della varietà Early Bigi, scendendo ad un livello più particolareggiato dell'analisi, si possono riscontrare delle differenze che possono ascriversi come probabili espressioni delle diverse zone di coltivazione.

Gruppo Intermedie

Lo stesso tipo di analisi è stato condotto sul gruppo delle varietà con calendario di raccolta ricadente in epoca intermedia.

L'analisi relativa a tale gruppo (Bella Italia, Black Star, Giorgia, Grace Star, Milanese, Roana, Romana e Van) è di seguito mostrata (Fig. 47).

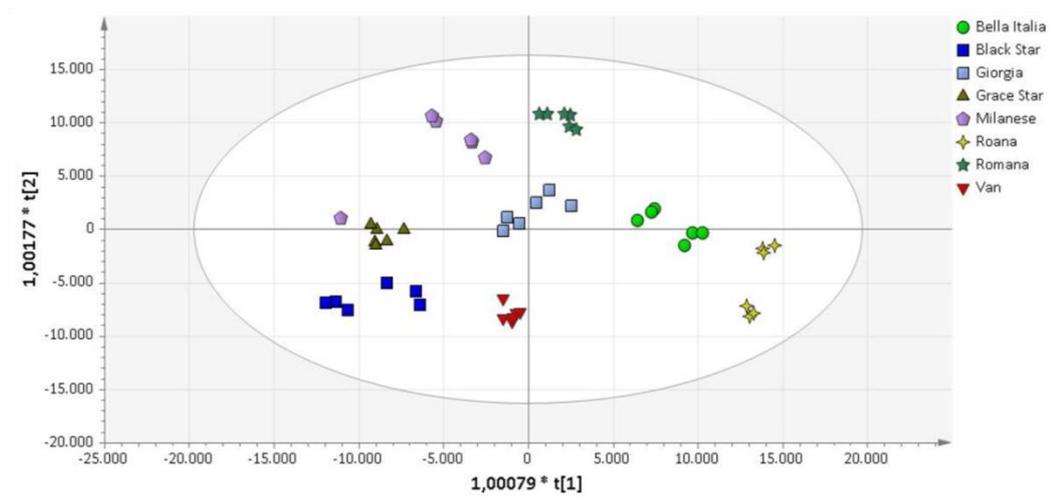


Figura 47 Score plot risultante dall'analisi O2PLS-DA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo INTERMEDIE.

Bella Italia e Black Star si dispongono ben separate lungo la componente principale 1, come pure Roana e Grace Star, mentre le altre varietà, lungo questa componente, possiedono caratteristiche intermedie.

La seconda componente separa Milanese e Romana da Van, Roana e Black Star, in posizione intermedia si trovano Grace Star e Bella Italia.

Giorgia, invece, dimostra di avere caratteristiche intermedie per entrambe le componenti posizionandosi al centro dell'ellisse.

Anche il *loading plot* (Fig.48) ci conferma che Roana presenta una più spiccata differenziazione dovuta alla sua maggiore concentrazione di metaboliti.

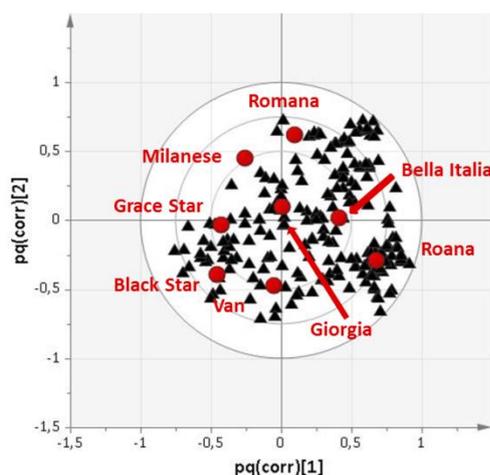


Figura 48. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo INTERMEDIE

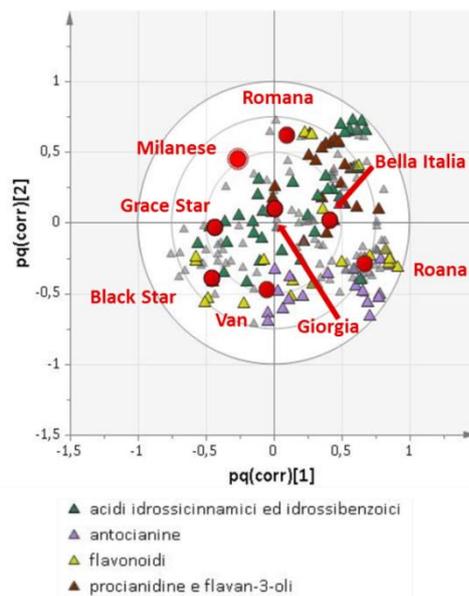


Figura 49. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo INTERMEDIE con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

È possibile affermare che Roana si differenzia dalle altre varietà del gruppo per la sua correlazione positiva con antocianine e flavonoidi, mentre la stessa correla negativamente con acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici, procianidine e flavan-3-oli. Bella Italia è caratterizzata da procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici.

Black Star è mediamente contraddistinta da flavonoidi e acidi idrossicinnamici, mentre Van è mediamente differenziata dalle antocianine, tuttavia entrambe le varietà correlano negativamente con le procianidine e flavan-3-oli. Romana, al contrario, invece si caratterizza per una media correlazione con procianidine e flavan-3-oli, flavonoidi e acidi idrossicinnamici mentre non è correlante con le antocianine.

Le restanti varietà, Milanese, Grace Star e Giorgia posseggono invece caratteristiche intermedie tra le varietà del gruppo (Fig.49).

Gruppo Tardive

L'analisi relativa al gruppo delle tardive ha permesso di distinguere perfettamente quattro sottogruppi (Fig.50, 51).

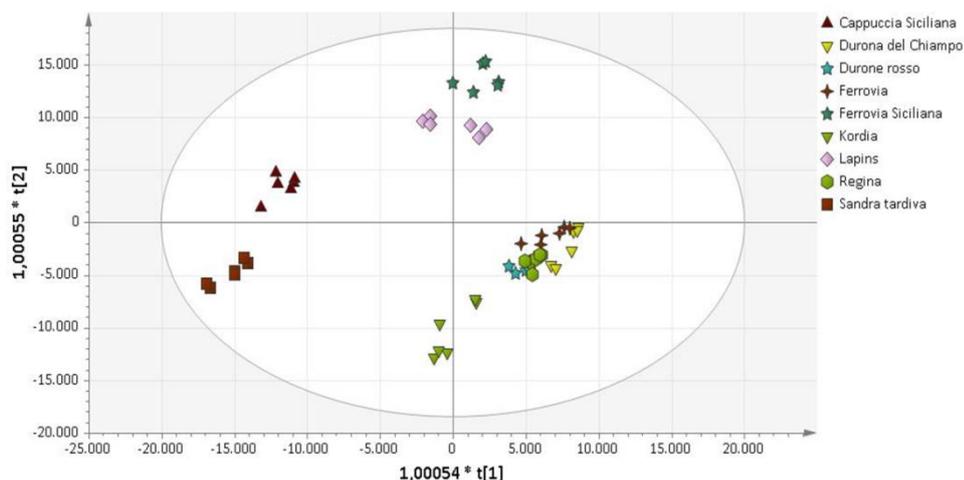


Figura 50. Score plot risultante dall'analisi O2PLS-DA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo TARDIVE

I gruppi che si sono differenziati sono delimitati da cerchi di diverso colore.

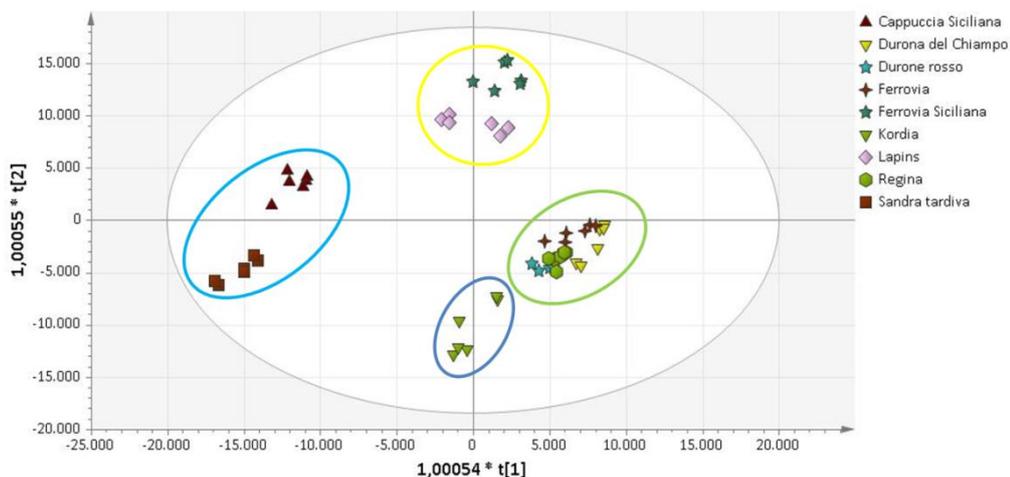


Figura 51. Score plot risultante dall'analisi O2PLS-DA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo TARDIVE con esplicitazione dei gruppi con simile differenziazione

In riferimento alla prima componente principale possiamo affermare che il gruppo che comprende Cappuccia e Sandra Tardiva si differenzia dal gruppo di Ferrovia, Durona del Chiampo, Durone Rosso e Regina, mentre Kordia, ponendosi nel mezzo, presenta caratteristiche intermedie tra i due gruppi.

Rispetto alla seconda componente principale, invece Ferrovia Siciliana e Lapins mostrano diversità rispetto alla precedente citata Kordia. Tutte le altre varietà invece presentano caratteristiche intermedie.

La diversità tra Ferrovia e Ferrovia Siciliana potrebbe ascriversi al diverso ambiente di coltivazione o ad un errore di campionamento delle ciliegie siciliane, dato che quelle raccolte nella zona di Marostica rappresentano un pool di frutti da diversi ceraseti, che sono però risultati tutti simili fra loro (non mostrato). Per confermare ciò potrebbe essere utile uno studio di genetica molecolare tale da avvalorare o meno l'ipotesi avanzata.

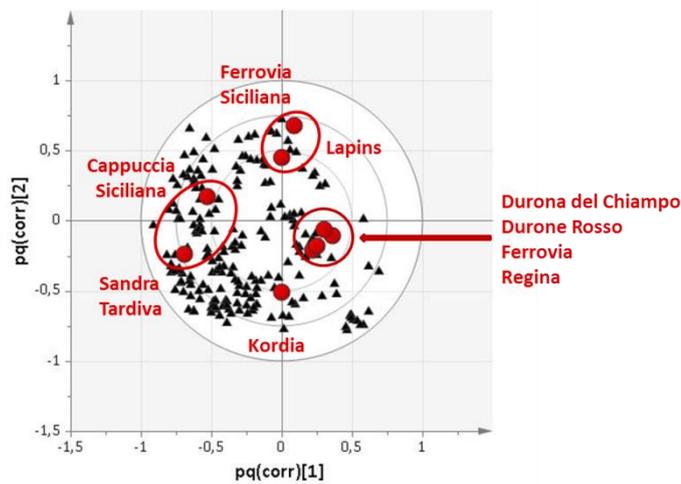


Figura 52. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo TARDIVE

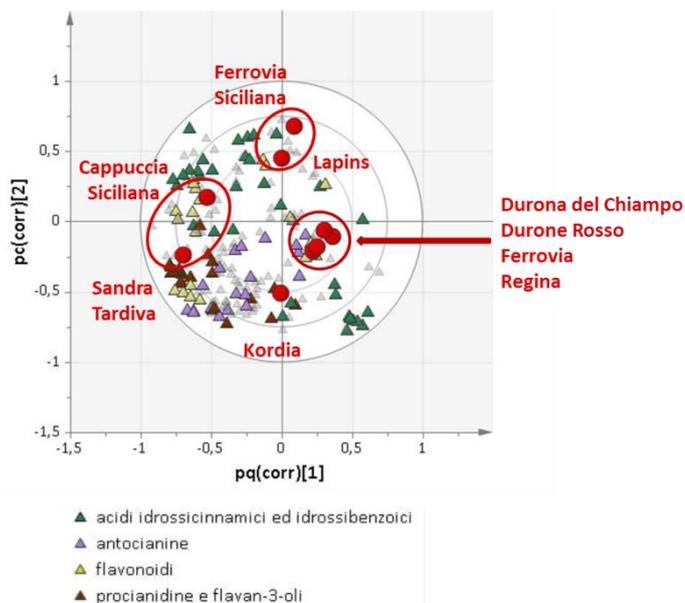


Figura 53. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al gruppo TARDIVE con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

I *loading plot* (Fig. 52 e 53) ci evidenziano come Sandra Tardiva sia positivamente caratterizzata da procianidine ed acidi idrossicinnamici (derivati dell'acido caffeico e ferulico) e Cappuccia da acidi idrossicinnamici e flavonoidi.

Kordia appare distinta dalle altre varietà per antocianine, procianidine e acidi idrossicinnamici ed idrossibenzoici.

Ferrovia Siciliana e Lapins invece per acidi idrossicinnamici idrossibenzoici e per la mancanza di antocianine e procianidine e flavan-3-oli.

Il gruppo comprendente Durona del Chiampo, Durone Rosso, Ferrovia e Regina appare scarsamente differenziato e pertanto si ritiene opportuno approfondire per queste varietà l'analisi.

Quando queste ultime varietà si analizzano da sole si può notare dallo *score plot* seguente (Fig. 54) come Regina si differenzia notevolmente dai due duroni lungo la prima componente e che questi a loro volta sono differenziati lungo la seconda

Ferrovia invece continua a confermare il possesso di caratteristiche intermedie al gruppo.

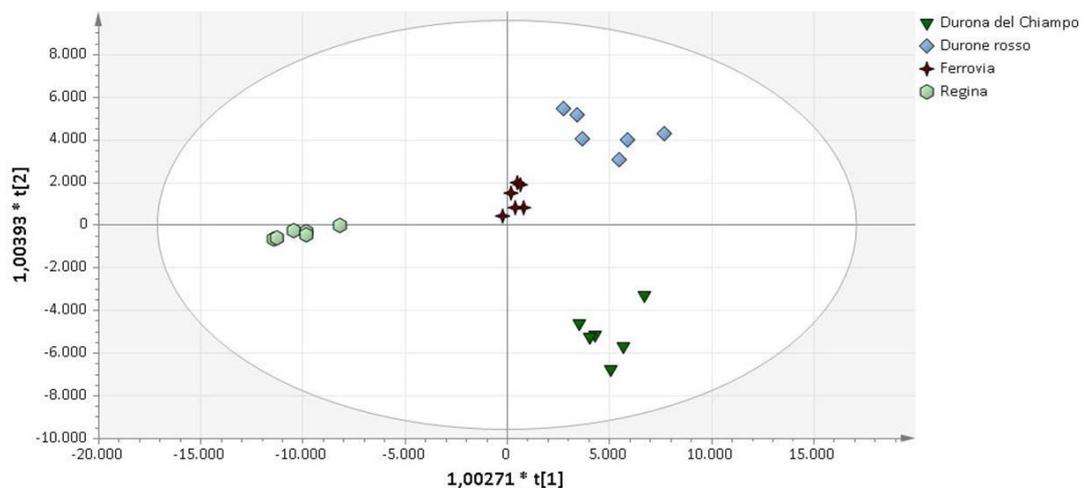


Figura 54. *Score plot* risultante dall'analisi O2PLS-DA condotta sul set di dati HPLC-ESI-MS riferita al sottogruppo TARDIVE.

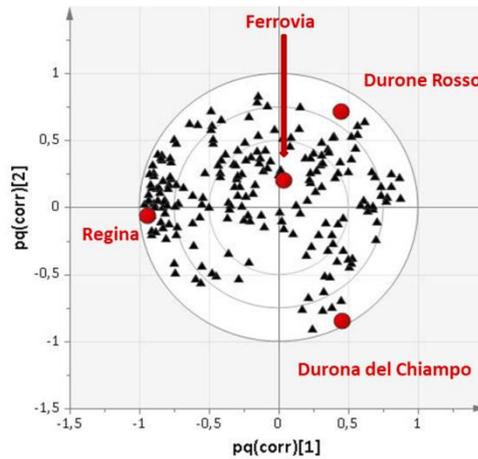


Figura 55. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al sottogruppo TARDIVE 2

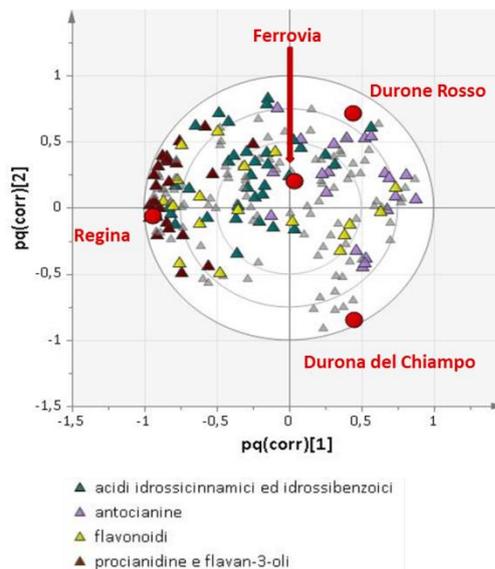


Figura 56. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita al sottogruppo TARDIVE con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

Regina si caratterizza per la presenza di acidi idrossicinnamici (derivati dell'acido cumarico) e di alcuni flavonoidi (derivati del canferolo), Durone rosso si differenzia per il livello di acidi idrossicinnamici e antocianine , Durona del Chiampo per il basso livello di alcuni acidi idrossicinnamici e alcune procianidine/flavan-3-oli (del tipo P2), e per la presenza di metaboliti non identificati. Ferrovia, come detto precedentemente non si differenzia per nessuna classe di molecole (Figg.55 e 56).

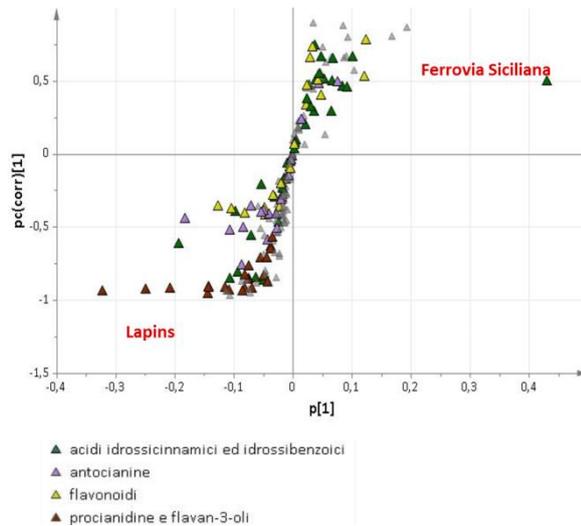


Figura 57. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita a Ferrovia Siciliana e Lapins con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

Quando Lapins e Ferrovia Siciliana sono analizzate da sole (Fig. 57), si riscontra che la Ferrovia si distingue per un maggior contenuto in antociani e flavonoidi, mentre la Lapins presenta inoltre un modesto accumulo di procianidine/flavan-3-oli e acidi idrossicinnamici che in precedenza non erano stati evidenziati.

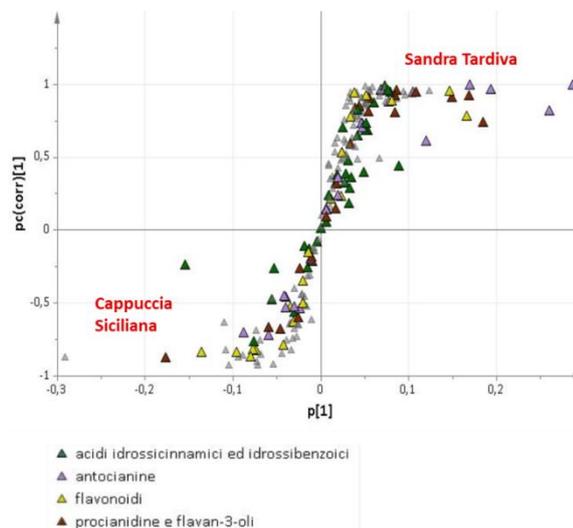


Figura 58. Loading plot dell'analisi O2PLS-DA condotta sui dati HPLC-ESI-MS riferita a Sandra Tardiva e Cappuccia Siciliana con esplicitazione delle diverse classi di metaboliti

Quando invece si analizzano Cappuccia e Sandra Tardiva (Fig. 58), le varietà meglio differenziate e dovuta ad una maggiore concentrazione di metaboliti, possiamo affermare che Cappuccia sia contraddistinta da un maggiore accumulo di antocianine e flavonoidi rispetto ad una Sandra Tardiva che invece è positivamente caratterizzata da procianidine ed acidi idrossicinnamici (derivati dell'acido caffeico e ferulico).

5. DISCUSSIONE

La composizione metabolica di una ciliegia varia notevolmente in relazione al genotipo, all'ambiente, ai fattori pedoclimatici e alle pratiche agronomiche adottate.

In questo lavoro è stata studiata in dettaglio la composizione metabolica riferita a 20 cultivar di ciliegio dolce coltivate in provincia di Palermo (Sud Italia) e in provincia di Vicenza (Nord Italia) durante due annate di raccolta.

Anche se nella letteratura disponibile mancano metodi dettagliati sulla procedura di campionamento, possiamo ritenere che la scelta del piano adottato è stata fondamentale per l'ottenimento di questi risultati, pur venendo meno la possibilità di confrontare gli esiti connessi a tale metodologia scelta.

A tal proposito, si sostiene che il numero di frutti campionati provenienti da diversi ceraseti e alberi, costituenti le tre repliche indipendenti (pull di ciliegie) distinte per cultivar e per annata, la verifica strumentale della fase di maturazione e il confronto con campioni della stessa varietà provenienti da una zona geografica e pedoclimatica completamente differente, sono stati adeguati all'intento di valutare la rappresentatività dei dati relativi alla composizione metabolica, garantendone così l'affidabilità e la trasferibilità dei risultati ottenuti.

Difatti, i risultati congruenti, ottenuti in due stagioni diverse e anche da campioni provenienti da aree geografiche molto distanti e diverse, suggeriscono che il piano di campionamento utilizzato in questa indagine è appropriato per descrivere la composizione varietale del ciliegio dolce, e per quanto riguarda la componente fenolica è stata chiaramente dimostrata una alta specificità per ciascuna delle cultivar.

Possiamo anche affermare dai risultati ottenuti che nei frutti di ciliegia, almeno per le 20 cultivar prese in esame, il *background* genetico gioca un ruolo importante nella composizione metabolica secondaria nonostante gli effetti dovuti a fattori pedoclimatici e agronomici.

In questo lavoro, infatti, i frutti delle stesse cultivar sono risultati essere ben caratterizzati dal loro metaboloma secondario, particolarmente per la componente polifenolica, indipendentemente dalla raccolta e dalla zona geografica.

Il contenuto delle diverse classi di metaboliti in alcune varietà è veramente notevole, raggiungendo i 100mg/100g di peso fresco per le antocianine, i 55 mg per gli acidi idrossicinnamici e i 7 mg per i flavonoli.

Sandra tardiva, immediatamente seguita da Roana, si dimostra particolarmente interessante perché accumula i più alti livelli sia di antocianine che di acidi idrossicinnamici e flavonoli. La stessa Sandra, inoltre, mostra un'ottima *performance* anche nell'accumulo di procianidine e flavan-3-oli.

Cappuccia Siciliana si presenta ben atta all'accumulo di acidi idrossicinnamici e antocianine ma meno dei flavonoli.

Grace Star e Milanese, invece, sono meno abili nell'accumulo dei metaboliti identificati.

Rilevante è anche la capacità di accumulare metaboliti lungo il calendario di maturazione, in particolare, riguardo la componente degli antociani e degli acidi idrossicinnamici, dove si riscontrano valori minimi di accumulo nelle varietà precoci e massimi nelle varietà tardive. Questa attitudine potrebbe essere dovuta ad una matrice genetica che accomuna le diverse varietà per epoca di maturazione. Poiché sono limitate le conoscenze a riguardo sarebbe opportuno, in un lavoro futuro, indagare se esistono delle similarità a livello del genotipo che trovano espressione nella minore o maggiore attitudine all'accumulo di tali metaboliti.

Data l'estrema variabilità della composizione polifenolica del ciliegio dolce riportata in letteratura, il confronto dei nostri risultati è meritevole di attenzione.

Rispetto ai nostri risultati, Ballistreri et al (2013) hanno riportato il doppio della cianidina nella cultivar Black Star e la metà della cultivar Ferrovia, mentre Milinovic et al (2016) hanno rilevato metà quantità di cianidina e acidi idrossicinnamici in Kordia e Regina, mentre per Grace Star i nostri risultati erano completamente paragonabili a quelli di Ballistreri e collaboratori (2013).

Burlat (Francese) e Van sono state ampiamente studiate da molti autori (Ballistreri et al, 2013;. Goncalves et al, 2004;. Usenik et al, 2008;. Liu et al, 2011;. Gonzalez-Gomez et al, 2010;. Kelebek et al., 2011; Hayaloglu et al, 2016) e mostrano contenuti molto differenti. In Burlat il contenuto di acido 5-O-caffeoil chinico (acido neoclorogenico) indicato variava tra circa 7 e 64 mg / 100 g di peso fresco (11 mg in questa ricerca), l'acido 3-O-caffeoil chinico (acido clorogenico) tra 1 e 4 mg (2 mg in questa ricerca), l'acido cumaroil chinico tra 6 e 26 mg (1 mg in questa ricerca), cianidine da 10 a 82 mg (58 in questa ricerca); in Van, il contenuto acido 5-O-caffeoil chinico (acido neoclorogenico) variava tra 17 e 87 mg (31 mg in questa ricerca), l'acido 3-O-caffeoil chinico (acido clorogenico) tra 0,25 e 6 mg

(2 mg in questa ricerca), l'acido cumaroil chinico tra il 4 e 17 mg (3,5 mg in questa ricerca), cianidine da 14,5 a 142 mg (54 in questa ricerca).

Questa variabilità nel contenuto dei metaboliti secondari riportato in letteratura probabilmente dipende da molte ragioni. L'epoca di raccolta e l'ambiente sempre più complesso sono noti per essere in grado di influenzare la composizione dei metaboliti secondari, anche se in questa ricerca il *background* genetico di ciascuna cultivar ha mostrato il maggior influsso sul metaboloma secondario, mentre hanno influito ma in modo molto meno rilevante la raccolta e le condizioni ambientali e pedoclimatiche.

I diversi metodi di estrazione adottati in questa ricerca potrebbero aver condizionato i risultati. Poiché, per garantire una minore degradazione del metabolita, è stata operata una minima manipolazione del campione effettuando una sola fase di estrazione per i composti fenolici, ciò potrebbe aver provocato una sottostima dei metaboliti stessi e quindi giustificerebbe la diversità dei contenuti sopracitati. Anche la scelta tampone di estrazione può aver influenzato l'efficienza nell'estrazione dei metaboliti.

Alla luce di quanto esposto, ad ogni modo, questo lavoro ha dimostrato l'utilità delle tecniche di metabolomica *untargeted* nel valutare il metaboloma di ciliegia e le sue variazioni in relazione alle diverse varietà analizzate.

Lo studio dei profili metabolici dei vari campioni ottenuti mediante la tecnica HPLC-ESI-MS ha consentito di integrare le informazioni sulla natura dei metaboliti contenuti nella drupa di ciliegia.

I dati semi-quantitativi ottenuti dalla spettrometria di massa, validati mediante analisi HPLC-DAD, hanno consentito la comparazione relativa dei livelli di accumulo dei vari metaboliti identificati nei campioni delle 20 diverse cultivar saggiate.

L'interpretazione dei dati metabolomici tramite gli strumenti dell'analisi statistica multivariata ha confermato l'esistenza di forti differenze tra il corredo dei metaboliti (identificati e non) e da tale analisi è emersa la forte correlazione accumulo di metaboliti ed epoca di maturazione.

Ciò consente quindi una valutazione dell'agrobiodiversità correlata all'espressione metabolica che denota alla ciliegia l'accezione di alimento funzionale e nutraceutico.

Le ottime *performance* nell'accumulo di metaboliti dimostrate da alcune varietà locali come Sandra Tardiva, Roana e Cappuccia Siciliana può servire da monito per il recupero, la valorizzazione e la promozione delle stesse.

Poiché le quantità di metaboliti determinate sono comunque meritevoli di attenzione, in quanto alle diverse classi di polifenoli sono attribuite diverse azioni benefiche sulla salute umana, è opportuno valutare la diffusione o la promozione di una cultivar anche alla luce di questi risultati ottenuti.

In merito agli effetti che i composti polifenolici possono esercitare sulla salute ci sembra opportuno citare alcuni studi per avvalorare la valenza nutraceutica della ciliegia.

È risaputo che le **antocianine** vengano assorbite a livello intestinale e che queste raggiungerebbero nell'uomo livelli tali compatibili con le possibili attività antiaterotogena, antivirale ed antinfiammatoria (Stintzing et al., 2004; Ferrars et al., 2014). Inoltre, esse ridurrebbero la permeabilità e la fragilità dei capillari sanguigni e sembrano essere in grado di inibire l'aggregazione delle piastrine (Hui, 2006). Alle antocianine è stata anche riconosciuta la capacità di stimolare il sistema immunitario.

Tutti questi effetti sono attribuiti principalmente all'effetto antiossidante delle antocianine, ma anche alla loro capacità di legare le proteine e chelare i metalli. Un importante effetto di quest'ultima abilità è quella di prevenire l'ossidazione della vitamina C, che è notoriamente favorita in presenza di metalli liberi (Stintzing et al., 2004).

La loro quantità rilevata in alcune varietà di ciliegia, quali Sandra tardiva e Roana è veramente elevata, decisamente superiore a quella riportata nelle banche dati USDA; solamente alcuni frutti di bosco (quali mora, mirtillo, ribes nero) e alcune varietà di uva (quali la varietà Concord della specie *Vitis labrusca*) possono superare tali livelli (Wu et al., 2006). Le varietà di ciliegia più ricche di antocianine possono quindi essere considerate fra le fonti alimentari più ricche di questo tipo di sostanza.

Alcune varietà di ciliegie si sono presentate anche come ottime fonti di **acidi idrossicinnamici** (fino a 40mg/100g di peso fresco) e flavonoli (fino a 7 mg/100 g di peso fresco). Per quanto riguarda gli acidi idrossicinnamici (=HCA), diversi studi epidemiologici suggeriscono benefici per la salute umana derivanti da un elevato apporto alimentare di HCA. Questi, infatti, sono considerati dei forti antiossidanti (Kroon and Williamson, 1999; Germanò et al., 2006) e vengono segnalati anche come aventi attività antiallergenica, antimicrobica e immuno-modulatoria (El-Seedi et al., 2012). Oltre a queste, diversi autori hanno riportato che gli HCA, in particolare l'acido clorogenico, proteggono, *in vitro*, le lipoproteine a bassa densità (LDL) dalle modificazioni ossidative, riducendo,

potenzialmente, il rischio di aterosclerosi (Nardini et al., 1995). L'acido clorogenico, inoltre, è stato riportato come agente potenzialmente in grado di prevenire l'insorgenza di diversi tipi di cancro alla lingua (Tanaka et al., 1993; Kasai et al., 2000), al fegato e al colon in diversi modelli animali (Zhou et al., 1993; Mori et al., 1986; Tanaka et al., 1990). Gli HCA sarebbero in grado di regolare la composizione della microflora batterica dell'intestino (Parkar et al., 2008). Infine, la somministrazione orale di HCA (250 o 500 µg per 100 g di peso corporeo) si è mostrata in grado di causare un significativo aumento del contenuto di calcio nell'osso corticale e nell'osso trabecolare di topi *in vivo* (Yamaguchi et al., 2008). Nell'accumulo di tali metaboliti hanno dimostrato un'ottima *performance* Sandra Tardiva e Cappuccia Siciliana confermando la già citata qualità nutrizionale.

Per quanto riguarda i **flavonoli**, si consideri che questi vengono considerati importanti per la salute umana grazie alla loro forte attività antiossidante, pienamente dimostrata *in vitro* (Yao et al., 2004; Galati et al., 2003; Nijveldt et al., 2001). Un altro importante effetto viene espletato sul sistema vascolare: i flavonoidi infatti inibiscono l'ossidazione radicalica delle lipoproteine a bassa densità e contrastando l'insorgenza dell'arteriosclerosi (Harrison et al., 2008; Hergot et al., 1997; Bucki et al., 2003). Diversi studi clinici hanno infatti dimostrato che l'assunzione di flavonoidi è in grado di prevenire le malattie cardiache (Yao et al., 2004; Sesso et al., 2003; Geleijnse et al., 2002; Yochum et al., 1999). Gli stessi flavonoidi sarebbero anche in grado di inibire l'aggregazione piastrinica e ciò potrebbe quindi contrastare la produzione di coaguli sanguigni, ricorrenti cause di occlusioni coronariche o cerebrali predisponenti all'insorgenza di infarti e ictus (Hubbar et al., 2003; Knekt et al., 2002).

Alcuni flavonoidi come la quercetina (gruppo dei flavonoli) possiedono anche attività antinfiammatoria: essi agiscono inibendo il rilascio dei mediatori molecolari dell'infiammazione (Nijveldt et al., 2001; Harrison et al., 2008).

L'attività antitumorale dei flavonoidi è ancora una questione dibattuta. Studi epidemiologici hanno comunque dimostrato che una dieta ricca di flavonoidi e antiossidanti è in grado di ridurre il rischio di sviluppare diversi tipi di cancro (Knekt et al., 2002; Kumar et al., 2013). Il consumo di cipolle e/o mele, ritenute le due principali fonti alimentari di quercetina (gruppo dei flavonoli), è inversamente associato all'incidenza del cancro alla prostata, polmone, stomaco, intestino e seno (Kumar et al., 2013).

L'attività antivirale di alcuni flavonoidi è nota sin dal 1940, per esempio il canferolo e luteolina (gruppo dei flavoni) avrebbero un effetto sinergico contro il virus dell'herpes simplex. La quercetina sarebbe attiva contro il virus dengue, la rutina contro il virus della parainfluenza e dell'influenza. Il meccanismo di azione proposto per l'attività antivirale dei flavonoidi dipenderebbe dalla loro capacità di inibire le polimerasi virali e legare gli acidi nucleici o le proteine dei capsidi di questi virus (Kumar et al., 2013).

Se si considera che la cipolla cruda e la mela, fra le fonti più ricche di flavonoli, accumulano rispettivamente 26 mg/100g di peso fresco e 4 mg/100g di peso fresco (banca dati USDA) ne consegue che, con i 7 mg/100g di peso fresco, alcune varietà di ciliegie sono ottime fonti di flavonoli.

Alla luce di quanto discusso è evidente come questo lavoro sia rappresentato una prima indagine nel decifrare il *network* di interazioni che interessa il metaboloma, pertanto, data l'importanza nutrizionale della ciliegia si ritiene necessario l'approfondimento della tematica integrandola con diversi approcci al fine di valorizzare varietà che si prestano ad essere considerate alimenti funzionali con valenza altamente nutraceutica.

6. BIBLIOGRAFIA

- Andrivon D., 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*, 45, 1027-1035.
- AA. VV., 1973. Indagine sulle cultivar di ciliegio diffuse in Italia.
- Albertini, A., e Della Strada, G., 1996. Monografia di cultivar di ciliegio dolce.
- Altieri, M. A., Merrick, L., 1987. In situ conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems. *Economic Botany*, 41(1), 86-96.
- Amrani Joutei, K., 1993. Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin. Etude de leur extractibilité (Doctoral dissertation).
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., & Rapisarda, P., 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food chemistry*, 140(4), 630-638.
- Barbera G., 2001. L'erosione e la salvaguardia della biodiversità. Atti del seminario IAED La biodiversità nei paesaggi agrari e forestali, Palermo Pantelleria, 31 maggio 2 giugno 2001, pp 7-19
- Bellon, M. R., 1996. The dynamics of crop infraspecific diversity: a conceptual framework at farmer level. *Economic Botany* 50:26-39
- Bellon, M. R., & Taylor, J. E., 1993. "Folk" Soil Taxonomy and the Partial Adoption of New Seed Varieties. *Economic Development and Cultural Change*, 41(4), 763-786.
- Biodiversità". Roma, Villa Celimontana, 8 aprile 2010 Pignatti S. (a cura di) – 2000.
- Brush, S.B., 1991. A farmer-based approach to conserving crop germoplasm. *Economic Botany* 45: 153-65.
- Bucki, R., Pastore, J. J., Giraud, F., Sulpice, J. C., & Janmey, P. A., 2003. Flavonoid inhibition of platelet procoagulant activity and phosphoinositide synthesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(8), 1820-1828.
- Cabrini L, Barzanti V, Cipollone M, Fiorentini D, Grossi G, Tolomelli B, Zambonin L, Landi L., 2001 Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *J Agric Food Chem*;49:6026-32.
- Crescimanno F.G, Sottile F., 2003. Il recente sviluppo dell'ortoflorofruitticoltura italiana - *Italus Hortus* Vol.10 suppl. al n° 1

- DAMIGELLA, P., & FATTA, D. B. G., 1973. Indagine sulle cultivar di ciliegio in Italia (Sicilia).
- De la Torre-Carbot, Karina, et al., 2005. "Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS." *Journal of agricultural and food chemistry* 53.11: 4331-4340.
- De Salvador F.R., Engel P., Fideghelli C., 2011. La collezione di ciliegio presso il Centro Nazionale di Germoplasma Frutticolo del CRA-FRU di Roma: caratterizzazione, ricerca e valorizzazione di varietà autoctone. Convegno nazionale del ciliegio. Vignola(Mo).
- Dettmer, Katja, Pavel A. Aronov, and Bruce D. Hammock., 2007. "Mass spectrometry-based metabolomics." *Mass spectrometry reviews* 26.1: 51-78.
- Ecologia vegetale UTET
- El-Seedi, H. R., El-Said, A. M., Khalifa, S. A., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., & Verpoorte, R., 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 10877-10895.
- FAO, 1996 *The State of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. FAO, Rome, Italy.
- Fideghelli C., Engel P., 2011. L'attività di raccolta, caratterizzazione, valorizzazione e conservazione della biodiversità vegetale di interesse agricolo in Italia con particolare riguardo alle risorse genetiche frutticole. *Review n.15. Italus Hortus* 18 (3), 33-45.
- Galati, E. M., Mondello, M. R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S., & Taviano, M. F., 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4903-4908.
- Geleijnse, J. M., Launer, L. J., van der Kuip, D. A., Hofman, A., & Witteman, J. C., 2002. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *The American journal of clinical nutrition*, 75(5), 880-886.
- Germano, M. P., d'Angelo, V., Biasini, T., Sanogo, R., De Pasquale, R., & Catania, S., 2006. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *Journal of ethnopharmacology*, 105(3), 368-373.
- Goidànich G, 1994. *Manuale di Patologia Vegetale*. Vol 2. Ed. Agr. Bologna

- Gonçalves, B., Landbo, A. K., Knudsen, D., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., & Meyer, A. S., 2004. Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 523-530.
- González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, M. F., Bernalte, M. J., Ayuso, M. C., & Rodríguez, A. B., 2010. Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 533-539.
- Hammer, K., 1991. Checklists and germplasm collecting. *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter*, 85, 15-17.
- Hammer, K., 1999. *Seeds from the past: a catalogue of crop germplasm in Central and North Italy*. Instituto del Germoplasma del Consiglio Nazionale delle Ricerche.
- Harrison, A. P., & Cooper, R. G., 2008. Quercetin: health benefits with relevance to TNF-alpha-linked inflammatory diseases. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2(2).
- Hayaloglu, A. A., & Demir, N., 2016. Phenolic Compounds, Volatiles, and Sensory Characteristics of Twelve Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars Grown in Turkey. *Journal of food science*, 81(1), C7-C18.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., & Kromhout, D., 1997. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet*, 349(9053), 699.
- Hubbard, G. P., Wolfram, S., Lovegrove, J. A., & Gibbins, J. M., 2003. The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(02), 469-478.
- Hui Y. H., 2006, *Handbook of fruits and fruit processing*. Blackwell Publishing.
- Joannsen W.L., 1926 . *Elemente der exacten Erblichkeitslehre*. G. Fischer, Jena.
- Kasai, H., Fukada, S., Yamaizumi, Z., Sugie, S., & Mori, H., 2000. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology*, 38(5), 467-471.
- Kelebek, H., & Selli, S., 2011. Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2530-2537.

- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., ... & Aromaa, A., 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 76(3), 560-568.
- Kroon, P. A., & Williamson, G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 355-361.
- Kumar, S., & Pandey, A. K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Lempereur I, Rouau X, Abecassis J., 1997. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *J Cereal Sci*;25:103-10.
- Liland, K. H., 2011. Multivariate methods in metabolomics—from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), 827-841.
- Liu, Y., Liu, X., Zhong, F., Tian, R., Zhang, K., Zhang, X., & Li, T., 2011. Comparative study of phenolic compounds and antioxidant activity in different species of cherries. *Journal of food science*, 76(4), C633-C638.
- M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, et al. "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." *Ann Ist Super Sanità*, 2007.43 (4): 348-61.
- Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J. , 1990. *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- McMurry, John.. 2004. *Chimica organica*. Piccin.
- Milinović, B., Dragović-Uzelac, V., Kazija, D. H., Jelačić, T., Vujević, P., Čiček, D., ... & Čmelik, Z., 2016. Influence of four different dwarfing rootstocks on phenolic acids and anthocyanin composition of sweet cherry (*Prunus avium* L) cvs' Kordia'and'Regina'. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89.
- Mori, H., Tanaka, T., Shima, H., Kuniyasu, T., & Takahashi, M., 1986. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer letters*, 30(1), 49-54.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nabhan, G. P., 1985. Native crop diversity in Aridoamerica: conservation of regional gene pools. *Economic Botany*, 39(4), 387-399.

- Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., & Scaccini, C., 1995. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5), 541-552.
- Nazioni Unite, 1992 "Convention on biological diversity" – Rio de Janeiro, 5 June
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Norse, E. A. R., Wilcove, K. L., Wilcox, D. S., Norse, B. A. E. A., & Rosenbaum, K. L., 1986. Conserving biological diversity in our national forests (No. 333.7516 C6).
- Oldfield, M.L. and J.B Alcorn., 1987. Conservation of traditional agroecosystems. *Bioscience* 37:199-208.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., & Skinner, M. A., 2008. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International journal of food microbiology*, 124(3), 295-298.
- Piccini C. – 2010. La Biodiversità in Italia: stato, minacce, risposte. Il contributo dell'Annuario dei dati ambientali ISPRA. Seminario "Per una cultura della Biodiversità".
- Ribéreau-Gayon, P., et al. , 2007. Trattato di enologia: Chimica del vino Stabilizzazione Trattamenti. Bologna: Edagricole.
- Ricciardi L., Filippetti A., 2000. L'erosione genetica di specie agrarie in ambito mediterraneo: rilevanza del problema e strategie d'intervento. *Cahiers Options Méditerranéennes*, vol.53.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Ringnér, M., 2008. What is principal component analysis?. *Nature biotechnology*, 26(3), 303-304.
- Scalbert, A. e Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Scarascia Mugnozza G.T., 1974. Le risorse genetiche vegetali. Principi, realtà, problemi. *Giornale Botanico italiano*, Vol.108- 5, 247-257.

- Scarascia Mugnozza G.T., Swaminathan M.S., 1997. Conservazione della biodiversità. Riv. Agricoltura, n.280 gen-feb.
- Sesso, H. D., Gaziano, J. M., Liu, S., & Buring, J. E., 2003. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1400-1408.
- Shahidi F, Naczk M., 1995. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster: Technomic Publishing Co Inc.
- Silberberg, M. S., 2004. *Chimica: la natura molecolare della materia e delle sue trasformazioni*. McGraw-Hill.
- Sosulski F, Krygier K, Hogge L., 1982. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *J Agric Food Chem*;30:337-40.
- Stintzing, F. C., & Carle, R., 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15(1), 19-38. Ferrars, R. M.; Czank, C.; Zhang, Q.; Botting, N. P.; Kroon, P.A.; Cassidy, A.; Kay, C.D., 2014, *Br.J.Pharmacol.*, 171:3268-3282.
- Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., & Mori, H., 1993. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*, 14(7), 1321-1325.
- Tanaka, T., Nishikawa, A., Shima, H., Sugie, S., Shinoda, T., Yoshimi, N., ... & Mori, H., 1990. Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyprenonic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II* (pp. 429-440). Springer US.
- Taylor, P. J. (2005). Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry*, 38(4), 328-334.
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN., 2000. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *J Sci Food Agric*;80:1024-32.
- Usenik, V., Fabčič, J., & Štampar, F., 2008. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 185-192.
- Villas-Boas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., & Nielsen, J., 2005. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev*, 24, 613-646.

- Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L., Fogliano V., 2007. Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. *J Nutr*;137:2043-8.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L., 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4069-4075.
- Yamaguchi, M., Lai, Y. L., Uchiyama, S., & Nakagawa, T., 2008. Oral administration of phytochemical p-hydroxycinnamic acid prevents bone loss in ovariectomized rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 311(1-2), 31-36.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., SHI, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S., 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59(3), 113-122.
- Yochum, L., Kushi, L. H., Meyer, K., & Folsom, A. R., 1999. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 149(10), 943-949.
- ZHOU, J., ASHOORI, F., SUZUKI, S., NISHIGAKI, I., & YAGI, K., 1993. Protective effect of chlorogenic acid on lipid peroxidation induced in the liver of rats by carbon tetrachloride or 60 Co-irradiation. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 15(2), 119-125.
- Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E., 2012. *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press on Demand.

http://annuario.isprambiente.it/data/T04/4832/Ver_11/Figura_6_SP_VEG_ADA2013.JPG

<http://mzmine.sourceforge.net/>

<http://plantgest.imagelinenetwork.com/varietata.cfm>

<http://win.lafrecciaverde.it/n124/sagra-ciliegie/art.html>

<http://www.faostat.org>

<http://www.istat.it>

https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Stone%20Fruit%20Annual_Madrid_EU-28_8-21-2015.pdf

www.chromedia.org

www.chromedia.org

www.hindawi.com

www.jaaos.com

www.massbank.jp

www.meristemi.wordpress.com

www.uni.bremen.de

www.venetoagricoltura.org

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	2
PREMESSA.....	3
1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 IL VALORE DELLA BIODIVERSITA'	4
1.1.1 L'erosione genetica.....	8
1.1.2 Conservazione delle risorse fitogenetiche.....	11
1.1.3 La biodiversità nella regione mediterranea.....	14
1.2 IL CILIEGIO.....	19
1.2.1 Origine della specie.....	19
1.2.2 La produzione di ciliegie nel mondo, in Europa e in Italia.....	21
1.2.3 La cerasicoltura in Veneto e in Sicilia.....	24
1.2.4 Il ciliegio: interesse economico.....	27
1.2.5 Miglioramento genetico e panorama varietale.....	29
1.3 LA METABOLOMICA E LO STUDIO DEL METABOLOMA.....	36
1.3.1 La metabolomica.....	36
1.3.2 I metaboliti secondari: i polifenoli.....	37
1.3.2.1 Acidi fenolici.....	38
1.3.2.2 Flavonoidi.....	40
1.3.3 Tecniche adottate per l'indagine metabolomica.....	44
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	48
3. MATERIALI E METODI.....	49
3.1 Materiale vegetale, campionamento e l'analisi della qualità della frutta.....	49
3.2 Preparazione delle polveri.....	52
3.3 Preparazione degli estratti metanolici per analisi HPLC-DAD e HPLC-ESI –MS..	52
3.4 Analisi HPLC–DAD.....	53
3.5 Analisi HPLC–ESI-MS <i>Untargeted</i>	54

3.6	Elaborazione ed interpretazione dei dati.....	55
3.6.1	Identificazione delle molecole rilevate nei campioni.....	55
3.6.2	Elaborazione dei cromatogrammi HPLC-ESI-MS mediante MZmine.....	56
3.6.3	Analisi statistica multivariata.....	56
4.	RISULTATI.....	58
4.1	Analisi dei dati qualitativi riferiti a contenuto zuccherino e pH.....	58
4.2	Profilo dei campioni	61
4.3	Analisi quantitativa mediante HPLC-DAD.....	64
4.4	Comparazione dei metabolomi mediante HPLC-ESI-MS	67
4.5	Validazione dei dati HPLC-ESI-MS mediante tecnica HPLC-DAD.....	69
4.6	Interpretazione dei dati mediante analisi statistica multivariata.....	71
5.	DISCUSSIONE.....	88
6.	BIBLIOGRAFIA.....	94