

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA ONLUS

SEZIONI REGIONALI

E

GRUPPI DI INTERESSE SCIENTIFICO

E TECNICO OPERATIVO

## **Contributi scientifici**

SEZIONE PUGLIESE

Riunione Scientifica Annuale

Lecce, 31 Gennaio 2014



## *Nephrolepis cordifolia*: molto più di una pianta ornamentale...

G.L. BRUNO, L. D'AQUINO, C. FASCIANO, M.A. ZICARI, F. TOMMASI

**ABSTRACT** - *Nephrolepis cordifolia*: much more than an ornamental plant... - *Nephrolepis cordifolia* (L.) C.Presl is an ornamental plant diffused worldwide and displaying a certain degree of resistance to common plant pests and pathogens. The knowledge of its physiological and metabolic aspects are still scarce. This work contributes to characterize the tubers of this fern in terms of chemical composition, proliferative and regenerative attitude, and association to fungal endophytes. The results indicate that tubers are able to store mainly water, starch, fructose, glucose and sucrose. In vitro propagation tests allowed the differentiation of calli and buds from root fragments, but not from tubers. Isolation on selective media revealed the presence of *Trichoderma harzianum* Rifai as an endophyte in tubers and roots.

*Key words*: endophytes, ferns, in vitro propagation, *Trichoderma harzianum*

### INTRODUZIONE

*Nephrolepis cordifolia* (L.) C.Presl, conosciuta come Felce di Boston, felce a spada o felce a spina pesce, è una felce terrestre o epifita di origine tropicale ampiamente diffusa come pianta ornamentale. Nel suo stadio sporofitico *N. cordifolia* forma corti fusti eretti da cui si dipartono ciuffi di foglie allungate composte da numerose pinne, con rachidi ricoperti di squame alla base, nonché stoloni ricoperti di squame, a decorso epi ed ipogeo, da cui possono svilupparsi nuove piante (HOVENKAMP, MIYAMOTO, 2005). *N. cordifolia* possiede organi sotterranei di forma rotondeggiante, spesso definiti tuberi, che si sviluppano soprattutto nella coltura in vaso. La funzione di questi organi appare ancora incerta, essendo talora considerati come organi deputati alla moltiplicazione vegetativa, sebbene la funzione di riserva di acqua sia stata proposta da HARSHBERGER (1908). In Italia *N. cordifolia* è stata rilevata solo occasionalmente in popolazioni al di fuori di ambienti strettamente antropici su suoli contaminati, sui quali la pianta manifestava i maggiori livelli di accumulo di piombo rispetto ad altre felci terrestri spontanee (CORNARA *et al.*, 2007). MARCHETTI (1997, 2003) ne ha segnalato un inizio di naturalizzazione su *Phoenix canariensis*. La pianta presenta rusticità nella coltivazione, resistenza al depletamento nutrizionale, a patogeni e fitofagi (PATRA, BERA, 2007). Alcuni studi riportano la produzione di sostanze ad azione antimicrobica da parte delle fronde (BASILE *et al.*, 1997), la capacità di accumulare piombo ed alluminio e quella di stabilizzare i suoli (CORNARA *et al.*, 2007; KASHENKO *et al.*, 2007; OLIVARES *et al.* 2009). Recentemente è stata

riportata la sua tolleranza a metalli di transizione quali lantanio e cerio (FASCIANO *et al.*, 2011). Scopo del presente lavoro è stato studiare la composizione dei tuberi, valutare la capacità proliferativa e rigenerativa di tuberi e radici ed indagarne l'associazione ad endofiti fungini.

### MATERIALI E METODI

**Materiale vegetale.** Tuberi e radici sono stati prelevati da piante di *N. cordifolia* coltivate in vaso presso l'Orto Botanico dell'Università degli Studi di Bari Aldo Moro.

**Caratterizzazione chimica dei tuberi.** Il contenuto relativo d'acqua (RWC) è stato calcolato usando la formula:  $RWC = [(F_w - D_w) / F_w] \times 100$ ; dove  $F_w$  è il peso fresco e  $D_w$  il peso secco.  $D_w$  è stato determinato in stufa a 90 °C. Il contenuto in amido, glucosio, fruttosio e saccarosio è stato determinato con il kit Megazyme© International Ireland Limited. Per la determinazione di acido ascorbico e glutatione è stato seguito il metodo descritto in ZHANG, KIRKHAM (1996). I risultati sono stati espressi in percentuale come media  $\pm$  DS.

**Ottenimento di piantine micropropagate.** Sono stati utilizzati due terreni di coltura (pH 5,6) distribuiti in matracchi da 250 ml (50 ml per matraccio): MS base (MURASHIGE, SKOOG, 1962) e MSIB ottenuto aggiungendo al substrato MS base acido indole-3-acetico (0,4 mg·l<sup>-1</sup>) e 6-benzilamminoadenina (0,2 mg·l<sup>-1</sup>). Come agente gelificante è stato utilizzato agar all'1%. Tuberi e radici, lavati in acqua corrente per 20 minuti, sono stati sterilizzati per immersione

per 20 secondi in alcool etilico al 70% e per 5 minuti in una soluzione acquosa di ipoclorito di sodio al 10% di cloro attivo, quindi lavati per 4 volte con acqua distillata sterile ed asciugati tra fogli di carta da filtro sterile. Frammenti di  $0,5 \pm 0,8 \text{ cm}^3$  di tuberi e porzioni di  $5 \pm 6 \text{ mm}$  di radici sono stati impiantati sui due substrati ed incubati a  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  con fotoperiodo di 16 ore ottenuto con lampade *Osrsm 36 W* (irradiazione  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

*Isolamento ed identificazione di endofiti fungini.* Il materiale vegetale raccolto è stato lavato per 20 minuti in acqua corrente, per eliminare le particelle di terreno aderenti alla superficie, ed immerso per 10 minuti in etanolo al 90% per devitalizzare eventuali microorganismi ancora presenti in superficie dopo il lavaggio, quindi il materiale è stato sciacquato 3 volte con acqua distillata sterile ed asciugato tra due fogli di carta da filtro sterile. Frammenti di dimensioni di  $0,5 \pm 0,8 \text{ cm}^3$  sono stati escissi e sono stati trasferiti in piastre Petri (5 per piastra, 5 ripetizioni per tipologia di tessuto) contenenti Agar-Acqua (AA) 2%, Patate-Destrosio-Agar (PDA), Estratto di Malto Agar (AM) 2% ed il substrato proposto da MARTIN (1950) per l'isolamento di *Trichoderma* spp. (RBSA) e posti a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  al buio. Le colonie ottenute dopo 7-10 giorni di incubazione sono state trasferite in piastre Petri contenenti PDA e poste ad incubare al buio a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Per ciascuna delle entità isolate, la frequenza di isolamento (FI) è stata calcolata con la formula:  $FI = 100 \times N_i / N_t$ , in cui  $N_i$  rappresenta il numero delle colonie fungine originate dai frammenti ed  $N_t$  è il numero totale di frammenti seminati. L'identificazione delle specie fungine è stata eseguita sulla base dei criteri classici macro e microscopici (BARNETT, HUNTER, 1998). L'esperimento è stato ripetuto più volte nel corso di tre anni e su piante di diversa provenienza. Per ciascun substrato i dati sono stati espressi in percentuale come media  $\pm$  deviazione standard (DS).

La presenza di funghi è stata accertata nel terreno di coltivazione seguendo il metodo delle diluizioni decimali e successiva semina in piastra (BENSON, 1984) su substrato RBSA.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

*Caratterizzazione dei tuberi.* La composizione dei tuberi di *N. cordifolia* è riportata in Tab. 1. I risultati delle analisi biochimiche mostrano che i tuberi sono ricchi di acqua, amido e sostanze di riserva solubili come glucosio, fruttosio e saccarosio. Il fruttosio è lo zucchero riscontrato in quantità maggiore. L'analisi delle due molecole antiossidanti idrosolubili mostra che l'ascorbato è presente in quantità sei volte superiori al glutatione.

*Ottenimento di piantine micropagate.* Dopo circa 50 giorni dall'impianto alla base dei frammenti di radici si sono sviluppati germogli e callo, e radici dopo 80 giorni. La percentuale di espianati che hanno formato germogli e callo sui substrati impiegati è riportata in Tab. 2

Dai tuberi non si sono ottenuti né calli né germogli.

TABELLA 1

*Composizione chimica dei tuberi di N. cordifolia.*  
*Chemical composition of N. cordifolia tubers.*

Componente	Contenuto (%)
Acqua	92,45 $\pm$ 1,20
Amido	3,80 $\pm$ 0,20
Fruttosio	1,64 $\pm$ 0,07
Glucosio	0,92 $\pm$ 0,05
Saccarosio	0,76 $\pm$ 0,05
Ascorbato totale	0,55 $\pm$ 0,02
Glutazione totale	0,09 $\pm$ 0,01

TABELLA 2

*Percentuale di espianati che hanno formato germogli e callo su substrato MSbase o MSIB.*

*Percentage of explants that produce shoot and calli on MSbase or MSIB media.*

Mezzo	Espianto	Germogli	Calli
MS base	Tuberi	0	0
MSIB	Tuberi	0	0
MS base	Radici	16 $\pm$ 2	50 $\pm$ 5
MSIB	Radici	50 $\pm$ 3	99 $\pm$ 1

*Isolamento ed identificazione di endofiti fungini.* Le colonie sviluppatesi dagli espianati ottenuti da tuberi o radici, trasferite su PDA, mostravano micelio aereo inizialmente ialino che assumeva aspetto fiocoso e formava anelli concentrici di colore verde. Le osservazioni al microscopio ottico hanno evidenziato ife conidiofore ramificate, fialidi ialine ampolliformi e conidi verdi, unicellulari, globosi o subglobosi di dimensioni  $2,8 \pm 0,3 \times 2,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Tali caratteri coincidono con quelli riportati in letteratura come tipici per *Trichoderma harzianum* Rifai (Tab. 3).

TABELLA 3

*FI (%) di T. harzianum dai tessuti di N. cordifolia su substrati diversi.*

*T. harzianum isolation frequencies (%) from N. cordifolia tissues on different media.*

Organo	AA	PDA	RBSA	AM
Tuberi	87 $\pm$ 6	90 $\pm$ 12	97 $\pm$ 3	93 $\pm$ 5
Radici	33 $\pm$ 7	85 $\pm$ 7	95 $\pm$ 3	88 $\pm$ 11

Le analisi microbiologiche effettuate sul terreno hanno consentito di isolare 8 colonie per grammo di terreno utilizzato delle quali nessuna ha mostrato caratteristiche simili a quelle di *Trichoderma* spp. Questi risultati indicano che funghi del genere *Trichoderma* non sono presenti nel substrato di coltivazione delle piante utilizzate in queste prove e quindi che l'isolamento di tali funghi dagli organi ipogei di *N. cordifolia* non dipendono da contaminazioni degli stessi. Analisi analoghe effettuate su tuberi pro-

venienti da piante di diversa origine hanno confermato questi risultati (dati non mostrati).

In conclusione i dati ottenuti indicano che i tuberi sono principalmente organi di riserva, per lo più di acqua e carboidrati, coerentemente con quanto ipotizzato da HARSHBERGER (1908). Essi manifestano scarsa capacità di proliferazione cellulare ed ospitano microorganismi fungini associati. Relazioni fra felci e endofiti sono state più volte descritte (FORNI *et al.*, 1991). La presenza di *Trichoderma*, finora mai descritta in felci, potrebbe contribuire a spiegare la resistenza di *N. cordifolia* a patogeni tellurici, attacchi dei quali, peraltro, non risultano segnalati in letteratura. È noto, infatti, che specie di *Trichoderma* sono in grado di indurre nelle piante resistenza a stress biotici ed abiotici, e sono anche utilizzate come agenti di lotta biologica per la prevenzione da attacchi di *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Verticillium dahliae* Kleb., *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris, *Phytophthora capsici* Leonian e *Botrytis cinerea* Pers. Ulteriori studi sono necessari per valutare il ruolo fisiologico di *Trichoderma* in *N. cordifolia*, la frequenza della sua associazione ad organi ipogei di piante di diversa provenienza e l'eventuale ruolo nella risposta della felce a stress.

#### LETTERATURA CITATA

- BARNETT H.L., HUNTER B.B., 1998 – *Illustrated genera of imperfect fungi (4th ed)*. APS Press - St. Paul.
- BASILE A., SPAGNUOLO V., GIORDANO S., SORRENTINO C., LAVITOLA A., CASTALDO-COBIANCHI R., 1997 – *Induction of antibiotic activity by  $\alpha$ -D-oligogalacturonides in Nephrolepis sp. (Pteridophyta)*. Int. J. Antimicrob. Ag., 8: 131-134.
- BENSON D.M., 1984 – *Improved enumeration of Trichoderma spp. on dilution plates of selective media containing a nonionic surfactant*. Can. J. Microbiol., 30(9): 1193-1195.
- CORNARA L., ROCCOTTIELLO E., MINGANTI V., DRAVA G., DE PELLEGRINI R., MARIOTTI M.G., 2007 – *Level of trace elements in Pteridophytes growing on serpentine and metalliferous soils*. J. Plant Nutr. Soil Sc., 170: 781-787.
- FASCIANO C., IPPOLITO M.P., D'AQUINO L., TOMMASI F., 2011 – *Effetto dei Lantanidi sui sistemi antiossidanti in Nephrolepis cordifolia (L.) C.Presl*. Inform. Bot. Ital., 43 (suppl. 1): 28-29.
- FORNI C., TELOR E., BAR E., GRILLICOIDA M., 1991 – *Effect of antibiotic treatments on Azolla anabaena and Artrobacter*. Plant Soil, 137: 151-155.
- HARSHBERGER J.W., 1908 – *The water-storing tubers of plants*. Bul. Torrey Bot. Club, 35: 271-276.
- HOVENKAMP P.H., MIYAMOTO F., 2005 – *A conspectus of the native and naturalized species of Nephrolepis (Nephrolepiadaceae) in the world*. Blumea, 50: 279-322.
- KACHENKO A.G., SINGH B., BHATIA N.P., 2007 – *Heavy metal tolerance in common fern species*. Aust. J. Bot., 55: 63-73.
- MARCHETTI D., 1997 – *Nephrolepis cordifolia C.Presl (Nephrolepiadaceae, Pteridophyta) "naturalizzata" nella Toscana Nord-Occidentale*. Ann. Mus. civ. Rovereto Sez. Arch., St., Sc. Nat., 13: 163-167.
- , 2003 – *Le pteridofite d'Italia*. Ann. Mus. civ. Rovereto Sez.: Arch., St., Sc. Nat., 19: 71-231.
- MARTIN J.P., 1950 – *Use of Acid Rose Bengal and Streptomycin in the Plate Method for Estimating Soil Fungi*. Soil Sci., 52: 29-40.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 – *A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plantarum, 15: 473-497.
- OLIVARES E., PEÑA E., MARCANO E., MOSTACERO J., AGUIAR G., BENÍTEZ M., RENGIFO E., 2009 – *Aluminium accumulation and its relationship with mineral plant nutrients in 12 pteridophytes from Venezuela*. Environ. Exp. Bot., 65: 132-141.
- PATRA B., BERA S., 2007 – *Herbivore Damage to Ferns by a Chrysomelid Beetle from Lower Gangetic Plains of West Bengala, India*. Amer. Fern. J., 97: 19-29.
- ZHANG J., KIRKHAM B., 1996 – *Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings*. New Phytol., 132: 361-373.

RIASSUNTO - *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl., è una specie ornamentale resistente agli stress e ai più comuni agenti di malattie. Le conoscenze riguardanti soprattutto gli aspetti fisiologici e metabolici sono ancora molto scarse. La presente nota riporta dati riguardanti la composizione chimica e la presenza di endofiti fungini negli organi ipogei di questa specie ed i risultati di prove di coltura *in vitro* di espianti di organi ipogei. I dati ottenuti dimostrano che i tuberi sono principalmente organi di riserva di acqua. Le prove di propagazione *in vitro* hanno permesso l'ottenimento di germogli e callo da frammenti di radici, ma non da tuberi. Gli isolamenti su substrati selettivi hanno evidenziato la presenza di *Trichoderma harzianum* Rifai come endofita di tuberi e radici.

#### AUTORI

Giovanni Luigi Bruno ([giovanniluigi.bruno@uniba.it](mailto:giovanniluigi.bruno@uniba.it)), Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.), Sezione di Patologia vegetale, Università di Bari "Aldo Moro", Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari  
Luigi d'Aquino ([luigi.daquino@enea.it](mailto:luigi.daquino@enea.it)), ENEA, Centro di Ricerche di Portici, Piazzale E. Fermi 1, 80055 Portici (Napoli)  
Cristina Fasciano, Maria Alessandra Zicari, Franca Tommasi ([franca.tommasi@uniba.it](mailto:franca.tommasi@uniba.it)), Dipartimento di Biologia, Università di Bari "Aldo Moro", Via Orabona 4, 70125 Bari

## Caratterizzazione di polifenoli ed attività antiossidante (ORAC) in ciliegie di cultivar pugliesi

C. ALBANO, A. MONTEFUSCO, F. BLANDO

**ABSTRACT** - *Characterization of polyphenols and antioxidant activity (ORAC) in cherry cultivars of Apulia* - Extracts of sweet cherries (*Prunus avium* L.) grown in a suitable area of cherry cultivation of Apulia (the south-east area around Bari) were characterized. High-performance liquid chromatographic methods were used to identify and quantify phenolics. A total of five phenolic compounds were characterised as hydroxycinnamic acid derivatives (neochlorogenic acid, *p*-coumaroylquinic acid and chlorogenic acid) and anthocyanins (cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside). The total anthocyanin content ranged from 0.17 to 8.43 mg keracyanin equivalents/g dry weight. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay indicated that fruits of indigenous and rare genotypes possessed considerable antioxidant activity. The results of these studies can allow to identify genotypes with good antioxidant capacity, in order to enhance the cherry production in Apulia through breeding for improved nutraceutical characteristics.

*Key words:* anthocyanins, antioxidant activity, ORAC, phenolic compounds, sweet cherry (*Prunus avium* L.)

### INTRODUZIONE

Le ciliegie (*Prunus avium* L.) sono frutti molto apprezzati dal consumatore per la loro precocità, facendo la loro apparizione sul mercato in un periodo dell'anno come primo frutto primaverile (o quasi, se si esclude la fragola), ed inoltre sono apprezzate e ricercate per le loro caratteristiche organolettiche. Da un punto di vista nutrizionale e salutistico, la ciliegia è un frutto prezioso per la ricchezza non solo di sali minerali, vitamine e carotenoidi ma, soprattutto, per la presenza di polifenoli (FERRETTI *et al.*, 2010). Per il loro contenuto in sostanze bioattive, hanno proprietà antiossidanti, per cui contribuiscono, insieme ad altri fattori, alla prevenzione di malattie coronariche e cancro (WANG, MAZZA, 2002; TSUDA, 2008; KRIKORIAN *et al.*, 2010). La Puglia rappresenta il principale bacino italiano di produzione delle ciliegie con una produzione che in totale supera il 40% di tutte le ciliegie prodotte a livello nazionale. La cerasicoltura pugliese è quasi esclusivamente concentrata in due zone della provincia di Bari: la prima nel sud-est barese (Conversano, Turi, Sammichele, Acquaviva, Putignano) e la seconda nel nord-barese (Bisceglie, Trani, Corato, Ruvo, Terlizzi). Molte sono le cultivar internazionali coltivate, come 'Bigarreau Burlat', 'Lapins', 'Giorgia', ma il 50% delle cultivar sono genotipi locali, come 'Ferrovia' ed altre varietà autoctone. Lo scopo di questo lavoro è stato quello

di condurre una caratterizzazione chimica e biochimica di cultivar di ciliegio autoctone pugliesi, alcune delle quali rare. La caratterizzazione a livello chimico ha riguardato principalmente le antocianine e gli acidi fenolici. Inoltre è stata studiata la capacità antiossidante degli estratti delle varie cultivar con il saggio ORAC.

### MATERIALI E METODI

Drupe di ciliegio dolce (*Prunus avium* L.), appartenenti a due varietà commerciali ('Bigarreau Burlat' e 'Ferrovia') e a sei varietà autoctone e rare ('San Nicola', 'Molfetta', 'Montefurio', 'Pagliarsa', 'Napoletana' e 'Capo di Serpe'), sono state raccolte nel 2011 presso il Centro per la Valorizzazione della Cerasicoltura di Conversano (BA), afferente alla Provincia di Bari, e da ceraseti in agro da Casamassima (BA). I frutti sono stati denocciolati, ridotti in polvere tramite Waring Blender e azoto liquido, infine liofilizzati. Di ogni campione sono stati pesati, in triplo, 300 mg di polvere liofilizzata, estratti con 10 ml di Etanolo: Acido Formico: Acqua (70:2:28  $V/V/V$ ), *over night*, al buio, a 4 °C, senza agitazione. Dopo centrifugazione, il pellet è stato riestratto con un'uguale quantità dello stesso solvente di estrazione, per un'ora, in agitazione. Il pool del sopranatante è stato evaporato, sotto vuoto, a tempe-

ratura non superiore a 32 °C e risospeso con acido formico (0,5%). Per la caratterizzazione delle antocianine e degli altri fenoli è stato utilizzato un cromatografo Agilent Technologies serie 1100 ed una colonna Luna RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm di diametro interno). L'eluizione è stata effettuata con un flusso costante di 0,9 ml/min, utilizzando come fase mobile (A) H<sub>2</sub>O/Acido Formico (95:5 V/V) e (B) Metanolo. Gli analiti sono stati rivelati spettrofotometricamente a µ= 520 nm per le antocianine e a µ= 320 nm per gli acidi fenolici. Il saggio ORAC per la valutazione della capacità antiossidante è stato condotto secondo DAVALOS *et al.* (2004) e ELISIA *et al.* (2007), utilizzando uno spettrofluorimetro a piastre (Victor X5, Perkin Elmer).

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'analisi cromatografica a 520 nm sono stati identificati due picchi principali di antocianine, la cianidina 3-glucoside e la cianidina 3-rutinoside. In tutte le cultivar analizzate, la prevalente è la cianidina 3-rutinoside, con differenze quantitative tra le cultivar. Nella 'Napoletana', i cui frutti presentavano una buccia chiara tendente al giallo, è stata evidenziata la presenza della sola cianidina 3-rutinoside (Tab.1). La quantità totale di antocianine (espressa come Keracyanin Equivalenti, Ker E) oscillava tra 8,43 e 0,17 mg Ker E/g peso secco (d.w.). I valori più elevati sono stati registrati nelle cv autoctone 'Capo di Serpe' e 'San Nicola' e nella cv commerciale 'Burlat'. Nella Tab. 1 sono anche riportati i valori di attività antiossidante delle varie cultivar analizzate. Alcune cv autoctone presentano attività antiossidante uguale o anche superiore a quella delle cv commerciali. In particolare, 'Capo di Serpe' e 'San Nicola' hanno valori rispettivamente pari a 251,13 ed a 183,07 µmol Trolox E/g d.w. rispetto alla 'Burlat' che ha attività antiossidante pari a 192,64 µmol Trolox E/g d.w. Il valore dell'attività antiossidante totale nella 'Ferrovìa' (121,30 µmol Trolox E/g d.w.) risulta il più basso di tutti. Al contrario, la 'Burlat' mostra una *performance* buona, collocandosi al secondo posto,

dopo la 'Capo di Serpe'. La correlazione tra la capacità antiossidante e le antocianine è positiva e piuttosto elevata (r= 71%). L'analisi cromatografica a 320 nm ha permesso di identificare in maniera specifica gli acidi fenolici. Confrontando i tempi di ritenzione dei picchi trovati con quelli di standard e sulla base delle informazioni ritrovate in letteratura (GAO, MAZZA, 1995; MOZETIC *et al.*, 2004), sono stati identificati tre picchi principali: l'acido neo-clorogenico (Neo-CGA), l'acido 3'-*p*-cumaroyl-chinico e l'acido clorogenico (CGA). Il preponderante era il Neo-CGA, che caratterizza in modo specifico i frutti di ciliegie. Dalle analisi quantitative degli acidi fenolici si deduce che le cv autoctone, in particolar modo 'Molfetta', 'Montefurio' e 'Capo di Serpe' sono le più ricche di tali composti; infatti presentano un quantitativo circa doppio rispetto a quello della 'Burlat' e della 'Ferrovìa' (Tab. 2). Le cv autoctone presentano un maggior contenuto di Neo-CGA se confrontato con quello delle cv commerciali. Il CGA non è così rilevante come il suo isomero Neo-CGA, e questo è un andamento che si ripete in tutte le cultivar senza distinzione; infatti, i valori, espressi come mg/g d.w., oscillano da 0,17 per la 'Burlat' a 0,08 per la 'Ferrovìa' (cv commerciali); per le autoctone i valori oscillano tra 0,23 ('Molfetta') e 0,01 ('San Nicola').

#### CONCLUSIONI

Le ciliegie sono frutti ricchi di composti fenolici, di cui la classe più abbondante è rappresentata dalle antocianine; inoltre sono frutti anche ricchi di acidi fenolici, in particolare acidi idrossi-cinnamici (GAO, MAZZA, 1995; ESTI *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2004; USENIK *et al.*, 2008). Anche nelle cv di ciliegie autoctone della Puglia sono stati confermati i dati riportati in letteratura. La quantità di antocianine totali e la capacità antiossidante che si ritrova nei frutti delle cultivar rare è in alcuni casi superiore a quella ritrovata in cv commerciali, come la 'Burlat'. La 'Ferrovìa' (la principale cv pugliese) a questo riguardo presenta caratteristiche nutraceutiche non eccellenti, al contrario delle caratteristiche merceolo-

TABELLA 1

Contenuto di antocianine totali (mg di Ker E/g d.w.), contenuto delle singole antocianine prevalenti (mg/g d.w.) ed attività antiossidante (µmol Trolox E/g d.w.) nelle varie cv analizzate. I dati rappresentano le medie ± S.D. ottenute in 3 esperimenti. Total anthocyanin content (mg Ker E/g d.w.), main anthocyanin content (mg/g d.w.) and antioxidant activity (µmol Trolox E/g d.w.) of different sweet cherry cultivars. Values are expressed as the mean ± standard deviation from three different experiments.

cv	Antocianine tot (mg Ker E/g d.w.)	Cianidina 3-rutinoside (mg/g d.w.)	Cianidina 3-glucoside (mg/g d.w.)	Attività antiossidante (µmol Trolox E/g d.w.)
<b>Burlat</b>	7,42 ± 0,28	4,54 ± 0,03	1,89 ± 0,18	192,64 ± 10,13
<b>Ferrovìa</b>	3,34 ± 0,17	2,97 ± 0,17	0,15 ± 0,01	121,30 ± 9,69
<b>Capo di Serpe</b>	8,43 ± 0,39	6,82 ± 0,31	0,86 ± 0,03	251,13 ± 26,66
<b>San Nicola</b>	8,09 ± 0,06	4,49 ± 0,15	2,22 ± 0,05	183,07 ± 4,39
<b>Montefurio</b>	3,93 ± 0,19	3,40 ± 0,20	0,16 ± 0,01	169,73 ± 7,39
<b>Pagliarsa</b>	2,81 ± 0,01	2,40 ± 0,04	0,11 ± 0,00	162,41 ± 7,13
<b>Molfetta</b>	0,44 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,01 ± 0,00	134,12 ± 12,81
<b>Napoletana</b>	0,17 ± 0,00	0,15 ± 0,01	-	123,97 ± 7,24

TABELLA 2

Contenuto degli acidi fenolici prevalenti (mg/g d.w.) presenti nelle varie cv analizzate. I dati rappresentano le medie  $\pm$  S.D. ottenute in 3 esperimenti.

Phenolic acid content (mg/g d.w.) of different sweet cherry cultivars. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation from three different experiments.

cv	Neo-CGA (mg/g d.w.)	CGA (mg/g d.w.)
Burlat	1,03 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,15
Ferrovìa	0,75 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,00
Capo di Serpe	1,71 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,01
Molfetta	2,47 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,11
Montefurìo	2,07 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,00
Pagliarsa	1,32 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00
Napoletana	1,15 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00
San Nicola	0,61 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01

giche ed organolettiche. Nonostante questi dati debbano essere confermati in annate successive, le cultivar autoctone oggetto di questo studio presentano caratteristiche nutraceutiche piuttosto interessanti, per cui tali genotipi dovrebbero essere propagati e tenuti in considerazione in programmi di miglioramento genetico finalizzati all'ottenimento di cultivar con migliorate caratteristiche salutistiche.

#### LETTERATURA CITATA

- DAVALOS A., GOMEZ-CORDOVES C., BARTOLOMÉ B., 2004 – *Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay*. J. Agric. Food Chem., 52: 48-54.
- ELISIA I., HU C., POPOVICH D.G., KITTS D.D., 2007 – *Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract*. Food Chem., 101: 1052-1058.
- ESTI M., CINQUANTA L., SINESIO F., MONETA E., MATTEO M., 2002 – *Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage*. Food Chem., 76: 399-405.
- FERRETTI G., BACCHETTI T., BELLEGGIA A., NERI D., 2010 – *Cherry Antioxidants: From Farm to Table*. Molecules, 15: 6993-7005.
- GAO L., MAZZA G., 1995 – *Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics*

*in sweet cherries*. J. Agric. Food Chem., 43: 343-346.

- 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.)*. J. Agric. Food Chem., 52: 523-530.
- KRIKORIAN R., SHIDLER M.D., NASH T.A., KALT W., VINQVIST-TYMCHUK M.R., SHUKITT-HALE B., JOSEPH J.A., 2010 – *Blueberry supplementation improves memory in older adults*. J. Agric. Food Chem., 58: 3996-4000.
- MOZETIC B., TREBSE P., SIMCIC M., HRIBAR J., 2004 – *Changes of anthocyanins and hydroxycinnamic acids affecting the skin colour during maturation of sweet cherries (Prunus avium L.)*. Lebensm. Wiss. Technol., 37: 123-128.
- TSUDA T., 2008 – *Regulation of adipocyte function by anthocyanins: possibility of preventing the metabolic syndrome*. J. Agric. Food Chem., 56: 642-646.
- USENIK V., FABRIC J., ŠTAMPAS F., 2008 – *Sugar, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (Prunus avium L.)*. Food Chem., 107: 185-192.
- WANG J., MAZZA G., 2002 – *Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- $\gamma$ -activated RAW 264.7 macrophages*. J. Agric. Food Chem., 50: 850-857.

RIASSUNTO - In questo studio sono stati caratterizzati estratti di ciliegie dolci (*Prunus avium* L.) coltivate nella zona di elezione per la cerasicoltura pugliese (la zona del sud-est barese). Sono stati impiegati metodi di cromatografia liquida ad alte prestazioni per identificare e quantificare i composti fenolici. Un totale di cinque composti fenolici sono stati caratterizzati: derivati di acidi idrossicinnamici (acido neoclorogenico, acido 3'-p-cumaroylchinico ed acido clorogenico) e antocianine (cianidina 3-glucoside, cianidina 3-rutinoside). Il contenuto di antocianine totali variava da 0,17 a 8,43 mg di Keracyanin equivalenti/g di peso secco. Il saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ha messo in evidenza che alcuni genotipi autoctoni e rari ('Capo di Serpe' e 'San Nicola') possedevano una elevata attività antiossidante. I risultati di questi studi permettono di identificare genotipi autoctoni con caratteristiche nutraceutiche particolarmente interessanti, e ciò risulta importante al fine di una valorizzazione delle produzioni cerasicole pugliesi.

#### AUTORI

Clara Albano (clara.albano@ispa.cnr.it), Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), CNR, Via Celoria 2, 20133 Milano

Anna Montefusco (anna.montefusco@unisalento.it), Di.S.Te.B.A., Università del Salento, Via Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce

Federica Blando (federica.blando@ispa.cnr.it), Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), CNR, Via Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce

## Effetti di film pacciamanti biodegradabili sulla coltivazione della varietà locale “cicoria di Galatina” (Salento, Puglia)

V. ARMENISE, S. MARCHIORI, R. ACCOGLI

**ABSTRACT** - *Effects of mulching biodegradable films on the local variety "cicoria di Galatina" (Salento, Apulia region)* - The effects of eight biodegradable mulching films on the cultivation of the local variety “cicoria di Galatina” were tested in the Botanical Garden of the University of Salento. The growth and yield of the plants were evaluated for each test in correlation with the weaving of the film. The highest mulching capability was obtained with furan resin-treated films, whereas the best yield was observed with untreated or mildly treated films.

*Key words: biodegradable mulching films, Botanic Garden, local cultivar*

### INTRODUZIONE

La Puglia, con circa 100.000 Ha di superficie coltivata, è la prima regione orticola d'Italia (TRENTINI, 2012); sul suo territorio, la coltivazione degli ortaggi da foglia ha radici antichissime tanto da aver determinato nei secoli sia l'aumento della superficie coltivata sia una vasta gamma di varietà colturali, quelle più idonee ad adattarsi alle condizioni pedoclimatiche e meglio rispondenti al gusto ed alle esigenze nutrizionali delle popolazioni locali. In questo ultimo cinquantennio, le pratiche agricole sono state a forte impatto ambientale per gli stessi ecosistemi agrari, a causa dei grossi quantitativi di erbicidi, pesticidi, fertilizzanti, ammendanti e prodotti chimici utilizzati per il miglioramento delle produzioni, ma anche per i grossi quantitativi di materiali inerti derivanti dagli imballaggi dei substrati e dell'insacchettamento dei prodotti commerciali (cartone, legname trattato, etichette adesive, contenitori in PVC, tetrapak, materiali ferrosi o in alluminio). A forte impatto ambientale si è rivelato pure l'utilizzo dei teli per la pacciamatura, realizzati con materiali plastici in polietilene a bassa densità (LDPE); essi contribuiscono al 45% della domanda mondiale, pari a circa 2,8 milioni di tonnellate all'anno (BERGAMASCHINI *et al.*, 2011). Il loro è un mercato in forte espansione, per la tendenza sempre più marcata all'allungamento della stagione culturale e all'incremento delle rese produttive (CHIARINI *et al.*, 2009). In Italia, nel 2010, le coltivazioni potenzialmente pacciamabili (in serra e in pieno campo) hanno occupato una superficie totale pari a oltre 230.000 Ha, concentrata soprattutto in Puglia,

Sicilia, Emilia Romagna e Campania. L'impiego del telo pacciamante offre notevoli vantaggi: ostacola lo sviluppo delle infestanti; impedisce la compattazione del suolo che rimane più soffice ed areato; limita le perdite di acqua per evaporazione; crea una camera all'interno della quale temperatura e umidità si mantengono più a lungo, rispetto al suolo scoperto; favorisce lo sviluppo dei microrganismi del suolo. Di contro, i film plastici presentano alti costi di smaltimento e bassa degradabilità. La moderna agricoltura sostenibile tende ad orientare verso pratiche agricole “intelligenti” rispettose dello stato di salute del terreno e dell'ambiente; propone film biodegradabili di facile smaltimento (FILIPPI *et al.*, 2009), per la produzione dei quali si registra una riduzione del 44% delle emissioni di anidride carbonica equivalente ed una riduzione del 100% dei rifiuti prodotti (BERGAMASCHINI *et al.*, l.c.).

### MATERIALI E METODI

Scopo del lavoro è stato quello di testare 8 tipologie di teli pacciamanti biodegradabili differenti sia per l'architettura tessile, essendo in tessuto (trama e ordito) o in feltro (non tessuto o “felt” o “no woven”), sia per la tipologia dei trattamenti (con resina furanica, con antibiotici, con enzimi). I teli sono stati forniti dal Centro di progettazione, design e tecnologie dei materiali (CETMA), che opera presso la Cittadella della Ricerca di Brindisi. Si tratta comunque di campioni tutti a base di fibre di juta, disposte a strati o incrociate, unite con collanti o con processi termici. Il trattamento con resina furanica, conferisce al telo

maggiore o minore resistenza, a seconda se l'impregnazione è stata completa (la resistenza dovrebbe essere garantita per almeno 4 anni) o superficiale (la resistenza è di appena 2 stagioni). I teli avevano uguale peso (500 g/m<sup>2</sup>) ma avevano subito un trattamento differente: con resina furanica; con Aegis (antibatterico); con enzimi (esaltanti le proprietà delle fibre).

In definitiva, le diverse tipologie dei teli (Sample) sono state indicate con delle sigle (S1, S2, S3, S4, S6, S8, S9, S10) e raggruppate in 6 categorie:

- A) juta woven - trattata a 220 °C, in bagno di resina furanica a velocità impregnante di 3-4,5 metri al minuto (S1, S2, S3);
- B) juta felt - trattata a 220 °C, in bagno di resina furanica a velocità impregnante di 2 metri al minuto; successivo trattamento con enzimi (S4);
- C) juta felt - trattata a 220 °C, in bagno di resina furanica a velocità impregnante di 2 metri al minuto (S5, S6);
- D) juta woven - non trattata (S8);
- E) juta felt - non trattata (S9);
- F) juta felt - trattata con antibatterico (S10).

La tipologia S7 corrispondeva ad un telo anti insetto che è stato testato su una superficie non coltivata, solo per saggiare la sua degradabilità nel tempo; il campione S5 non era sufficiente per entrambe le repliche, perciò non è stato considerato.

In particolare, è stata valutata la capacità dei teli a contenere la crescita delle infestanti ed a migliorare la qualità delle piante. Tra le colture autunno-vernine che si protraggono sino alla primavera successiva, è stata scelta la varietà locale "cicoria di Galatina a foglia larga", attualmente in via di valorizzazione e in cerca di un marchio proprio che ne affermi l'identità. In realtà, la coltura di "cicoria di Galatina" prevede la semina in giugno ed il trapianto delle giovani piante allo stadio di 4-5 foglie tra settembre-ottobre; le raccolte dei cespi, come ortaggio da mensa, iniziano in novembre. Per tale coltura non si ricorre alla pacciamatura del terreno, poiché in autunno la flora infestante non si esprime e basse sono pure le esigenze idriche della cicoria, perché le piogge stagionali soddisfano il fabbisogno della coltura. Rispetto ai protocolli colturali dei contadini locali si era in forte ritardo; infatti, nell'Orto Botanico, il trapianto delle giovani piante in pieno campo è stato effettuato alla fine del mese di ottobre, quando il prodotto era già sul mercato. Tuttavia, il ritardo ha allungato il ciclo delle piante che hanno espletato la fase vegetativa tra febbraio-marzo e quella riproduttiva tra aprile e maggio, in piena esplosione di infestanti.

Per la messa in coltura il terreno agrario è stato lavorato rigirandolo di almeno 30 cm con motocoltivatore e arricchito con una concimazione organica di fondo. Sono stati tracciati 18 filari organizzati in 2 repliche (9 per ciascuna) tra loro distanziati di 80 cm. I teli pacciamanti sono stati tagliati per ogni singolo filare in modo da coprirlo con una superficie di 5 m x 60 cm. Per ogni parcella di replica, si aveva un filare di controllo, scoperto (indicato dalla sigla NN) ed 8 filari coperti da telo (Fig. 1).

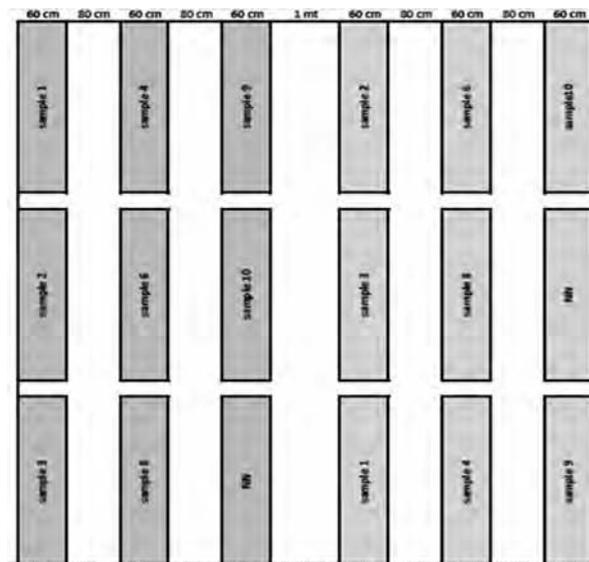


Fig. 1  
Schema di campo con parcelle replicate.  
Diagram of field with replicated plots.

In totale, sono state trapiantate 262 giovani piante di cicoria (circa 15 per filare), ad una distanza intercalare (sul filare) di circa 30 cm.

L'irrigazione veniva garantita da un'ala gocciolante passante sotto ciascun telo, con portata di 8 lt/h.

Per il primo mese, le piantine sono state opportunamente irrigate con cadenza settimanale e, una volta affrancate, il terreno è stato arricchito con 10 g/pianta di concime azotato (nitrato ammonico).

Quando necessario, è stato effettuato il diserbo manuale della vegetazione infestante tra i filari. Il sopraggiungere dell'inverno ha rallentato lo sviluppo delle piante in coltura, che hanno ripreso la fase vegetativa nella seconda decade di febbraio.

Ad intervalli di tempo regolari, sono stati registrati i caratteri morfometrici relativi a piante (altezza e larghezza), fusti, bocci fiorali e le principali fasi fenologiche (fioritura e maturazione dei semi). Il rilevamento dei caratteri morfologici ha riguardato tutte le piante in coltura.

La maturazione dei cespi è avvenuta in maniera scalare, interessando un arco temporale di circa 40 giorni. Per la valutazione delle rese produttive è stata effettuata la sommatoria dei pesi dei cespi, valutati al momento della raccolta.

## RISULTATI

Una prima valutazione qualitativa ha riguardato il grado di contenimento delle infestanti le quali, in molti casi, sono riuscite ad attraversare le maglie dei teli e ad affiancare la pianta di cicoria. A due mesi dall'impianto, le infestanti erano rade e poco sviluppate, anche a causa del freddo invernale; quasi tutti i teli le contenevano, permettendone lo sviluppo solo oltre il loro margine (Fig. 2).

In primavera, con la ripresa della fase vegetativa, le



Fig. 2  
Situazione delle infestanti a due mesi dal trapianto.  
Situation of weeds 2 months after transplant.

specie spontanee (soprattutto le graminacee) avevano invaso la coltura, tanto da richiedere interventi di scerbatura manuale. Tra le specie che da anni già occupano la superficie agraria dell'Orto Botanico, concentrandosi in punti differenti del campo, a seconda delle condizioni di irraggiamento solare e di natura del terreno, quelle maggiormente invasive sono risultate (nell'ordine):

*Avena barbata* Potter ex Link, *Dactylis glomerata* L., *Calendula arvensis* L., *Fumaria officinalis* L., *Borago officinalis* L., *Diploaxis viminea* L., *Papaver rhoeas* L., *Daucus carota* L., *Ranunculus arvensis* L., *Chrysanthemum coronarium* L., *Sonchus oleraceus* L., *Stellaria media* L., *Lamium amplexicaule* L., *Convolvulus arvensis* L., *Erodium malacoides* L., *Silybum marianum* (L.) Gaertner, *Sherardia arvensis* L., *Anagallis arvensis* L., *Poa bulbosa* L., *Hordeum murinum* L., *Sonchus tenerrimus* L., *Senecio leucanthemifolius* Poirlet, *Crepis neglecta* L.

I risultati finali propongono la bontà dei teli in juta woven trattati con resina furanica, in particolare S3, seguito da S2 e da S1 (cat. A); al contrario, il potere pacciante di S8 (cat. D), non trattato con resina furanica, è risultato quasi nullo.

Per quanto riguarda la tipologia juta felt, i teli trattati con resina furanica (S6-S4) sono anch'essi risultati idonei alla pacciatura, ma con potere più basso rispetto a quelli in juta woven.

Maggior potere pacciante è stato dimostrato da

S4, telo in juta felt trattata con enzimi (cat. B); mentre S10, trattato con antibatterico (cat. F), si è dimostrato poco efficace.

Azione pacciante insufficiente è stata evidenziata da S9, telo in juta felt non sottoposta ad alcun trattamento (cat. E).

Una seconda valutazione della bontà dei teli ha riguardato il loro possibile effetto sull'accrescimento della specie orticola in coltivazione (cicoria di Galatina) e sulle rese produttive.

Dall'elaborazione dei dati rilevati sui caratteri morfometrici delle piante di cicoria, si evidenzia che i teli paccianti utilizzati non hanno influito significativamente sulle dimensioni raggiunte dalle piante, anche se nei filari di controllo (NN) le piante hanno manifestato valori più bassi, soprattutto per larghezza del cespo e per numero di fusti (Tab. 1).

TABELLA 1  
Principali misure su piante di cicoria.  
Main measurements on plants of chicory.

Telo	Ø (cm)	Altezza (cm)	N° fusti	Peso (gr)
S1	3,77 ±0,38	15,48 ±0,74	13,79 ±0,18	237,66 ±26,59
S2	2,97 ±0,48	19,26 ±4,23	14,05 ±3,96	174,02 ±25,89
S3	3,22 ±0,13	14,52 ±2,80	12,69 ±0,98	177,29 ±26,45
S4	3,8 ±1,13	17,17 ±4,91	13,775 ±0,32	238,8 ±39,64
S6	3,32 ±0,66	17,89 ±4,44	<b>14,55</b> <b>±6,30</b>	264,90 ±158,20
S8	3,75 ±0,66	<b>20,39</b> <b>±11,35</b>	13,01 ±2,22	<b>284,95</b> <b>±133,32</b>
S9	2,98 ±0,53	15,50 ±1,41	12,84 ±3,17	149,02 ±92,67
S10	3,10 ±0,78	17,56 ±5,47	12,7 ±3,58	183,23 ±116,86
NN	<b>2,90</b> <b>±1,18</b>	18,84 ±0,04	<b>10,95</b> <b>±3,28</b>	192,6 ±182,49

I valori di larghezza della pianta (o diametro) e numero di fusti sono molto simili per quasi tutti i teli; tuttavia, sono più bassi nel controllo (NN) e più elevati per S6.

Tra tutti i teli, per dimensioni e peso raggiunti dall'ortaggio, il più efficiente è risultato S8.

#### CONCLUSIONI

Per quanto riguarda il potere pacciante, la maggior parte dei teli biodegradabili testati ha evidenziato una discreta efficienza nel controllo della flora infestante la quale è stata contenuta e relegata marginalmente della superficie coperta. Il tessuto a fibre intrecciate si è rivelato più efficace del feltro (fibre compresse); così pure il trattamento degli stessi teli con resi-

na furanica a maggior velocità impregnante. Per quanto riguarda gli effetti della pacciamatura sulla resa colturale, apparentemente, i teli non hanno influenzato significativamente le dimensioni e le rese; tuttavia, rese più soddisfacenti sono state presentate da piante di cicoria di Galatina coltivate con teli non trattati (S8) o con bagno in resina furanica a bassa velocità (S1, S4, S6). Probabilmente, il trattamento con resina furanica, che è l'inibitore principale, agisce indiscriminatamente sugli organismi vegetali. Per risultati più esaurienti l'indagine dovrebbe essere ripetuta, con approfondimenti che riguardino anche le condizioni della flora e dei nutrienti del terreno agrario dove il telo ha stazionato per circa 10 mesi, prima di essere sminuzzato e disperso nel terreno agrario durante la fresatura del campo che aveva ospitato la prova colturale.

#### LETTERATURA CITATA

BERGAMASCHINI I., BERTOLINI F., 2011 – *I vantaggi del*

*biotelo in agricoltura*. *Ecoscienza*, 3: 90-91

CHIARINI F., MANTOAN C., 2009 - *Teli pacciamanti biodegradabili, vantaggi tecnici ed economici*. *Informatore Agrario*, 48: 31-36.

FILIPPI F., MAGNANI G., BERTOLACCI M., 2009 - *Pacciamatura biodegradabile e irrigazione del Cavolfiore*. *Culture Protette*, 11: 66-72

TRENTINI L., 2012 - *Orticoltura in campo: il settore degli ortaggi in Italia e le coltivazioni pacciamate*. Centro servizi Ortofrutticoli (CSO), Mantova. In: <http://www.orticolturaincampo.com>

RIASSUNTO – Film pacciamanti biodegradabili sono stati testati nell'Orto Botanico dell'Università del Salento sulla coltivazione della varietà locale "cicoria di Galatina". Per ciascun telo, sono stati valutati i caratteri di crescita delle piante e la resa produttiva, mettendo poi in correlazione tessitura e trattamento cui è stato sottoposto. Per il potere pacciamante più idonei si sono rivelati i teli trattati con resina furanica, mentre per le rese colturali più idonei sono i teli non trattati o con trattamenti di lieve entità.

#### AUTORI

*Viola Armenise, Silvano Marchiori, Rita Accogli (rita.accogli@unisalento.it), Orto Botanico del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali (Di.S.Te.B.A.), Università del Salento, Centro Ecotekne, Via Prov.le per Monteroni, 73100 Lecce*

## Marcatori molecolari per la tracciabilità del cardoncello (*Pleurotus eryngii* var. *eryngii*)

A. VILLANI, G. MULÈ, A. SUSCA, L. MASTROPASQUA, C. PACIOLLA

**ABSTRACT** - *Molecular markers for the traceability of cardoncello* (*Pleurotus eryngii* var. *eryngii*) - In this work the authors analyzed sixty Italian strains of the edible mushroom “cardoncello” (*Pleurotus eryngii*) belonging to the varieties *eryngii* and *ferulae* by sequencing two housekeeping genes (*efl-a* and *rpb2*) and evaluating the activity of peroxidase, superoxide dismutase and catalase, in order to find some molecular markers for the traceability of “cardoncello”. Sequence analysis showed the presence of SNPs variety-specific (*eryngii* and *ferulae*) in both genes useful for the development of molecular identification tools. None correlation between enzymatic analysis and analyzed varieties was observed.

*Key words*: enzyme analysis, molecular markers *Pleurotus eryngii* species complex

### INTRODUZIONE

I funghi del genere *Pleurotus* appartengono alla classe dei basidiomiceti, sono eterotallici tetrapolari, dicariotici, ampiamente conosciuti e coltivati in molte parti del mondo come funghi commestibili. Il termine *Pleurotus* deriva dal greco “pleurón” = di fianco e “oùs, otós” = orecchio, con l’orecchio di fianco, in riferimento alla forma del carpoforo. Tra le specie di *Pleurotus*, *P. eryngii* include molte peculiarità tipiche del genere, come la capacità di degradare, oltre alla lignina, inquinanti (RODRIGUEZ *et al.*, 2004) e coloranti industriali (HEINFLING *et al.*, 1998) e biotrasformare materie prime vegetali, per ottenere mangimi e combustibili (STAJIC *et al.*, 2009). *P. eryngii*, noto comunemente come “cardoncello”, cresce in Basilicata, Calabria, Sardegna, Lazio, Sicilia e Puglia, in particolare nell’alta Murgia, dove si concentra la maggior parte della produzione spontanea e coltivata. Diverse ricerche in campo alimentare e farmaceutico hanno dimostrato le proprietà benefiche (NGAI, NG, 2006; WANG *et al.*, 2012) e l’alto valore nutrizionale di questo basidiomicete, divenuto per tale motivo una componente importante della dieta mediterranea. Questa specie è l’unica all’interno del genere *Pleurotus* associata con le piante della famiglia delle *Apiaceae* attraverso una modalità di crescita biotrofica facoltativa (HILBER, 1982; JOLY *et al.*, 1990). In riferimento alla pianta-ospite, diverse indagini molecolari condotte sulla specie *P. eryngii* hanno permesso di individuare cinque varietà: *P. eryngii* var. *eryngii* (DC.: Fr) Quèl. (1872) che colonizza i fusti di *Eryngium campestre* ed *E. maritimum*; la var. *ferulae* (Lanzi) Sacc. (1887) che cresce sulle radici di *Ferula communis*; la var. *elaeoselini*

(VENTURELLA *et al.*, 2000) associata ad *Elaeoselinum asclepium*; la var. *thapsiae* (VENTURELLA *et al.*, 2002) che colonizza *Thapsia garganica*; la var. *tingitanus* (LEWINSOHN *et al.*, 2002) associata a *Ferula tingitana* e la var. *nebrodensis* Inzenga (1886) che si sviluppa invece sulle ombrellifere del genere *Laserpitium* e *Cachrys*, endemiche delle Madonie. L’associazione con la pianta ospite e le caratteristiche morfologiche vengono spesso utilizzate come caratteristiche discriminanti a livello tassonomico; tuttavia, ci sono ancora controversie circa la corretta assegnazione delle varietà all’interno del complesso di specie di *P. eryngii*, causate verosimilmente da misidentificazioni, dalla perdita di diversità dovuta alla selezione umana, dall’assenza di ceppi di riferimento per ogni *taxon* e dalla mancanza di barriere riproduttive tra i *taxa* appartenenti alla specie complesso (ZERVAKIS, BALIS, 1996; KAWAI *et al.*, 2008). Diversi studi (ZERVAKIS *et al.*, 2001; DE GIOIA *et al.*, 2005) hanno dimostrato inoltre che le analisi morfologiche non sono sufficienti a discriminare le diverse varietà a causa della marcata variabilità dei caratteri e alla soggettività dell’operatore, mentre la caratterizzazione molecolare potrebbe contribuire a chiarire le relazioni tassonomiche nel complesso e fornire uno strumento valido per l’identificazione a livello di specie e/o varietà. L’utilizzo di marcatori molecolari di DNA ed in particolare di alcuni geni *housekeeping*, come il fattore di allungamento (*efl-a*) e la seconda subunità della RNA polimerasi II (*rpb2*), è risultato un buon criterio per indagare le relazioni filogenetiche tra funghi, anche grazie alla presenza di sequenze amminoacidiche conservate e alla disponibilità di primers univer-

sali (LIU *et al.*, 1999). Diverse analisi molecolari sono state inoltre realizzate su enzimi coinvolti nella degradazione della lignina, come la manganese perossidasi (MnPOD), la lignina perossidasi (LnPOD) e la laccasi in *P. ostreatus* (PEZZELLA *et al.*, 2013) e in *P. eryngii* (RUIZ-DUENAS *et al.*, 1999). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare uno strumento valido per la tracciabilità del cardoncello mediante l'utilizzo di marcatori molecolari e biochimici in grado di identificare la varietà *eryngii*. Sessanta ceppi dicariotici, di cui 13 con pianta ospite nota utilizzati come controllo, appartenenti alle due varietà *eryngii* e *ferulae* e provenienti da alcune regioni italiane, sono stati analizzati mediante sequenziamento di una regione parziale dei geni *efl-a* ed *rpb2* e mediante analisi isoenzimatica (native-PAGE) di alcuni enzimi antiossidanti quali le perossidasi generiche (POD), la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e l'ascorbato perossidasi (APX), coinvolti principalmente nel controllo del livello di perossido di idrogeno e nel processo di degradazione della lignina.

#### MATERIALE E METODI

I 60 isolati utilizzati in questo studio provengono dalla collezione nazionale dell'IBAF - Istituto di Biologia Agro-ambientale e Forestale - CNR-Montelibretti (RM). Sono ceppi appartenenti al genere *Pleurotus* e distinti nelle due varietà *ferulae* ed *eryngii*. In seguito all'estrazione del DNA totale di ciascun ceppo, le regioni parziali dei geni *efl-a* ed *rpb2* sono stati amplificati in base alle condizioni di PCR riportate in letteratura (LIU *et al.*, 1999). Le sequenze ottenute sono state allineate mediante l'algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) e le analisi evolutive sono state condotte in Mega 5.2 utilizzando il metodo della massima verosomiglianza basato sul modello di TAMURA NEI (TAMURA, NEI, 1993). Per quanto riguarda le analisi isoenzimatiche, si è proceduto all'estrazione proteica seguendo la procedura descritta da LANUBILE *et al.* (2012). La determinazione del contenuto proteico totale è stata effettuata mediante il metodo di BRADFORD (1976). 100 µg di proteine totali estratte per singolo campione sono state sottoposte ad elettroforesi su native-PAGE; dopo la corsa elettroforetica i gel sono stati incubati in tamponi appropriati per visualizzare l'attività enzimatica specifica per POD, SOD, CAT ed APX.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

La tipizzazione molecolare del materiale biologico è divenuto uno dei principali obiettivi da attuare al fine di garantire la tipicità e la tracciabilità del prodotto derivato. Lo scopo di questo studio è stato la messa a punto di una metodologia di riferimento per la caratterizzazione molecolare della specie *P. eryngii* e la costituzione di una banca dati di biodiversità che costituirà la base informativa per certificare *P. eryngii* var. *eryngii*, noto come cardoncello, in maniera oggettiva e indipendente dalle competenze dell'operatore che effettua le osservazioni. Riguardo all'analisi enzimatica, si sono rilevati alti livelli di POD (Fig. 1) e SOD (Fig. 2) in tutti i campioni analizzati

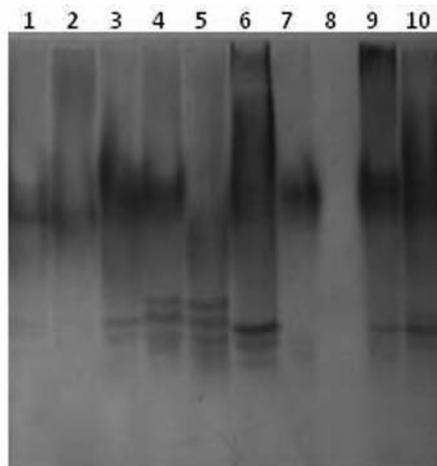


Fig. 1

Analisi dell'attività delle POD su gel nativo. Nella figura sono riportati i profili enzimatici di 10 ceppi di riferimento per la varietà di cui era nota la pianta ospite. Analysis of POD activity on native gel. The enzymatic profile of 10 reference strains with known host plant is shown.

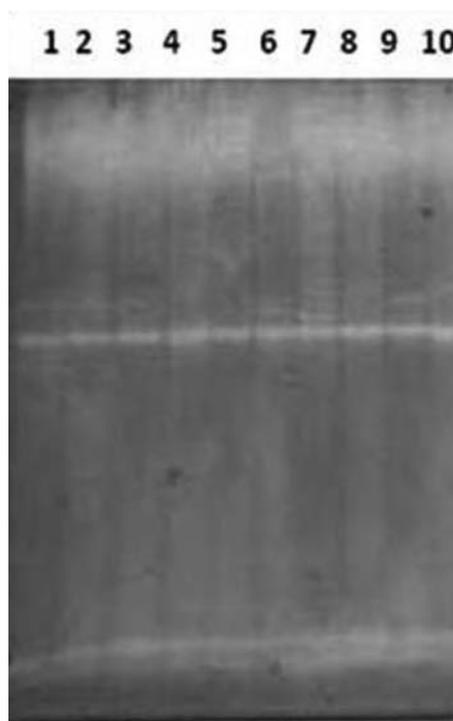


Fig. 2

Analisi dell'attività della SOD su gel nativo. Nella figura sono riportati i profili enzimatici di 10 ceppi di riferimento per la varietà con pianta ospite nota. Analysis of SOD activity on native gel. The enzymatic profile of 10 reference strains with known host plant is shown.

sebbene non sia stata trovata alcuna correlazione tra i profili isoenzimatici di queste proteine e gli isolati

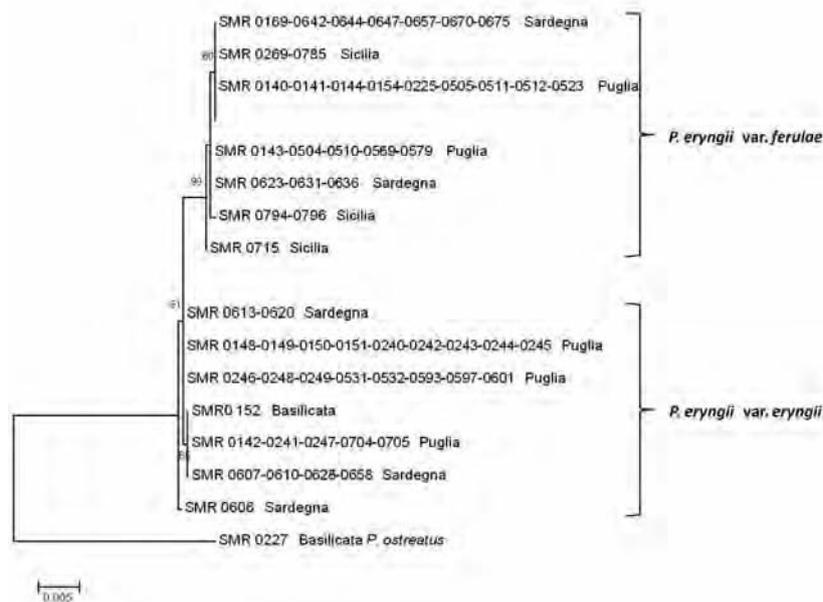


Fig. 3

Dendrogramma ottenuto combinando i dati di sequenza dei geni *efl-a* ed *rbp2*. Le analisi evolutive sono state ottenute con il metodo della verosomiglianza. I numeri riportanti si riferiscono ai valori di bootstrap (1000 repliche).

Tree derived from combined *rbp2* and *efl-a* data sets. The evolutionary history was inferred through the use of the Maximum Likelihood method. Numbers at nodes are bootstrap values (1000 replicates).

analizzati.

L'assenza dell'attività della catalasi nella maggior parte dei campioni analizzati implica un ruolo marginale svolto da questo enzima nel processo di detossificazione cellulare, mentre l'assenza completa di ascorbato perossidasi nei campioni fungini oggetto di studio suggerisce che tale enzima non sia necessario nella rimozione del perossido di idrogeno. La presenza della SOD in tutti i campioni analizzati implica la capacità da parte delle cellule di dismutare ad  $H_2O_2$  l'anione superossido, una specie radicalica dell'ossigeno altamente citotossica. Per questa specie di fungo, pertanto, le POD e le SOD appaiono svolgere un ruolo importante nella risposta di difesa dallo stress ossidativo. Le analisi di sequenza e i dati relativi al sequenziamento genico della regione *efl-a* hanno evidenziato una maggiore variabilità rispetto all'analisi del gene *rbp2*.

La variazione di sequenza tra le varietà *ferulae* ed *eryngii* è risultata inferiore all'1%. Sei sostituzioni nucleotidiche nel gene *efl-a* e 4 nel gene *rbp2* permettono di distinguere in maniera inequivocabile gli isolati di *P. eryngii* var. *eryngii* da quelli di *P. eryngii* var. *ferulae*. Dall'analisi del dendrogramma (Fig. 3), ottenuto combinando i dati di sequenza di entrambi i geni, risulta evidente la presenza di un cluster principale che comprende l'intera popolazione oggetto di studio ed una diramazione che include il solo isolato *P. ostreatus* utilizzato come outgroup. Il cluster principale presenta due distinti sottogruppi in cui si distinguono le due varietà *eryngii* e *ferulae*, che a loro volta manifestano, all'interno dello stesso gruppo, una variabilità intra-specie. In termini di speciazione

tali raggruppamenti non risultano correlati né all'origine geografica, né alla specificità di ospite. I valori di similarità tra i due cluster ottenuti dalle nostre analisi non giustificano la presenza di due specie distinte nella popolazione, ma di varietà all'interno di un complesso di specie. Questi risultati, sebbene preliminari, sono in accordo con quanto riportato da MANG *et al.* (2010) e RODRIGUEZ ESTRADA *et al.* (2010), secondo cui le distanze genetiche intraspecifiche all'interno della popolazione di *P. eryngii* sostengono la presenza di una singola specie non ancora differenziata in sub-specie.

#### LETTERATURA CITATA

- BRADFORD MM., 1976 – *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- DE GIOIA T., SISTO D., RANA G.L., FIGLIUOLO G., 2005 – *Genetic structure of the Pleurotus eryngii species-complex*. Mycol. Res., 109(1): 71-80.
- HEINFLING A., MARTINEZ M.J., MARTINEZ A.T., BERGBAUER M., SZEZYK U., 1998 – *Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from Bjerkandera adusta and Pleurotus eryngii in a manganese-independent reaction*. Appl. Environm. Microbiol., 64: 2788-2793.
- HILBER O., 1982 – *Die gattung Pleurotus (Fr.) kummer unter besonderer bercksichtigung des Pleurotus eryngii formenkomplexes*. In: Bibl. Mycol., 87: J. CRAMER: VADUZ.
- JOLY P., CAILLEUX R., CERCEAU M.T., 1990 – *La sterilità male pathologique, element de la co-adaptation entre populations de champignons et de plantes-hotes: modele des Pleurotes des Ombellifères*. Bull. Soc. Bot. Fr., 137:

- 71-85.
- KAWAI G., BABASAKI K., NEDA H., 2008 – *Taxonomic position of a Chinese Pleurotus “Bai-Ling-Gu” it belongs to Pleurotus eryngii (DC.:Fr) Quel. And evolved independently in China.* Mycoscience, 49: 75-87.
- LANUBILE A., BERNARDI J., MAROCCO A., LOGRIECO A.F., PACIOLLA C., 2012 – *Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to Fusarium verticillioides.* Environm. Experim. Bot., 78: 39-46.
- LEWINSOHN D., WASSER SP., RESHETNIKOV SV., HADAR Y., NEVO E., 2002 – *The Pleurotus eryngii species-complex in Israel: distribution and morphological description of a new taxon.* Mycotaxon, 81: 51-67.
- LIU Y.J., WHELEN S., HALL B.D., 1999 – *Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit.* Mol. Biol. Evol., 16(12): 1799-1808.
- MANG S.M., FIGLIUOLO G., 2010 – *Species delimitation in Pleurotus eryngii species complex inferred from ITS and EF-1 $\alpha$  gene sequences.* Mycology, 1(4): 269-280.
- NGAI P.H.K., NG T.B., 2006 – *A hemolysin from the mushroom Pleurotus eryngii.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 72: 1185-1191.
- PEZZELLA C., LETTERA V., PISCITELLI A., GIARDINA P., SANNIA G., 2013 – *Transcriptional analysis of Pleurotus ostreatus laccase genes.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 97(2): 705-717.
- RODRÍGUEZ E., NUERO O., GUILLEN F., MARTÍNEZ A.T., MARTÍNEZ M.J., 2004 – *Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four Pleurotus species: the role of laccase and versatile peroxidase.* Soil Biol. Biochem., 36(6): 909-916.
- RODRÍGUEZ ESTRADA A.E., JIMENEZ-GASCO M.M., ROYSE D.J., 2010 – *Pleurotus eryngii species complex: sequence analysis and phylogeny based on partial EF1 $\alpha$  and RPB2 genes.* Fungal Biol., 114: 421-428.
- RUIZ-DUENAS F.J., MARTÍNEZ M.J., MARTÍNEZ A.T., 1999 – *Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus Pleurotus eryngii.* Mol. Microbiol., 31(1): 223-235.
- STAJIC M., VUKOJEVIC J., DULETIC-LAUŠEVIC S., 2009 – *Biology of Pleurotus eryngii and role in biotechnological processes: a review.* Biotechnology, 29(1): 55-66.
- TAMURA K., NEI M., 1993 – *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.* Mol. Biol. Evol., 10: 512-526.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.G., 1994 – *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680.
- VENTURELLA G., ZERVAKIS G., LA ROCCA S., 2000 – *Pleurotus eryngii var. elaeoselini var. nov. from Sicily.* Mycotaxon, 76: 419-427.
- VENTURELLA G., ZERVAKIS G., SAITTA A., 2002 – *Pleurotus eryngii var. thapsiae var. nov. from Sicily.* Mycotaxon, 81: 69-74.
- WANG S.J., LI Y.X., BAO L., HAN J.J., YANG X.L., LI H.R., WANG Y.Q., LI S.J., LIU H.W., 2012 – *Eryngiolide A, a cytotoxic macrocyclic diterpenoid with an unusual cyclododecane core skeleton produced by the edible mushroom Pleurotus eryngii.* Organic Letters, 14(14): 3672-3675.
- ZERVAKIS G., BALIS C., 1996 – *A pluralistic approach in the study of Pleurotus species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa.* Mycol. Res., 100: 717-731.
- ZERVAKIS G., VENTURELLA G., PAPADOPOULOU K., 2001 – *Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the Pleurotus eryngii species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters.* Microbiology, 147: 3183-3194.

RIASSUNTO – In questo lavoro sono stati analizzati sessanta ceppi italiani del fungo commestibile “cardoncello” (*Pleurotus eryngii*) appartenenti alle varietà *eryngii* e *ferulae* attraverso il sequenziamento di due geni *housekeeping* (*ef1 $\alpha$*  e *rpb2*) e l’analisi dell’attività della perossidasi, superossido dismutasi e catalasi, al fine di individuare alcuni marcatori molecolari per la tracciabilità del fungo. Le analisi della sequenza hanno mostrato la presenza di SNP varietà-specifico (*eryngii* e *ferulae*) in entrambi i geni utili per lo sviluppo di strumenti per l’identificazione molecolare. L’analisi enzimatica ha rivelato alti livelli di POD e SOD che non erano collegati alle varietà analizzate e una bassa presenza o assenza di APX e CAT.

## AUTORI

Alessandra Villani ([alessandra.villani@ispa.cnr.it](mailto:alessandra.villani@ispa.cnr.it)), Giuseppina Mulè ([giuseppina.mule@ispa.cnr.it](mailto:giuseppina.mule@ispa.cnr.it)), Antonia Susca ([antonella.susca@ispa.cnr.it](mailto:antonella.susca@ispa.cnr.it)), ISPA-CNR Bari, Via Amendola 122/0, 70126 Bari  
Linda Mastropasqua ([linda.mastropasqua@uniba.it](mailto:linda.mastropasqua@uniba.it)), Costantino Paciolla ([costantino.paciolla@uniba.it](mailto:costantino.paciolla@uniba.it)), Dipartimento di Biologia, Università di Bari “Aldo Moro”, Via Orabona 4, 70125 Bari

## Identificazione e caratterizzazione di un gene per una proteina chinasi di grano duro

C. GALATI, M. DE PASCALI, F. LEUCCI, V. FALCO, M. DE CAROLI, P. RAMPINO, C. PERROTTA

**ABSTRACT** - *Identification and characterization of a durum wheat gene coding a protein kinase* - During their life plants are exposed to different abiotic stresses. To cope with stress, plants have developed specific mechanisms involving a general reprogramming of genetic activity. The object of this study was a 543 bp long cDNA, *Td4IN2*, expressed in durum wheat plants subjected to drought stress. The full length cDNA was obtained by RACE and the corresponding genomic sequence was cloned. The protein coded by this gene has the characteristic domain of protein kinases C, which has not yet characterized. Protoplast transient transformation indicates that the protein is localized in the cytosol, in the Golgi apparatus and in the endoplasmic reticulum. The *Td4IN2* gene expression was analyzed in durum wheat seedlings subjected to various stresses: its expression is evident in drought, heat and ABA stressed samples. This study allowed to characterize, for the first time in durum wheat, a gene coding for a protein kinase C involved in abiotic stress response.

*Key words:* abiotic stress, durum wheat, protein kinase

### INTRODUZIONE

Le piante, durante la loro vita, sono esposte a numerosi fattori di stress biotici e abiotici che hanno effetti negativi sulla loro crescita, sulle normali funzioni fisiologiche e sulla capacità biosintetica. Esse cercano di adattare il loro metabolismo allo stress e, nel corso dell'evoluzione, hanno sviluppato specifici meccanismi, attivando risposte a livello molecolare e sviluppando diverse strategie che prevedono una riprogrammazione dell'attività genetica, con conseguente attivazione e/o modulazione di specifici geni correlati allo stress. Nell'ambito dei geni *stress related*, si annoverano geni che codificano per proteine funzionali (proteine LEA, HSP) e geni che codificano per proteine regolatrici, quali chinasi, fosfolipasi o fattori di trascrizione (SHARMA, LAVANYA, 2002). Al fine di comprendere, a livello molecolare, i meccanismi di risposta agli stress attivati dalle piante, sono importanti l'identificazione e lo studio dei geni che intervengono nella risposta agli stress.

È stata eseguita l'analisi dell'espressione differenziale dei geni in piante di grano duro, *cultivar (cv)* Ofanto, sottoposte a stress idrico, termico e combinato (idrico/termico), con la tecnica del cDNA-AFLP (RAMPINO *et al.*, 2012). Mediante questa tecnica è stato identificato un cDNA di 543 bp denominato *Td4IN2*, relativo ad un gene espresso esclusivamente nelle piante sottoposte a stress idrico. Scopo di questo lavoro è stata la caratterizzazione di questo

cDNA, la cui sequenza, confrontata con quelle presenti nelle banche dati, non presentava alcuna omologia significativa.

### MATERIALI E METODI

Per ottenere il cDNA *full length*, *Td4IN2* è stato sottoposto a 5' e 3' RACE utilizzando il *kit* SMARTer™ RACE cDNA (Clontech). I frammenti ottenuti sono stati clonati e sequenziati. Sono quindi stati disegnati i *primer* specifici per amplificare il frammento di DNA genomico contenente il gene *Td4IN2*.

Le analisi bioinformatiche sono state eseguite utilizzando gli strumenti disponibili ai siti web: <http://web.expasy.org/translate>, [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_consensus.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_consensus.pl), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Al fine di determinare la localizzazione della proteina codificata da *Td4IN2* all'interno della cellula, è stata effettuata la trasformazione transiente di protoplasti di tabacco con il vettore PGIP2-GFP nel quale è stata inserita la sequenza codificante per *Td4IN2*. I protoplasti trasformati sono stati osservati al microscopio confocale.

Allo scopo di valutare l'espressione del gene *Td4IN2* nelle radici e nelle foglie di piantine di grano duro delle *cv* Ofanto e Cappelli, queste sono state fatte crescere in agriperlite per 10 giorni e successivamente

te sottoposte a stress: idrico, da alta temperatura (HS), combinato (idrico/HS), salino, da freddo e da acido abscissico (ABA). Per lo stress da alta temperatura le piantine sono state poste a 42 °C per 1, 6 e 24 h. Per imporre lo stress idrico le piantine, rimosse dall'agriperlite, sono state sistemate su carta da filtro ed esposte all'aria, a temperatura ambiente, per 2, 4 e 6 h; per l'imposizione dello stress combinato, le piantine sono state disidratate, come precedentemente descritto, a 42 °C. Per lo stress da freddo, le piantine sono state poste in 25 ml di acqua bidistillata sterile a 4 °C per 1, 6 e 24 h. Per lo stress con ABA, le piantine sono state poste in 25 ml di ABA 100 µM per 1, 6 e 24 h. Infine, per l'imposizione dello stress salino, le piantine sono state poste in 25 ml di NaCl 250 µM per 2, 4 e 6 h. Da tutti i campioni è stato estratto l'RNA e successivamente è stato prodotto il cDNA.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

La sequenza del cDNA *full length* è di 1267 bp e contiene una *open reading frame* (ORF) di 795 bp. La regione codificante è preceduta da una regione in 5' non codificante (UTR) di 124 bp ed è seguita, all'estremità 3', da una UTR lunga 348 bp. Sulla sequenza del cDNA *full length* sono stati quindi disegnati *primer* specifici, utilizzati per amplificare la regione genomica corrispondente. Confrontando la sequenza del gene e quella del cDNA è stata quindi ricostruita la struttura del gene, che è composto da 6 esoni e 5 introni. La sequenza codificante è stata convertita nella corrispondente sequenza aminoacidica. La proteina dedotta, denominata *Td4IN2*, è costituita da 265 aminoacidi, ha un peso molecolare di 30,70 kDa ed un punto isoelettrico teorico di 8,20. Il profilo della sua struttura secondaria rivela la presenza di 12 regioni ad  $\alpha$ -elica, che rappresentano il 46,97% della proteina, intervallate da regioni *random coil* (43,56%) e da tratti lineari (9,47%). Il confronto della sequenza aminoacidica ottenuta con le sequenze presenti nelle banche dati ha evidenziato che *Td4IN2* presenta il dominio caratteristico delle protein-chinasi C. Le protein-chinasi C (PKC) appartengono alla famiglia delle AGC chinasi, un gruppo di serina/treonina chinasi che include anche le protein-chinasi A (PKA) e le protein-chinasi G (PKG). In generale le AGC chinasi sono conservate nel regno vegetale e sono coinvolte nella regolazione della crescita, della morfogenesi e della morte cellulare, ed intervengono anche nella risposta agli stress ambientali (GARCIA *et al.*, 2012). Per quanto riguarda le protein-chinasi C in particolare, esse sono ben caratterizzate nel regno animale, ma quasi nulla è noto riguardo le loro funzioni e i loro *target* nel regno vegetale. Infatti, nelle piante sono state caratterizzate numerose chinasi, tra cui *TaSnRK2.4* (MAO *et al.*, 2010) e *TaSnRK2.7* (ZHANG *et al.*, 2011) di grano tenero, coinvolte nella risposta a differenti tipi di stress abiotici, ma nessuna appartenente a questa sotto-famiglia. I dati ottenuti indicano anche che una delle proteine più simili a *Td4IN2* è una serina-

treonina chinasi di *Triticum aestivum* denominata *TaeSTK-1B*, che non è mai stata caratterizzata e, soprattutto, non è mai stata messa in relazione con gli stress (GRIFFITHS *et al.*, 2006). L'osservazione al microscopio confocale dei protoplasti di tabacco trasformati con il costrutto contenente la sequenza codificante *Td4IN2* indica che la proteina si localizza a livello del citosol, dell'apparato di Golgi e del reticolo endoplasmatico. L'espressione del gene *Td4IN2* è stata analizzata in due *cultivar*, Ofanto e Cappelli, scelte perché pur essendo entrambe resistenti allo stress idrico, probabilmente utilizzano meccanismi diversi. Infatti la *cultivar* Ofanto, che ha una bassa *water use efficiency*, attiva un elevato numero di geni in seguito a stress idrico, mentre la *cultivar* Cappelli, che ha un'elevata *water use efficiency*, presenta espressione costitutiva di molti geni che in Ofanto sono indotti dallo stress idrico ed una minima modulazione dell'espressione genica in risposta allo stress (APRILE *et al.*, 2013). I risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione indicano che questo gene viene espresso esclusivamente nelle foglie e in risposta allo stress idrico, da freddo e da ABA. In seguito a stress idrico il gene è espresso in entrambe le *cultivar* dopo 2 e 4 h di stress, ma in Ofanto i livelli di espressione sono molto più elevati (Fig. 1).

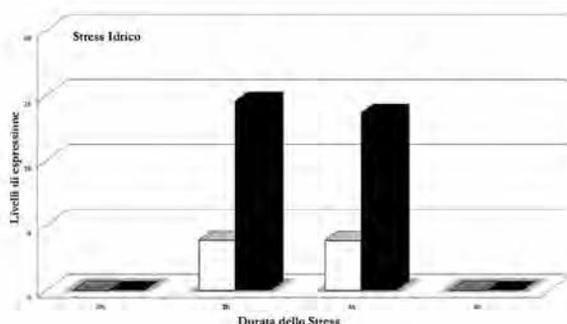


Fig. 1

Livelli di espressione del gene *Td4IN2* in foglie di piante sottoposte a stress idrico (bianco: Cappelli; nero: Ofanto). Expression levels of *Td4IN2* in leaves of plants subjected to water stress (white: Cappelli; black: Ofanto).

Sottoponendo le piantine a stress da freddo, in Ofanto il livello di espressione più elevato si ha dopo 1 h e l'espressione progressivamente diminuisce all'aumentare della durata dello stress, mentre in Cappelli i massimi livelli di espressione si hanno dopo 6 h (Fig. 2A).

Infine, la somministrazione di ABA induce alti livelli di espressione in entrambe le *cv* in tutti i tempi di stress, ma con un andamento differente: in Ofanto si ha una progressiva lieve diminuzione all'aumentare della durata dello stress, mentre in Cappelli si ha un graduale incremento dei livelli di espressione (Fig. 2B).

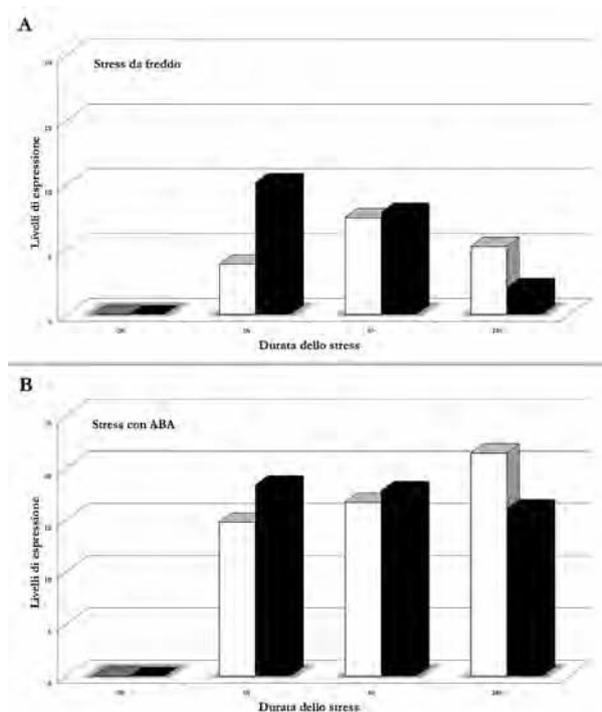


Fig. 2

Livelli di espressione del gene *Td4IN2* in foglie di piante sottoposte a stress da freddo (A) e da ABA (B) (bianco: Cappelli, nero: Ofanto).

Expression levels of *Td4IN2* in leaves of plants subjected to cold (A) and ABA stress (B) (white: Cappelli, black: Ofanto).

La mancata espressione in seguito a stress da alta temperatura e combinato del gene *Td4IN2* rappresenta un risultato atteso, in quanto si verifica anche nelle piante adulte. Questo studio ha permesso di caratterizzare, per la prima volta in grano duro, un gene codificante per una protein-chinasi C coinvolta nella risposta agli stress abiotici e sensibile al trattamento con ABA. In generale questo studio contribuisce ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari di risposta delle piante agli stress abiotici e consentirà lo sviluppo di nuove strategie genetiche finalizzate ad ottenere *cv* resistenti agli stress ambientali.

*Ringraziamenti* - Questo lavoro è stato realizzato con i fondi del MIUR: progetto PON01\_01145-ISCOCEM, PRIN 2010-2011 progetto 2010Z77XAX\_002.

## AUTORI

Chiara Galati, Mariarosaria De Pascali, Francesca Leucci, Monica De Caroli, Patrizia Rampino, Carla Perrotta, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università del Salento, Via Prov.le Monteroni, 73100 Lecce  
Vittorio Falco, CNR-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Via Prov.le Monteroni, 73100 Lecce

## LETTERATURA CITATA

- APRILE A., HAVLICKOVA L., PANNA R., MARÈ C., BORRELLI G.M., MARONE D., PERROTTA C., RAMPINO P., DE BELLIS L., CURN V., MASTRANGELO A.M., RIZZA F., CATTIVELLI L., 2013 – *Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency*. BMC Genomics, 14: 821.
- GARCIA A.V., AL-YOUSIF M., HIRT H., 2012 – *Role of AGC kinases in plant growth and stress responses*. Cell. Mol. Life Sci., 69: 3259-3267.
- GRIFFITHS S., SHARP R., FOOTE T.N., BERTIN I., WANOUS M., READER S., COLAS I., MOORE G., 2006 – *Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat*. Nature, 439: 749-752.
- MAO X., ZHANG H., TIAN S., CHANG X., JING R., 2010 – *TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (Triticum aestivum L.), confers enhanced multistress tolerance in Arabidopsis*. J. Exp. Bot., 61: 683-696.
- RAMPINO P., MITA G., FASANO P., BORRELLI G.M., APRILE A., DALESSANDRO G., DE BELLIS L., PERROTTA C., 2012 – *Novel durum wheat genes up-regulated in response to a combination of heat and drought stress*. Plant Physiol. Bioch., 56: 72-78.
- SHARMA K.K., LAVANYA M., 2002 – *Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics*. JIRCAS Working Report: 61-73.
- ZHANG H., MAO X., JING R., CHANG X., XIE H., 2011 – *Characterization of a common wheat (Triticum aestivum L.) TaSnRK2.7 gene involved in abiotic stress responses*. J. Exp. Bot., 62: 975-988.

**RIASSUNTO** – Le piante sono esposte a numerosi stress ai quali rispondono attivando specifici meccanismi che prevedono una riprogrammazione dell'attività genetica. Oggetto di questo lavoro è un cDNA di 543 bp, denominato *Td4IN2*, relativo ad un gene espresso nelle piante di grano duro sottoposte a stress idrico. Mediante RACE è stata ricostruita la sequenza completa del cDNA ed è stata amplificata la regione genomica corrispondente. La proteina codificata da questo gene presenta il dominio caratteristico delle protein-chinasi C, poco caratterizzate nel regno vegetale. Mediante trasformazione transiente di protoplasti, è stato evidenziato che la proteina si localizza nel citosol, nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico. Infine è stata valutata l'espressione del gene *Td4IN2* in piantine di grano duro sottoposte a differenti stress: si osserva la sua espressione in risposta a stress idrico, da freddo e da acido abscissico. Questo studio ha permesso di caratterizzare, per la prima volta in grano duro, un gene codificante per una protein-chinasi C coinvolta nella risposta agli stress abiotici.

## Effetto dello stress termico sull'attività delle xiloglucano endotrans-glicosilasi (XET) in apici radicali di plantule di frumento duro

A. IURLARO, M. DE CAROLI, P.P. MARRESE, M. DE PASCALI, P. RAMPINO, G. DALESSANDRO, G. PIRO, M.S. LENUCCI

**ABSTRACT** - *Effect of heat stress on xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity in root apical segments of durum wheat seedlings* - XET activity was evaluated in root tips of durum wheat seedlings (*Triticum durum* Mill., cv. Creso) subjected to 0, 2, 4 and 24 hours of heat stress (42 °C). Stress significantly reduced XET activity either *in vitro* or *in vivo*. At microscopic level conflicting XET activity variations were observed in dependence on the gradient of cell differentiation. In the root portion comprising the cap and apical meristem, XET activity was stable even after 24 hours at 42 °C. At the elongation zone, stress caused a considerable increase in XET activity (-65 %). Finally, at the hair region, a gradual reduction of the XET activity was observed in stressed roots. This localized increase of XET activity may represent an adaptive response to heat stress by promoting the rapid elongation of the root cells to explore deep soil.

*Key words:* cell-wall, cereals, glycosyl-hydrolases, heat stress, xyloglucans

### INTRODUZIONE

La coltivazione del frumento duro rappresenta un comparto di grande rilevanza per l'agricoltura dell'area mediterranea ed in particolare per l'Italia, principale produttore Europeo. La maggior parte della produzione di frumento duro italiana è concentrata nelle regioni insulari e meridionali, particolarmente suscettibili a situazioni stagionali di stress termico. Le piante hanno sviluppato risposte complesse per ridurre al minimo i danni dovuti all'esposizione ad alte temperature. Alterazioni dell'espressione di un gran numero di geni sono state osservate entro pochi minuti dalla percezione dello stress e si traducono nella sintesi massiva di *heat shock proteins* (HSPs) e nella contemporanea riduzione generalizzata della sintesi di altre proteine (ALTSCHULER, MASCARENHAS, 1985).

La parete cellulare è la prima struttura coinvolta nella percezione e trasduzione dei segnali extracellulari. Attraverso la complessa interazione parete-protoplasto le proprietà chimico-fisiche della cellula possono essere modulate in risposta alle condizioni ambientali. La parete svolge, inoltre, un ruolo fondamentale nei processi di crescita e differenziamento morfologico delle cellule mediante l'integrazione, riorganizzazione e riorientamento finemente regolato di ciascuno dei suoi componenti. Le xiloglucano endo-

trans-glicosilasi (XET) sono enzimi direttamente coinvolti nel rimodellamento del network polisaccaridico che costituisce l'intelaiatura portante della parete vegetale. *In muro*, catalizzano la scissione di una catena xiloglucanica e la successiva ligazione ad una catena accettrice diversa promuovendo sia i processi di allentamento della parete cellulare che l'integrazione di xiloglucani di nuova sintesi (Fig. 1) (FRANKOVÁ, FRY, 2013).

I fattori in grado di influenzare l'attività di XET sono numerosi e includono ormoni (gibberelline, acido abscissico, auxine, brassinosteroidi) e diversi stress come ad esempio l'esposizione a basse temperature o a prolungata anossia (XU *et al.*, 1996).

In questo lavoro abbiamo studiato eventuali variazioni nell'attività di XET in segmenti apicali di radice di plantule di frumento duro sottoposte a stress termico; tali variazioni potrebbero avere un ruolo nella tolleranza allo stress.

### MATERIALI E METODI

Plantule di frumento duro (*Triticum durum* Desf., cv. Creso) di circa 5 giorni sono state incubate a 24 °C (controllo) e a 42 °C (stress termico) per 0, 2, 4 e 24 ore. Al termine del periodo d'incubazione da ciascuna radice è stato sezionato un segmento di circa

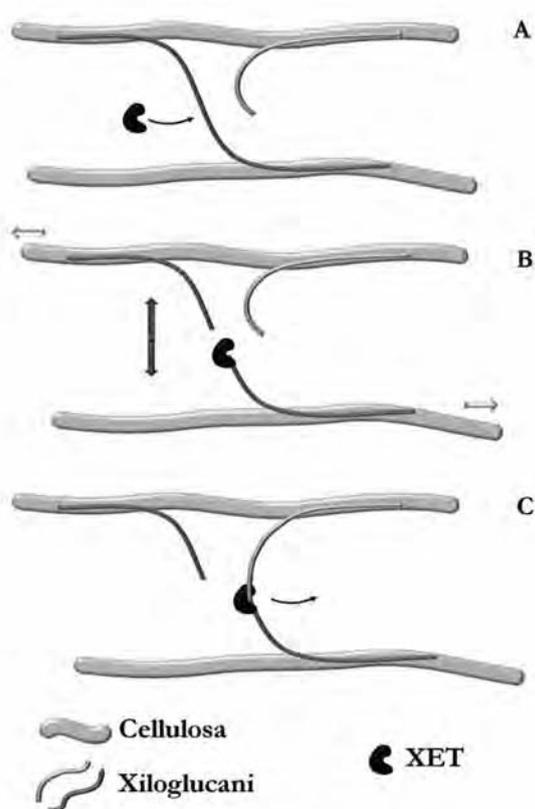


Fig. 1

XET catalizza la scissione idrolitica di uno xiloglucano che fa da ponte tra due microfibrille di cellulosa (A); l'enzima rimane attaccato all'estremità riducente neo-formata e rilascia quella non-riducente (B). XET catalizza la formazione di un nuovo legame glicosidico tra l'estremità riducente e quella non-riducente di un altro xiloglucano (C). XET cleaves a xyloglucan strand that bridges between cellulose microfibrils (A); the enzyme remains attached to the newly formed reducing end, while releasing the non-reducing end (B). Finally XET catalyzes the formation of a new glycosidic bond between the newly formed reducing end and a non-reducing end of another xyloglucan (C).

1 cm a partire dall'apice. I segmenti apicali sono stati congelati in azoto liquido, liofilizzati, ridotti in polvere e incubati nel buffer di estrazione [succinato ( $\text{Na}^+$ ) 0,2 M, pH 5.5 + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  + 2% w/v polivinilpoli-pirrolidone], aggiunto in rapporto 20:1 rispetto al peso del materiale liofilizzato. Dopo 2 ore di estrazione a 4 °C, sotto agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 10.000g. Il sovranatante (estratto grezzo contenente XET) è stato recuperato ed utilizzato per le analisi successive.

L'attività di XET negli estratti è stata saggiata con un metodo *dot-blot* (FRY, 1997) che si basa sulla capacità dell'enzima di catalizzare *in vitro* il trasferimento di un eptasaccaride sulfurodaminato (XXXG-SR) su un substrato esogeno accettore (xiloglucani) rendendolo fluorescente. L'attività di XET è stata espressa

come nmol XXXG trasferiti al substrato nella reazione di transglicosilazione/mg proteine totali nell'estratto. Quest'ultimo parametro è stato quantificato secondo il metodo di BRADFORD (1976). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica basata sul test ANOVA (One Way). Il metodo post-hoc di Holm Sidak è stato applicato per stabilire differenze significative tra le medie con un livello di confidenza del 95%.

La valutazione dell'attività enzimatica di XET *in vivo* a livello di apparato radicale è stata effettuata secondo la procedura di VISSENBERG *et al.* (2003). Brevemente, piantule di circa 5 giorni sono state incubate a 24 °C e 42 °C in una soluzione 0,65  $\mu\text{M}$  di XXXG-SR per 24 ore. Le radici sono state asportate a livello della cariosside e lavate per 10 minuti in una soluzione etanolo/acido formico/acqua (15:1:4 v/v/v) e, successivamente, in acido formico al 5%, *overnight*. Al termine del trattamento, le radici sono state osservate al microscopio confocale ( $\lambda$  eccitazione = 488 nm;  $\lambda$  emissione 581-589 nm). La fluorescenza è stata quantificata utilizzando il software *shareware ImageJ*.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'estratto grezzo ottenuto dai segmenti apicali delle radici di piantule controllo la quantità di proteine totali si attesta intorno a -19 mg/g di tessuto secco. Le variazioni nel quantitativo proteico totale osservate dopo 2 (-21 mg/g), 4 (-18 mg/g) e 24 (-16,5 mg/g) ore di stress termico non sono risultate statisticamente significative ( $p=0,119$ ).

L'attività enzimatica di XET riscontrata negli estratti grezzi preparati dai segmenti apicali delle piantule controllo e stressate è riportata in Fig. 2. Il test statistico ha evidenziato differenze altamente significative tra controllo e campioni stressati ( $p<0,001$ ;  $n=30$ ). Dopo 2 ore di incubazione a 42 °C si osserva un'inibizione dell'attività di XET di circa il 60% rispetto al controllo. La percentuale di inibizione rimane identica dopo 4 ore di stress e si riduce a circa il 40% dopo 24 ore, lasciando ipotizzare un adattamento della piantula al calore.

L'attività di XET valutata *in vivo* a livello di segmento apicale di radici controllo e stressate per 24 ore è riportata in Fig. 3. L'osservazione microscopica, condotta visualizzando in successione segmenti di radice della dimensione di 0,5 millimetri partendo dall'apice ha, in linea generale, confermato i risultati ottenuti *in vitro* ovvero una riduzione (-10%) dell'attività di XET complessiva a livello dell'intero segmento di 0,7 cm rispetto al controllo. Tuttavia, considerando le variazioni dell'attività di XET in funzione della distanza dall'apice, è risultato evidente che essa è influenzata in modo differenziale in dipendenza dal gradiente di differenziamento cellulare. Nel primo millimetro (zona che comprende la cuffia, il meristema apicale e la porzione iniziale della zona di accrescimento per distensione) l'attività di XET è presso-

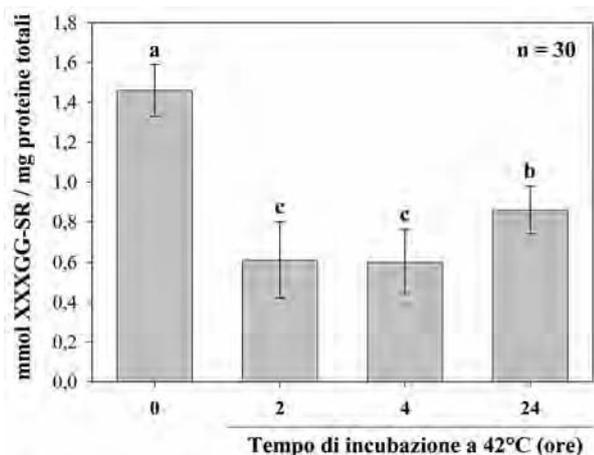


Fig. 2

Attività di XET negli estratti grezzi ottenuti da segmenti apicali (~1 cm) di radici di piantule di frumento duro incubate a 42 °C per 0 (controllo), 2, 4 e 24 ore. I risultati rappresentano la media di 30 repliche indipendenti  $\pm$  errore standard. Lettere differenti identificano variazioni statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

XET activity in crude extracts obtained from apical root segments (~1 cm) of durum wheat seedlings incubated at 42 °C for 0 (control), 2, 4 and 24 hours. The results represent the average of 30 independent replicates  $\pm$  standard error. Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0,05$ ).

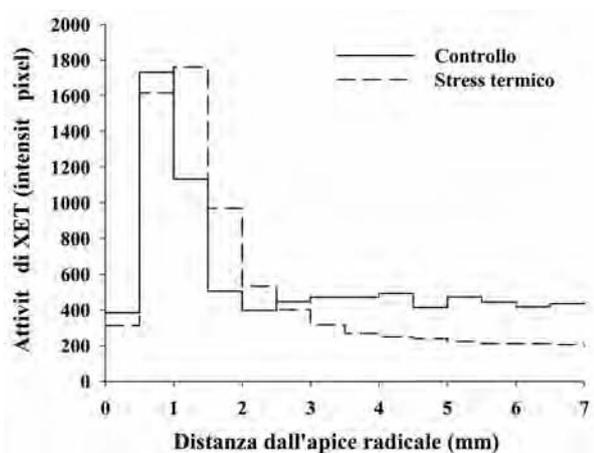


Fig. 3

Attività di XET *in vivo* in segmenti di radice (0,7 cm a partire dall'apice) in piante controllo e sottoposte a 24 ore di stress termico (42 °C).

*In vivo* XET activity in root segments (0,7 cm from the root tip) from control and 24 hours heat (42 °C) stressed plants.

ché identica nelle radici controllo ed in quelle stressate. Nel segmento di radice compreso tra 1 mm e 2,5 mm a partire dall'apice (zona di distensione) l'at-

tività di XET è fortemente e repentinamente aumentata (~65%) rispetto a quella del rispettivo segmento controllo.

A partire dal terzo millimetro (cellule completamente distese) si osserva una consistente e progressiva riduzione dell'attività di XET nei campioni stressati rispetto al controllo.

È nota la correlazione diretta tra l'attività di XET ed il tasso di crescita della pianta (FRANKOVÁ, Fry, 2013). L'aumento dell'attività di XET localizzato alla zona di distensione della radice potrebbe rappresentare una risposta adattativa allo stress termico. XET infatti potrebbe essere coinvolta in processi di "avoidance" dello stress termico favorendo la rapida crescita dell'apparato radicale ed il raggiungimento di zone profonde del terreno

*Ringraziamenti* - Questo lavoro è stato supportato da fondi PRIN-MIUR 2010-2011, Prot. 2010Z77XAX\_002.

#### LETTERATURA CITATA

- ALTSCHULER M., MASCARENHAS J.P., 1985 – *Transcription and translation of heat shock and normal protein in seedlings and developing seeds of soybean exposed to a gradual temperature increase*. Plant Mol. Biol., 5: 291-297.
- BRADFORD M.M., 1976 – *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- FRANKOVÁ L., FRY S.C., 2013 – *Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides*. J. Exp. Bot., 64: 3519-3550.
- FRY S.C., 1997 – *Novel 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: optimization for xyloglucan endotransglucosylase (XET) activity*. Plant J., 11: 1141-1150.
- VISSENBERG K., VAN SANDT V., FRY S.C., VERBELEN J-P., 2003 – *Xyloglucan endotransglucosylase action in the root elongation zone and in the trichoblasts of all vascular plants from Selaginella to Zea mays*. J. Exp. Bot., 54: 335-344.
- XU W., CAMPBELL P., VARGHEESE A.K., BRAAM J., 1996 – *The Arabidopsis XET-related gene family: Environmental and hormonal regulation of expression*. Plant J., 9: 879-889.

**RIASSUNTO** - In questo lavoro è stata valutata l'attività delle xiloglucano endotransglucosilasi (XET) in apici radicali di piantule di frumento duro (*Triticum durum* Desf., cv Cresco) sottoposte a 0, 2, 4 e 24 ore di stress termico (42 °C). Sia *in vitro* che *in vivo* l'attività di XET è significativamente ridotta in condizioni di stress. A livello microscopico, tuttavia, sono state osservate variazioni contrastanti dell'attività di XET in dipendenza dal gradiente di differenziamento cellulare. Nella porzione di radice comprendente la cuffia e la zona di crescita per divisione (meristema apicale) l'attività di XET non subisce variazioni dopo 24 ore a 42 °C. Nella zona di distensione, lo stress determina un considerevole aumento dell'attività di XET (~65%). Nella zona pilifera, infine, si osserva una progressiva riduzione dell'attività di XET nei campioni stressati rispetto a quella del corrispettivo segmento controllo.

Questo incremento localizzato dell'attività XET potrebbe rappresentare una risposta adattativa allo stress termico promuovendo la rapida distensione delle cellule della radice e il raggiungimento di zone più profonde del terreno.

#### AUTORI

*Andrea Iurlaro, Monica De Caroli, Pier Paolo Marrese, Mariarosaria De Pascali, Patrizia Rampino, Giuseppe Dalessandro (giuseppe.dalessandro@unisalento.it), Gabriella Piro (gabriella.piro@unisalento.it), Marcello Salvatore Lenucci (marcello.lenucci@unisalento.it), Di.S.Te.B.A., Università del Salento, Via Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce*

## Produzione di composti bioattivi da colture cellulari in sospensione di *Artemisia annua*

F. RIZZELLO, M. DURANTE, A. DE PAOLIS, G. MITA, S. CARETTO

**ABSTRACT** - *Production of bioactive compounds from plant cell suspension cultures of Artemisia annua* - *Artemisia annua* L., a herbal plant, is well known to produce the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin (AN). We established *A. annua* L. cell suspension cultures able to produce intracellular and, more interestingly, extracellular AN. In a previous work,  $\beta$ -cyclodextrins ( $\beta$ -CDs) were demonstrated to increase intracellular and extracellular levels of AN, improving the AN water solubility. The aim of this work was to evaluate the effect of  $\beta$ -CDs on the production of other bioactive isoprenoid compounds. Isoprenoids are important molecules for human health, due to their antioxidant activity, they inhibit the formation of free radicals and counteract the attack of free radicals to biological targets. Therefore, we analyzed carotenoids, chlorophylls, tocopherols and quinones both intracellular and extracellular levels of *A. annua* cell suspension cultures after treatment with  $\beta$ -CDs. The results showed an increase of isoprenoid intracellular content in  $\beta$ -CDs-treated suspension cultures compared to the control. The presence of some isoprenoids in the spent medium of the cell cultures treated with  $\beta$ -cyclodextrins was detected too. Therefore, the addition of  $\beta$ -CDs to the culture medium not only induced an increase of intracellular isoprenoid levels, but also  $\beta$ -CDs induced the secretion of isoprenoids in the culture medium, where they were accumulated and could be easily isolated.

**Keywords:** *Artemisia annua* L., cyclodextrin, isoprenoids, plant cell suspension cultures

### INTRODUZIONE

Il genere *Artemisia* comprende più di 300 specie. È una pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle *Asteraceae* e nota in Cina con il nome "qinghao". CARVALHO *et al.* (2011) hanno descritto l'utilizzo delle piante di *Artemisia* nella cura di malattie infiammatorie, nelle infezioni da parte di funghi, virus e batteri, nel trattamento di ulcere gastriche, tumori e altro ancora. Una delle specie più studiate del genere *Artemisia* è *Artemisia annua* L., pianta usata per molti secoli nella medicina popolare cinese nel trattamento della malaria e della febbre per la presenza del metabolita bioattivo più importante che è l'artemisinina (AN), un sesquiterpene lattone endoperossido. L'AN e i suoi derivati attualmente sono i farmaci più importanti per il trattamento della malaria e fanno parte di un cocktail multidrug, che prende il nome di *artemisinin combination therapy* (ACT). Sebbene l'AN possa essere sintetizzata *de novo* in laboratorio, tuttavia la bassa resa e la procedura multi-step fanno sì che l'unica fonte possibile di artemisinina rimanga la pianta coltivata in campo. La pianta di *A. annua*, dopo 4-6 mesi di crescita, produce dallo 0,1 all'1% del peso secco di AN, e la produzione varia anche in base alle condizioni ambientali. È prodotta dalle parti aeree della pianta e accu-

mulata nei tricomi ghiandolari delle foglie. Poiché la produzione di AN da parte della pianta è bassa e la sintesi chimica molto difficile e costosa, si sta cercando di migliorarne la produzione attraverso una serie di approcci, tra i quali l'utilizzo di colture cellulari che rappresentano dei sistemi controllati, continui e svincolati da limitazioni dovute alla stagionalità e all'attacco di patogeni.

A tale scopo sono state allestite delle colture cellulari in sospensione di *A. annua* in grado di produrre AN e, in particolare, di rilasciarla nel mezzo di coltura (CARETTO *et al.*, 2011). Spesso anche la produzione *in vitro* presenta il limite delle scarse rese e per questo motivo è necessario utilizzare elicitatori per aumentare la resa. In un precedente lavoro le  $\beta$ -CDs, utilizzate come elicitatori, si sono rivelate utili nell'aumentare i livelli intracellulari ed extracellulari di AN (DURANTE *et al.*, 2011).

Le ciclodestrine sono oligomeri ciclici non-riducenti costituite da unità di glucosio con legami  $\alpha$ -1,4. Derivano dalla trasformazione dell'amido ad opera di ciclodestrine glicosil transferasi batteriche, (SZEJTLI, 1982). Le più comuni sono le  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CDs e sono costituite da sei, sette o otto unità di glucosio rispettivamente. Le ciclodestrine possiedono una forma

conica con una porzione esterna idrofilica e una cavità lipofila in grado di formare complessi d'inclusione con molecole ospiti di basso peso molecolare. È stato riportato che le  $\beta$ -CDs possono agire come veri elicitori inducendo la biosintesi del metabolita secondario in diverse colture cellulari vegetali (ZAMBONI *et al.*, 2009).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti delle  $\beta$ -CDs sulla produzione di altre molecole bioattive appartenenti al gruppo degli isoprenoidi. Pertanto, sono stati determinati i livelli sia intracellulari che extracellulari di carotenoidi, clorofille, tocoferoli e chinoni nelle colture cellulari in sospensione di *A. annua* trattate e non con  $\beta$ -CDs.

## MATERIALI E METODI

### Allestimento colture cellulari

Le colture in sospensione di *A. annua* sono state mantenute in terreno MS contenente i regolatori della crescita come descritto da CARETTO *et al.* (2011). I trattamenti con  $\beta$ -CD sono stati eseguiti in triplo su colture cellulari di *A. annua* al 15° giorno di crescita. Le cellule sono state risospese con terreno fresco addizionato con 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodestrine (DIMEB  $\beta$ -CD), ad una concentrazione di 50mM e incubate per 3 e 7 giorni. Le cellule controllo, invece, sono state risospese con terreno fresco senza ciclodestrine. Dopo il trattamento, le cellule sono state filtrate, il mezzo è stato raccolto e le cellule e il mezzo sono stati utilizzati per l'estrazione degli isoprenoidi.

### Estrazione degli isoprenoidi

Gli isoprenoidi sono stati determinati secondo il metodo di SADLER *et al.* (1990) modificato da PERKINS-VEAZIE *et al.* (2001), con alcune modificazioni per adattarlo alle colture cellulari.

Per ogni campione è stata prelevata un'aliquota da 50 mg di cellule liofilizzate (per i mezzi 3mL) e trasferite in falcon da 50 mL. In ciascun falcon sono stati aggiunti 5 mL di BHT (Butilato di Idrossi Toluene) 0,05% (w/v) in acetone, 5 mL di etanolo al 95% e 10 mL di esano. I falcon sono stati posti in ghiaccio e in agitazione sull'agitatore orbitale a 180 rpm per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 3 mL di acqua bidistillata e i falcon sono stati posti in agitazione per altri 5 minuti. Al termine dei 5 minuti i campioni sono stati centrifugati a 4000rpm per 10 minuti in modo da consentire la separazione di fase (i carotenoidi si trovano nella fase superiore di esano). Gli estratti ottenuti sono stati portati a secco al rotavapor e risospesi con 1 mL di esano. L'estratto risospeso in esano è stato successivamente portato a secco allo speedvac e risospeso con 100 $\mu$ L di etilacetato (50 $\mu$ L per i mezzi) solo poco prima dell'analisi HPLC.

### Analisi all'HPLC degli isoprenoidi

L'identificazione e quantificazione degli isoprenoidi è stata effettuata secondo il metodo di FRASER *et al.* (2000). Le analisi sono state condotte utilizzando un HPLC Agilent 1200 con rivelatore spettrofotometri-

co. La separazione è stata effettuata a 31 °C su una colonna YNC, Milford, MA C30 (5 mm, 250 x 4,6mm), con un flusso di 1mL al min. La fase mobile utilizzata era costituita da: metanolo (soluzione A), H<sub>2</sub>O:metanolo 20:80 (v/v) contenente 0,2% di ammonio acetato (soluzione B) e metil-t-butil etere (soluzione C). Di ciascun estratto sono stati iniettati 10 mL. Le letture cromatografiche sono state effettuate alla lunghezza d'onda (l) di 475 nm per i carotenoidi, 290 nm per i tocoferoli, 275 nm per i chinoni e 657 nm per le clorofille. Il tempo di eluizione utilizzato è stato pari a 60 min, seguito da un intervallo di 10 min di ricondizionamento della colonna. La fase mobile nelle condizioni iniziali era così costituita: (A) 95%, (B) 5% e (C) 0%. Tali concentrazioni sono state variate linearmente. In particolare, al tempo pari a 12 minuti il solvente A diminuiva fino all'80%, il solvente B era mantenuto costante e il solvente C raggiungeva il 15%. Nei 30 min successivi B era sempre costante mentre A diminuiva fino al 30% e C aumentava fino al 65%. Tali condizioni sono state mantenute costanti fino a 60 min. A 62 min sono state raggiunte le condizioni iniziali.

## RISULTATI

L'analisi del contenuto intracellulare di isoprenoidi ha rivelato che le cellule esposte al trattamento con le DIMEB 50mM per 3 giorni hanno mostrato un livello significativamente più alto di carotenoidi, chinoni e clorofille fino a 3 volte rispetto al controllo; invece, dopo 7 giorni di trattamento, i livelli di isoprenoidi non risultavano diversi dal controllo (Fig. 1).

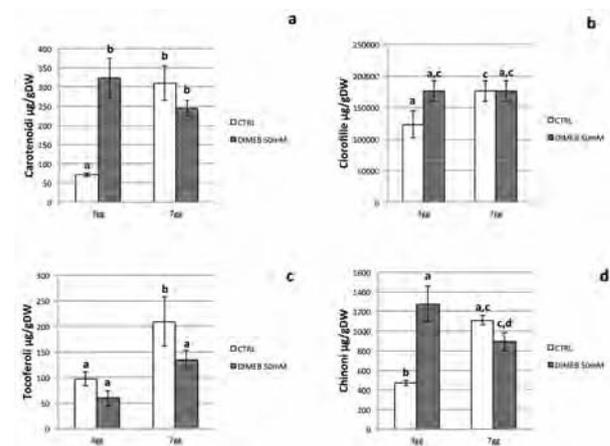


Fig. 1

Contenuto intracellulare di isoprenoidi in colture cellulari in sospensione di *A. annua* (a: carotenoidi, b: tocoferoli, c: chinoni, d: clorofille).

Intracellular content of isoprenoids in *A. annua* suspension cultures (a: carotenoids, b: tocopherols, c: quinones, d: chlorophylls).

In Fig. 2 sono riportati i livelli extracellulari degli isoprenoidi durante il tempo di trattamento. Nei campioni controllo non è stata osservata la presenza di

isoprenoidi a parte tracce di carotenoidi. Nei mezzi dei campioni trattati non si osserva la presenza di tocoferoli, mentre si osserva un aumento nel tempo dei livelli di carotenoidi e chinoni. Infine, le clorofille hanno la massima produzione solo dopo tre giorni di trattamento.

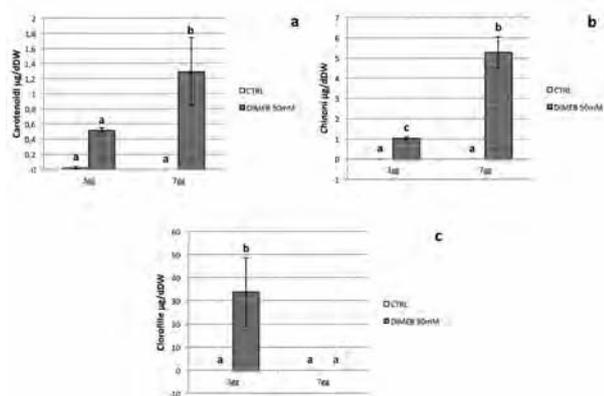


Fig. 2

Livelli extracellulari di isoprenoidi in colture cellulari in sospensione *A. annua* (a: carotenoidi, b: chinoni, c: clorofille).

Extracellular levels of isoprenoids in *A. annua* suspension cultures (a: carotenoids, b: quinones, c: chlorophylls).

#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le CDs sono note per la capacità di aumentare la solubilità di molecole lipofile, formando dei complessi di inclusione host-guest con composti non polari. L'attività delle CDs native è risultata anche maggiore in seguito alla presenza di modificazioni chimiche (alchilazioni, esterificazioni, glicosilazioni o sostituzioni) (USUDA *et al.*, 2000; ILLAPAKURTHY *et al.*, 2003; ANSARI *et al.*, 2009). È stato dimostrato che molecole liposolubili, quali tocoferoli e carotenoidi, sono in grado di formare complessi di inclusione con le  $\beta$ -CDs ed in questo modo essere solubilizzate e stabilizzate (OKADA *et al.*, 1990; WATANABE *et al.*, 2009). Recentemente, è stato riportato che le  $\beta$ -CDs agiscono come elicitori inducendo la biosintesi di metaboliti secondari in differenti colture vegetali in sospensione. In seguito a studi condotti con le DIMEB è stato osservato un significativo aumento della produzione di resveratrolo, di artemisinina e di fitosterolo in colture cellulari in sospensione di *Vitis vinifera* L., *A. annua* e in *Daucus carota* L. rispettivamente (BRU *et al.*, 2006; LIJAVETZKY *et al.*, 2008, DURANTE *et al.*, 2011, SABATER-JARA, PEDREÑO 2013). Sulla base di queste informazioni, è stato condotto uno studio per investigare se le DIMEB potessero avere simili effetti in colture cellulari in sospensione di *A. annua* per la produzione di isoprenoidi, in particolare di carotenoidi, clorofille, tocoferoli e chinoni.

L'abilità delle DIMEB di determinare un aumento totale del contenuto intracellulare di isoprenoidi

nelle colture cellulari di *A. annua* dopo tre giorni di trattamento potrebbe essere assimilata alla similarità chimica delle  $\beta$ -CDs agli oligosaccaridi pectici rilasciati dalla parete cellulare dopo infezione fungina, come suggerito nel caso delle colture cellulari in sospensione di *V. vinifera* trattate con  $\beta$ -CDs (BRU *et al.*, 2006). Pertanto, l'aggiunta delle  $\beta$ -CDs simulerrebbe uno stress di tipo biotico e la più elevata produzione di molecole bioattive rappresenterebbe la risposta cellulare allo stimolo indotto. L'analisi di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo degli isoprenoidi in colture cellulari in sospensione di *A. annua*, che è attualmente in corso, potrà chiarire se si tratti di un aumento del flusso biosintetico.

L'aggiunta delle DIMEB al mezzo di coltura ha permesso la "secrezione" degli isoprenoidi nel terreno di coltura portando a un aumento nel tempo di trattamento dei livelli intracellulari di carotenoidi e chinoni. Mentre le clorofille hanno la massima produzione dopo tre giorni di trattamento, questo andamento potrebbe essere dovuto alla conversione delle clorofille in feofitina e/o clorofillide causato dalla luce durante il periodo di trattamento (ZENG *et al.*, 1991). La secrezione degli isoprenoidi nel mezzo consentirebbe un più facile isolamento di queste molecole che potrebbero essere utilizzate in diversi processi industriali per la produzione di nutraceutici, additivi alimentari, ingredienti per cosmetici ecc.

#### LETTERATURA CITATA

- ANSARI M.T., IQBAL I., SUNDERLAND V.B., 2009 – *The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability*. Arch. Pharm. Res., 32: 155-165.
- BRU R., SELLÉS S., CASADO-VELA J., BELCHI-NAVARRO S., PEDREÑO M.A., 2006 – *Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures*. J. Agr. Food Chem., 54: 65-71.
- CARETTO S., QUARTA A., DURANTE M., NISI R., DE PAOLIS A., BLANDO F., MITA G., 2011 – *Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in Artemisia annua suspension cultures*. Plant Biol., 13: 51-58.
- CARVALHO I.S., CAVACO T., BRODELIUS M., 2011 – *Phenolic composition and antioxidant capacity of six Artemisia species*. Ind. Crops Prod., 33: 382-388.
- DURANTE M., CARETTO S., QUARTA A., DE PAOLIS A., NISI R., MITA G., 2011 –  *$\beta$ -Cyclodextrins enhance artemisinin production in Artemisia annua suspension cell cultures*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 90: 1905-1913.
- FRASER P.D., PINTO M.E.S., HOLLOWAY D.E., BRAMLEY P.M., 2000 – *Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids*. Plant J., 24: 551-558.
- ILLAPAKURTHY A.C., SABNIS Y.A., AVERY B.A., AVERY M.A., WYANDT C.M., 2003 – *Interaction of artemisinin and its related compounds with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in solution state: experimental and molecular-modeling studies*. J. Pharm. Sci., 92: 649-655.
- LIJAVETZKY D., ALMAGRO L., BELCHI-NAVARRO S., MARTINEZ-ZAPATER J.M., BRU R., PEDREÑO A., 2008 – *Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cul-*

- tures. BMC Res Notes, 1: 132.
- OKADA Y., TACHIBANA M., KOIZUMI K., 1990 – Solubilization of lipid-soluble vitamins by complexation with glucosyl- $\beta$ -cyclodextrin. Chem. Pharm. Bull., 38(7): 2047-2049.
- PERKINS-VEAZIE P., COLLINS J.K., PAIR S.D., ROBERTS W., 2001 – Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. J. Sci. Food Agric., 81: 983-987.
- SABATER-JARA A.B., PEDREÑO M.A., 2013 – Use of  $\beta$ -Cyclodextrins to enhance phytosterol production in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota L.*). Plant Cell Tiss. Organ Cult., 114: 249-258.
- SADLER G., DAVIS J., DEZMAN D., 1990 – Rapid Extraction of Lycopene and  $\beta$ -Carotene from Reconstituted Tomato Paste and Pink Grapefruit Homogenates. J. Food Sci., 55(5): 1460-1461.
- SZEJTLI J., 1982 – Chemistry and preparation of cyclodextrins. In: SZEJTLI J. (Ed.), Cyclodextrins and their inclusion complexes: 17-40. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- USUDA M., ENDO T., NAGASE H., TOMONO K., UEDA H., 2000 – Interaction of antimalarial agent artemisinin with cyclodextrins. Drug Dev. Ind. Pharm., 26: 613-619.
- WATANABE Y., YAMASHITA T., YAMASHITA M., ADACHI S., 2009 – Suppressive Effect of  $\alpha$ -Tocopherol Complexed with  $\beta$ -Cyclodextrin on the Oxidation of Methyl Linoleate. Food Sci. Technol. Res., 15: 479-482.
- ZAMBONI A., GATTO P., CESTARO A., PILATI S., VIOLA R., MATTIVI F., MOSER C., VELASCO R., 2009 – Grapevine cell early activation of specific response to DIMEB, a resveratrol elicitor. BMV Genomics., 10: 363.
- ZENG S.X., WANG Y.R., LIU H.X., 1991 – Some enzymatic reactions related to chlorophyll degradation in cucumber cotyledons under chilling in the light. Acta Phytophysiological Sinica., 17: 177-182.
- RIASSUNTO - *Artemisia annua* L. è una pianta erbacea ed è ben nota per la produzione del sesquiterpene lattone antimalarico artemisinina (AN). Sono state precedentemente allestite colture cellulari in sospensione di *A. annua* in grado di produrre AN intracellulare e, in particolare, AN extracellulare. In un precedente lavoro, DIMEB hanno dimostrato di aumentare i livelli intracellulari ed extracellulari di AN, migliorando la solubilità dell'AN in un mezzo acquoso. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto della  $\beta$ -CDs sulla produzione di isoprenoidi (carotenoidi, tocoferoli, clorofille e chinoni). Gli isoprenoidi sono molecole importanti per la salute umana; grazie alla loro attività antiossidante inibiscono la formazione dei radicali liberi e contrastano l'attacco dei radicali liberi a bersagli biologici. Pertanto, abbiamo analizzato sia i livelli intracellulari che i livelli extracellulari di carotenoidi, clorofille, tocoferoli e chinoni in colture cellulari in sospensione di *A. annua* dopo trattamento con le  $\beta$ -CDs. I risultati hanno mostrato un aumento del contenuto intracellulare di isoprenoidi nelle colture trattate con le  $\beta$ -CDs rispetto al controllo. In particolare, è stata rilevata la presenza di alcuni isoprenoidi nel mezzo di coltura delle cellule trattate con le  $\beta$ -CDs. Pertanto, l'aggiunta di  $\beta$ -CDs al mezzo di coltura non solo ha indotto un aumento dei livelli intracellulari di isoprenoidi, ma le  $\beta$ -CDs avrebbero anche indotto la secrezione degli isoprenoidi nel mezzo di coltura, dove essi si possono accumulare ed essere facilmente isolati.

## AUTORI

Francesca Rizzello (rizzellofrancesca@libero.it), Miriana Durante, Angelo De Paolis, Giovanni Mita, Sofia Caretto, Istituto di Scienze e delle Produzioni Alimentari, CNR-ISPA-Sezione di Lecce, Via Monteroni, 73100 Lecce

## Variabilità della tolleranza alla siccità e alle alte temperature in una collezione di frumenti tetraploidi

M. DE PASCALI, C. GALATI, F. LEUCCI, V. FALCO, M.S. LENUCCI, P. RAMPINO, C. PERROTTA

**ABSTRACT** - *Variability of tolerance to drought and high temperatures in a collection of tetraploid wheats* - Drought and high temperatures are considered the two major environmental factors limiting crop growth and yield because of many biochemical, molecular, and physiological changes that induce responses influencing various cellular and whole-plant processes. The aim of this work was to study a collection of tetraploid wheats for their response to drought and heat stress. The analysis was performed by physiological tests (RWC and CMS) on ten-day-old seedlings. The results obtained indicate a high variability in drought and heat stress tolerance. Moreover at least two genotypes were identified that are characterized by high tolerance to both drought and heat stress.

*Key words*: stress response, thermotolerance, tetraploid wheat, water deficit

### INTRODUZIONE

Siccità, estreme temperature, alta salinità sono tra i fattori ambientali che in misura maggiore compromettono la crescita di una pianta, pregiudicando pesantemente la produttività e la qualità delle colture. Si stima che soltanto il 10% della superficie coltivata nel mondo possa essere classificata nella categoria "non stress", mentre il restante 90%, con diversa intensità, può essere soggetto a stress singoli e combinazioni di stress (SHARMA, LAVANYA, 2002) che provocano alterazioni a livello dell'intera pianta, a livello tissutale e a livello cellulare (WANG *et al.*, 2001). Il tipo e l'intensità della risposta allo stress dipendono principalmente dalla specie e dal genotipo, ma anche dalla durata, dalla severità e dalla velocità di imposizione dello stress, dall'età e dallo stadio di crescita della pianta, dall'organo e dal tipo cellulare (BRAY *et al.*, 2000). Il frumento, come tutte le piante, non è in grado di sottrarsi agli stress ambientali che ne influenzano lo sviluppo e la crescita; tra questi, il più importante è lo stress idrico o siccità. In molte regioni del mondo il frumento si semina in autunno sul terreno asciutto e senza apporto di acqua nelle prime fasi di crescita; la carenza idrica si ha quindi all'inizio dello sviluppo. Al contrario, nell'area del Mediterraneo, e quindi nelle regioni italiane dove si coltiva grano duro, è più frequente che lo stress idrico, associato a temperature elevate, si verifichi nella fase di post-fioritura. Lo scopo di questo

lavoro è stato l'analisi di una collezione di genotipi di frumento tetraploide per valutare la variabilità della tolleranza dei diversi genotipi a siccità e temperature elevate.

### MATERIALI E METODI

Su una collezione di 134 genotipi di frumento tetraploide, riportati nella Tab. 1, sono stati effettuati test fisiologici specifici. La tolleranza allo stress idrico è stata valutata mediante la determinazione del contenuto idrico relativo (*Relative Water Content*, RWC). Il test è stato eseguito come già riportato da Rampino e collaboratori (RAMPINO *et al.*, 2006). La tolleranza allo stress da alte temperature è stata valutata mediante il test CMS (*Cell Membrane Stability*) che valuta la stabilità della membrana cellulare come misura della tolleranza intrinseca e/o acquisita allo stress da alte temperature (FOKAR *et al.*, 1998; RAMPINO *et al.*, 2009).

### RISULTATI E DISCUSSIONE

È stata riscontrata una correlazione tra lo stato idrico della pianta e la sua produttività in condizioni di stress idrico (RODRIGUEZ-MARIBONA *et al.*, 1992). La misura dell'RWC costituisce il miglior metodo di valutazione dello stato idrico della pianta (TEULAT *et al.*, 2003). I risultati ottenuti indicano che non esistono differenze significative nei valori di RWC

TABELLA 1

*Elenco dei genotipi analizzati. a:* Triticum turgidum subsp. durum; *b:* Triticum turgidum subsp. turanicum; *c:* Triticum turgidum subsp. polonicum; *d:* Triticum turgidum subsp. turgidum; *e:* Triticum turgidum subsp. carthlicum; *f:* Triticum turgidum subsp. dicoccum; *g:* Triticum turgidum subsp. dicoccoides. Secondo la classificazione di SLAGEREN (1994).

*List of analyzed genotypes. a:* Triticum turgidum subsp. durum; *b:* Triticum turgidum subsp. turanicum; *c:* Triticum turgidum subsp. polonicum; *d:* Triticum turgidum subsp. turgidum; *e:* Triticum turgidum subsp. carthlicum; *f:* Triticum turgidum subsp. dicoccum; *g:* Triticum turgidum subsp. dicoccoides. According to SLAGEREN (1994) classification.

AC Navigator <sup>a</sup>	Karel <sup>a</sup>	Timilia <sup>a</sup>	PI341391 <sup>d</sup>
Altar 84 <sup>a</sup>	Kiperounda <sup>a</sup>	Tito <sup>a</sup>	Citr7665 <sup>e</sup>
Ambral <sup>a</sup>	Kofa <sup>a</sup>	Tiziana <sup>a</sup>	PI94755 <sup>e</sup>
Ancomarzio <sup>a</sup>	Kronos <sup>a</sup>	Trinakria <sup>a</sup>	PI341800 <sup>e</sup>
Antas <sup>a</sup>	L092 <sup>a</sup>	UC1113 <sup>a</sup>	MG5323 <sup>f</sup>
Appio <sup>a</sup>	Langdon <sup>a</sup>	Valnova <sup>a</sup>	MG5473 <sup>f</sup>
Appulo <sup>a</sup>	Latino <sup>a</sup>	Zenit <sup>a</sup>	MG5350 <sup>f</sup>
Arcangelo <sup>a</sup>	Levante <sup>a</sup>	PI 68287 <sup>b</sup>	MG4387 <sup>f</sup>
Arcobaleno <sup>a</sup>	Lloyd <sup>a</sup>	PI 13393 <sup>b</sup>	MG5416/1 <sup>f</sup>
Ardente <sup>a</sup>	Meridiano <sup>a</sup>	PI 167481 <sup>b</sup>	MG15516/1 <sup>f</sup>
Ares <sup>a</sup>	Messapia <sup>a</sup>	PI 191599 <sup>b</sup>	MG5293/1 <sup>f</sup>
Ariosto <sup>a</sup>	Mexicali 75 <sup>a</sup>	PI 306665 <sup>b</sup>	Molise Sel. Colli <sup>f</sup>
Athena <sup>a</sup>	Mida <sup>a</sup>	PI 67343 <sup>b</sup>	ISC Foggia 171 <sup>f</sup>
Aziziah <sup>a</sup>	Mohawk <sup>a</sup>	PI 184526 <sup>b</sup>	Dicoccum Panel Unibo 22 <sup>f</sup>
Belfuggito <sup>a</sup>	Morocco <sup>a</sup>	PI 352514 <sup>b</sup>	Dicoccum Panel Unibo 23 <sup>f</sup>
Brindura <sup>a</sup>	Neodur <sup>a</sup>	PI210845 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 37 <sup>f</sup>
Cappelli <sup>a</sup>	Normanno <sup>a</sup>	PI223171 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 79 <sup>f</sup>
Ciccio <sup>a</sup>	Ofanto <sup>a</sup>	PI272564 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 100 <sup>f</sup>
Cirillo <sup>a</sup>	Parsifal <sup>a</sup>	PI286547 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 133 <sup>f</sup>
Claudio <sup>a</sup>	Pedroso <sup>a</sup>	PI289606 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 14 <sup>f</sup>
Colosseo <sup>a</sup>	Polesine <sup>a</sup>	PI306549 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 48 <sup>f</sup>
Cosmodur <sup>a</sup>	PR22D89 <sup>a</sup>	PI349051 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 68 <sup>f</sup>
Creso <sup>a</sup>	Primadur <sup>a</sup>	PI366117 <sup>c</sup>	Dicoccum Panel Unibo 136 <sup>f</sup>
Dauno <sup>a</sup>	Produra <sup>a</sup>	PI56263 <sup>d</sup>	Dicoccum Panel Unibo 146 <sup>f</sup>
Doral <sup>a</sup>	Rascon/Tarro <sup>a</sup>	PI134946 <sup>d</sup>	Dicoccum Panel Unibo 152 <sup>f</sup>
Duetto <sup>a</sup>	Russello <sup>a</sup>	PI157983 <sup>d</sup>	MG4343 <sup>g</sup>
Duilio <sup>a</sup>	Saadi <sup>a</sup>	PI173503 <sup>d</sup>	MG4328/61 <sup>g</sup>
Fiore <sup>a</sup>	Sansone <sup>a</sup>	PI185723 <sup>d</sup>	MG4330/66 <sup>g</sup>
Giotto <sup>a</sup>	Saragolla <sup>a</sup>	PI191104 <sup>d</sup>	PI481539 <sup>g</sup>
Grecale <sup>a</sup>	Sharm 5 <sup>a</sup>	PI191145 <sup>d</sup>	PI352323 <sup>g</sup>
Grifoni <sup>a</sup>	Simeto <sup>a</sup>	PI191203 <sup>d</sup>	PI355459 <sup>g</sup>
Hmoul/Chabaa <sup>a</sup>	Strongfield <sup>a</sup>	PI286075 <sup>d</sup>	PI470944 <sup>g</sup>
Iride <sup>a</sup>	Svevo <sup>a</sup>	PI352544 <sup>d</sup>	
Isa <sup>a</sup>	Taganrog <sup>a</sup>	PI290522 <sup>d</sup>	

quando le piante sono in condizioni di controllo cioè non sono disidratate (RWC ≈98% per tutti i genotipi). I valori di RWC misurati in seguito a 24 ore di disidratazione sono notevolmente più bassi rispetto a quelli dei controlli e sono compresi tra 55% e 15%. Inoltre, i dati ottenuti indicano differenze significative tra i diversi genotipi analizzati. In particolare, Ardente, Svevo, Claudio sono i genotipi più resistenti con valori di RWC piuttosto alti, compresi tra 45% e 55%. Al contrario valori particolarmente bassi, compresi tra 15% e 25%, si registrano per Simeto e Hmoul/Chabaa, che risultano quindi i genotipi più sensibili allo stress idrico nella nostra collezione.

Il saggio CMS è in grado di valutare l'ammontare del

*leakage* elettrolitico di tessuti vegetali sottoposti a *heat shock in vitro* (52 °C), sfruttando una tecnica conduttimetrica; il valore che si ottiene è un indice della sensibilità o resistenza della membrana cellulare, e quindi della pianta, allo stress termico, che si può attribuire a due forme di termotolleranza: costitutiva e acquisita. La termotolleranza costitutiva, cioè la capacità intrinseca delle piante di tollerare lo stress da alte temperature, è stata determinata su piantine di 10 giorni allevate in camera di crescita a 25 °C, mentre la termotolleranza acquisita, cioè la capacità della pianta di acquisire termotolleranza in seguito ad uno stress moderato, è stata determinata su piantine di 10 giorni dopo averle sottoposte ad uno stress di 34 °C per 24 ore. I risultati ottenuti indicano un'e-

levata variabilità nella tolleranza alle alte temperature tra i genotipi analizzati; i più resistenti allo stress da alte temperature (alta termotolleranza costitutiva) sono Levante, Claudio e Svevo, mentre i sensibili sono Kofa e Ardente. Tuttavia il comportamento di questi genotipi differisce notevolmente per quanto riguarda la capacità di acquisire la termotolleranza; Claudio e Svevo non sono in grado di acquisire termotolleranza, al contrario di Kofa e Ardente per i quali il valore di CMS misurato, relativo alla termotolleranza acquisita, è tre volte più alto rispetto a quello misurato per la termotolleranza costitutiva. Questi risultati sono un'ulteriore conferma che la base genetica di queste due termotolleranze è differente (RAMPINO *et al.*, 2009). Confrontando i risultati ottenuti dai diversi test è stato possibile individuare genotipi, tra cui Claudio e Svevo, caratterizzati da resistenza sia allo stress idrico che allo stress termico. I genotipi selezionati saranno analizzati a livello molecolare al fine di chiarire le basi molecolari della risposta delle piante agli stress idrico e termico ed alla loro combinazione.

*Ringraziamenti* - Questo lavoro è stato realizzato con i fondi del MIUR: progetto PON\_01145-ISCOCEM, PRIN 2010-2011 progetto 2010Z77XAX\_002

#### LETTERATURA CITATA

- BRAY E.A., BAILEY-SERRES J., WERETILNYK E., 2000 – *Responses to abiotic stresses*: 1158-1203. In: BUCHANAN B.B., GRUISSEM W., JONES R., ROCKVILLE L. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*.
- FOKAR M., BLUM A., NGUYEN H.T., 1998 – *Heat tolerance in spring wheat II. Grain Filling*. Euphytica, 104: 9-15
- RAMPINO P., MITA G., PATALEO S., DE PASCALI M., DI FONZO N., PERROTTA C., 2009 – *Acquisition of thermotolerance and HSP gene expression in durum wheat (Triticum durum Desf.) cultivars*. J. Exp. Bot., 61: 683-696.
- RAMPINO P., PATALEO S., GERARDI C., MITA G., PERROTTA C., 2006 – *Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes*. Plant Cell Environ., 29: 112-121.
- RODRIGUEZ-MARIBONA B., TENORIO J.L., CONDE J., AYERVE L., 1992 – *Correlation between yield and of peas (Pisum sativum L.) osmotic adjustment under drought stress*. Field Crop Res., 29: 15-22.
- SHARMA K.K., LAVANYA M., 2002 – *Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics*. JIRCAS Working Report, 61-73.
- SLAGEREN M.W. VAN, 1994 – *Wild wheats: a monograph of Aegilops L. and Amblyopyrum (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae)*. Wageningen Agriculture University Papers, 7: 513.
- TEULAT B., ZOUMAROU-WALLIS N., ROTTER B., BEN SALEM M., BAHRI H., THIS D., 2003 – *QTL for relative water content in field-grown barley and their stability across Mediterranean environments*. Theor. Appl. Genet., 108: 181-188.
- WANG W.X., VINCOUR B., SHOSEYOV O., ALTMAN A., 2001 – *Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations*. Acta Hort., 560: 285-292.

RIASSUNTO – Siccità ed alte temperature sono i due principali fattori di stress ambientali responsabili della perdita quantitativa e qualitativa del raccolto. La risposta delle piante a questi stress si realizza attraverso numerosi cambiamenti fisiologici, biochimici e molecolari, ed è caratterizzata da una notevole variabilità. Lo scopo di questo lavoro è stato l'analisi della variabilità della risposta allo stress idrico e termico in una collezione di genotipi di frumento tetraploide. L'analisi è stata realizzata mediante test fisiologici (RWC e CMS) su piantine di 10 giorni. I risultati ottenuti indicano un'elevata variabilità per la tolleranza sia allo stress idrico sia allo stress termico. Sono inoltre stati individuati almeno due genotipi tolleranti ad entrambi gli stress.

#### AUTORI

Mariarosaria De Pascali, Chiara Galati, Francesca Leucci, Marcello Salvatore Lenucci, Patrizia Rampino, Carla Perrotta, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università del Salento, Via Prov.le Monteroni, 73100 Lecce  
Vittorio Falco, CNR- Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Via Prov.le Monteroni, 73100 Lecce

## Un nuovo approccio per la didattica dell'evoluzione: i videogiochi interattivi *E-MoVe!* (Evoluzione del Mondo Vegetale)

A. GRANO, M.C. DE TULLIO

**ABSTRACT** - *A novel approach to teaching evolution: the interactive videogames of the E-MoVe! project* - Plants are ideal organisms for teaching the basics of evolution, but surprisingly this opportunity has not been fully exploited. The *E-MoVe!* (Evolution of the Plant World) project, funded by the Italian Ministry of Education, aims at establishing and implementing a centre for science education in the specific field of Plant Evolution, based in the Botanical Garden Museum of the University of Bari (Italy). Our permanent exhibition is a tool for designing, validating and disseminating teaching activities on plant evolution. The project also aims at establishing a network of collaborations with National and International institutions. We present here three interactive games for teaching plant evolution: 1. The time machine (basic), in which the player travels in time to discover plants from the past ages and their current progeny. 2. Plant evolution and biodiversity (intermediate), requiring an association between a definition, the picture and the scientific name of a given plant. 3. Gene expression and flower morphology (advanced), based on the ABC model of specification of floral organs, in which the player, by regulating the expression of genes involved in the determination of flower shape, interacts with the development of the *Arabidopsis* flower.

*Key words:* plant evolution, scientific museum, teaching, videogames

### INTRODUZIONE

Il progetto *E-MoVe!* (Evoluzione del Mondo Vegetale) nasce dall'esigenza di sperimentare e condividere nuove modalità di divulgazione nel campo specifico dell'evoluzione (GRANO, DE TULLIO, 2013), un argomento particolarmente rilevante per diversi motivi. In primo luogo, l'evoluzione è di fatto l'unico vero tema unificante di tutte le scienze naturali, da cui il profondo valore formativo del suo insegnamento. Inoltre, nel dibattito scientifico sull'evoluzione biologica si sono innestate considerazioni religiose ed etiche che hanno purtroppo introdotto e largamente diffuso concezioni profondamente erronee che falsano le basi stesse delle teorie Darwiniane e dei successivi approfondimenti teorici e sperimentali sui meccanismi di speciazione. Ulteriori elementi significativi che giustificano una particolare attenzione nella ricerca di nuovi strumenti didattici per insegnare l'evoluzione si ritrovano nella possibilità di collegare attraverso la teoria dell'evoluzione anche i concetti basilari di biodiversità e classificazione dei viventi, nonché di affrontare con un approccio pratico i progressi della genomica e dell'epigenetica, che consentono oggi di spiegare la biodiversità in termini molecolari.

Qual'è oggi il modo più efficace per accostare un pubblico ampio a tali tematiche complesse e appa-

rentemente di difficile comprensione? La ricerca didattica ha evidenziato la necessità di sviluppare nuovi strumenti e nuove strategie per l'apprendimento delle scienze, superando, pur senza totalmente sostituirli, gli approcci più tradizionali (HANDELSMAN *et al.*, 2004). Negli ultimi decenni vi sono stati notevoli sviluppi del cosiddetto *edutainment* (termine che nasce dalla fusione dei termini inglesi *education* ed *entertainment*), che cerca di coniugare le esigenze didattiche con attività ludiche. I giovani e giovanissimi fanno quotidianamente largo uso di giochi interattivi e sono quindi ben disposti verso questo *medium*, che riesce potenzialmente a stimolare la loro curiosità. Tuttavia il vero problema nella realizzare attività ludico-educative sta nella difficoltà di bilanciare adeguatamente le due componenti. La prevalenza della parte ludica rischia di rendere il gioco del tutto inefficace per l'acquisizione di nuove conoscenze, o addirittura di rinforzare concetti scientificamente errati. Per converso, un eccesso di rigore educativo può condurre a realizzare un'attività che allontana, anziché attrarre, i potenziali fruitori. Una semplice ricerca in rete consente di reperire un numero limitato di giochi didattici sull'evoluzione, che presentano in varia misura i due problemi di cui sopra. Ad esempio, il gioco *SPORE*, in cui il giocato-

re controlla l'evoluzione di organismi unicellulari che acquisiscono progressivamente nuove caratteristiche, pur apprezzabile dal punto di vista ludico, appare inadeguato per contenuti scientifici, ed il suo utilizzo fornisce limitati vantaggi in chiave didattica (POLI *et al.*, 2012).

In questo quadro, abbiamo realizzato tre giochi didattici interattivi nell'ambito del progetto di divulgazione scientifica *E-MoVe!* La progettazione di nuovi giochi si è svolta partendo dall'esigenza di affrontare tre aspetti da noi considerati più rilevanti: (a) la corretta collocazione cronologica della comparsa dei sei principali gruppi di organismi fotosintetici (Cianobatteri, alghe eucariote, Briofite, Pteridofite, Gimnosperme e Angiosperme); (b) l'acquisizione di informazioni di base sugli organismi dei diversi gruppi, con l'obiettivo di stimolare la curiosità del giocatore; (c) fornire alcune informazioni sui meccanismi di controllo dello sviluppo florale, fenomeno che è alla base della diversità delle Angiosperme. Nelle diverse fasi di progettazione, ed in parallelo con la produzione dei prototipi dei giochi, ci siamo confrontati con docenti e studenti di scuole di diverso ordine e grado, i cui preziosi suggerimenti sono stati di grande aiuto per produrre strumenti didattici effettivamente fruibili. Per la realizzazione della grafica e delle animazioni dei giochi ci siamo rivolti all'azienda POOYA che opera nel campo della comunicazione multimediale.

Nel primo gioco, denominato "La macchina del tempo" (Fig. 1), il giocatore parte dal tempo attuale ed imposta le coordinate per un viaggio in cui identifica le piante del passato. La schermata iniziale propone sei possibili destinazioni, ciascuna caratterizzata da un evento chiave nell'evoluzione degli organismi fotosintetici: la comparsa dei Cianobatteri [Archeano, 3 miliardi e 600 milioni di anni fa]; i primi eucarioti fotosintetici [Proterozoico, 2 miliardi di anni fa]; le prime piante terrestri (Briofite) [Ordoviciano, 470 milioni di anni fa]; le prime piante vascolari (Pteridofite) [Siluriano, 400 milioni di anni fa]; la diffusione delle piante a seme (Gimnosperme) [Giurassico, 175 milioni di anni fa]; le prime piante a fiore (Angiosperme) [Cretaceo, 100

milioni di anni fa]. Ai sei periodi si aggiunge una sezione denominata "Futuro", in cui si propone una ipotesi su come potrebbero essere le piante fra 150 milioni di anni. Per ciascun livello viene presentata una ricostruzione degli ambienti dei diversi periodi geologici. Al giocatore viene richiesto di rispondere ad una domanda, per la cui soluzione è necessario effettuare un'attività *drag and drop* che richiede il riconoscimento di organismi e la loro corretta collocazione nell'ambiente. Al di là di alcune semplificazioni che si sono rese necessarie sia nelle ricostruzioni di ambiente, sia nelle datazioni, il gioco fornisce la possibilità di acquisire alcuni elementi utili alla comprensione dei meccanismi evolutivi.

Nel secondo gioco, intitolato "Biodiversità ed evoluzione delle piante" (Fig. 2), il giocatore associa una definizione all'immagine ed al nome di diversi organismi fotosintetici, all'interno delle stesse sei categorie considerate per il gioco precedente. Al termine di ciascun livello, se le associazioni sono state effettuate correttamente, si apre una finestra di dialogo con un approfondimento su ciascun gruppo di organismi fotosintetici. Il gioco si propone di stimolare la curiosità e l'interesse del fruitore, con il meccanismo del *quiz*. Il terzo gioco, dal titolo "Espressione genica e morfologia florale" (Fig. 3), si basa sul modello ABC



Fig. 1  
La consolle del gioco 1.  
Game 1: The time machine.



Fig. 2  
La schermata iniziale del gioco 2.  
Screenshot of game 2.



Fig. 3  
La schermata iniziale del gioco 3.  
Screenshot of game 3.

della fioritura (BOWMAN *et al.*, 2012), che spiega la formazione dei verticilli florali. Il giocatore, regolando l'espressione dei geni delle classi A (*APETALA-2*), B (*APETALA-3*) e C (*AGAMOUS*), osserva la modificazione del fenotipo dei fiori di *Arabidopsis thaliana* L. Sulla base dei primi risultati della validazione, svolta con studenti ed insegnanti di scuola secondaria, i potenziali fruitori in generale ritengono chiari gli obiettivi e le modalità di svolgimento dei giochi e mostrano interesse e curiosità. È attualmente in corso la realizzazione della versione inglese dei tre giochi per la validazione e l'eventuale diffusione anche a livello internazionale.

*Ringraziamenti* - Questo lavoro è stato realizzato grazie al finanziamento del MIUR nell'ambito della legge 6/2000 per la divulgazione della cultura scientifica

#### LETTERATURA CITATA

BOWMAN J.L., SMYTH R.D., MEYEROWITZ E.M., 2012 –

*The ABC model of flower development: then and now.* Development, 139: 4095-4098.

GRANO A., DE TULLIO M.C., 2013 – *Risorse per insegnare l'evoluzione dei vegetali: il progetto E-MoVe!* Inform. Bot. Ital., 45(2): 412-413.

HANDELSMAN J., EBERT-MAY E., BEICHNER R., BURNS P., CHANG A., DEHAAN R., GENTILE J., LAUFFER S., GENTILE J., TILGHMAN S.M., WOOD W.B., 2004 – *Scientific teaching.* Science, 304: 521-522.

POLI D.B., BERENOTTO C., BLANKENSHIP S., PIATKOWSKI B., BADER G.A., POORE M., 2012 – *Bringing evolution to a technological generation: a case study with SPORE.* Am. Biol. Teacher, 74: 100-103.

RIASSUNTO – Nell'ambito del progetto E-MoVe! (Evoluzione del Mondo Vegetale), sono stati realizzati tre videogiochi didattici interattivi che si propongono di avvicinare i potenziali fruitori alla conoscenza basilare della biodiversità vegetale e dei meccanismi evolutivi. I tre giochi saranno resi disponibili a scuole ed altre istituzioni interessate.

#### AUTORI

Antonella Grano, Museo Orto Botanico, Università di Bari "Aldo Moro", Via Orabona 4, 70126 Bari

Mario C. De Tullio (mario.detullio@uniba.it), Dipartimento di Biologia, Università di Bari "Aldo Moro", Via Orabona 4, 70126 Bari

## Un primo contributo sull'Erbario storico di Giuseppe De Nicolò

V. CAVALLARO, F. CARRUGGIO, L. FORTE, F. MANTINO, M.C. DE TULLIO

**ABSTRACT** - *Preliminary contribution on the historical Herbarium by Giuseppe De Nicolò* - Preliminary information is reported on the historical Herbarium collected in the second part of the XIX Century by the Apulian botanist Giuseppe De Nicolò. The Herbarium consists of about 6,000 specimens, and witnesses an active collaboration between De Nicolò and the major botanists of his time, including Gussone, Pedicino, and Gasparrini.

*Key words:* Apulia, *exsiccata*, flora, Gasparrini, Gussone, *Herbaria*, Pedicino

### INTRODUZIONE

Agli inizi del XIX secolo l'istituzione dell'Orto Botanico di Napoli sancì la nascita della *Scuola floristica napoletana* che, sotto la guida di Michele Tenore, si occupò principalmente dello studio della Flora dell'Italia meridionale ed inoltre rappresentò un riferimento negli studi botanici per l'intera Europa mediterranea. Numerosi furono gli allievi del Tenore e, tra coloro che si interessarono anche della Flora pugliese, ricordiamo Giovanni Gussone e Guglielmo Gasparrini (GUSSONE, 1826; FIMIANI, 2003). Essi si avvalsero, nelle diverse regioni dell'Italia meridionale, della collaborazione di numerosi botanici e naturalisti che, pur portando un contributo agli studi floristici, rimasero in alcuni casi poco conosciuti. Tra questi vi fu il pugliese Giuseppe De Nicolò autore di un erbario attualmente conservato presso il Liceo Classico Statale di Bari "Orazio Flacco". In questo Liceo, che trae le sue origini nella seconda metà del XVIII secolo, è custodita un'interessante collezione scientifica che comprende anche l'Erbario De Nicolò. Si tratta di uno dei rari erbari del XIX secolo incentrati essenzialmente sulla Flora pugliese e sinora inedito. Esso, pertanto, è indubbiamente interessante sul piano storico e scientifico, in particolare per le ricerche nel campo della tassonomia e della sistematica. Possiamo pertanto affermare che possiede un indubbio valore culturale (MOGGI, 2012a).

In questo lavoro vengono illustrati i primi dati desunti dall'esame dell'Erbario De Nicolò.

### MATERIALI E METODI

È stata condotta una ricerca bibliografica e sono stati consultati diversi erbari, tra cui l'*Herbarium Neapolitanum*, al fine di acquisire notizie sulla vita del De Nicolò e sul suo erbario. Parallelamente sono

stati aperti tutti i fascicoli con l'obiettivo di verificare la corrispondenza tra il contenuto dei fascicoli e quanto riportato nel catalogo dell'erbario. Inoltre, nel dettaglio sono stati esaminati quattro fascicoli e precisamente: 1B *Ranunculaceae*, 12B *Leguminosae*, 12D *Leguminosae*, 20. Per questi fascicoli è stato realizzato un database informatico nel quale sono stati inseriti tutti i dati reperibili dai campioni.

### RISULTATI E DISCUSSIONE

VITERBO (1972) descrive G. De Nicolò - padre del celebre deputato barese Vito Nicola - come buon patriota e stimato medico, mentre DE FRENZA (2007) riporta che insegnò, nella seconda metà dell'ottocento, medicina e botanica nel corso di Farmacia che si svolgeva presso il Regio Liceo delle Puglie che, nel corso dei decenni, si trasformerà nell'attuale Liceo "Orazio Flacco". De Nicolò non risulta socio della Società Botanica Italiana (S.B.I., 1888), non viene menzionato tra i botanici del XIX secolo (SACCARDO, 1895; BALSAMO, GEREMICCA, 1913), né il suo erbario risulta incluso tra quelli recentemente censiti da MOGGI (2012b).

Esso è corredato da un catalogo che riporta la dicitura "Erbario del Prof. G. De Nicolò Flora australe italiana". Nel catalogo vengono indicate, secondo l'ordine alfabetico, le famiglie (99) e per ognuna vengono indicati i generi (577) e le specie con relativa località di raccolta e, in molti casi, l'erbario di provenienza. Il catalogo termina con un indice nel quale vengono riportati i fascicoli numerati e le famiglie corrispondenti. L'indice riporta 78 fascicoli, che corrispondono numericamente al numero di fascicoli oggi presenti. Tuttavia, mancano due dei fascicoli riportati nell'indice (*Myrtaceae* e *Verbenaceae*), mentre sono

presenti due fascicoli non riportati nell'indice e precisamente un secondo fascicolo di *Cupuliferae* ed uno di *Cucurbitaceae*. Molto probabilmente, dopo la stesura del catalogo, il fascicolo delle *Cupuliferae* è stato suddiviso in due fascicoli, mentre le *Cucurbitaceae* sono state separate dal fascicolo originario. Si è inoltre riscontrato che, rispetto a quanto riportato nel catalogo, alcuni campioni mancano, mentre altri sono stati aggiunti; è impossibile stabilire come e quando siano avvenuti tali cambiamenti poiché non vi è traccia presso la documentazione della scuola. Dall'esame dei fascicoli abbiamo osservato come i campioni sono riposti, senza essere bloccati, su fogli di carta di 40x50 cm piegati in due. Nella maggior parte dei casi si tratta della pregiata carta bambagina o di Amalfi, e dalla filigrana è stato possibile determinare che le fabbriche di provenienza sono le stesse della carta utilizzata nelle collezioni del Tenore, del Gussone e in alcune collezioni storiche presenti nell'*Herbarium Porticense* (DE NATALE, 2007). Per la determinazione dei campioni è stata utilizzata la "*Flora Napolitana*" del TENORE (1811-1838). Per le caratteristiche riscontrate possiamo affermare che si tratta di un erbario impostato secondo i principi e le consuetudini della *Scuola napoletana* del Tenore. I campioni, che stimiamo intorno a 6.000, provengono soprattutto dalla Puglia, in particolare da Bari e provincia (Fig. 1) e da altre regioni meridionali. In

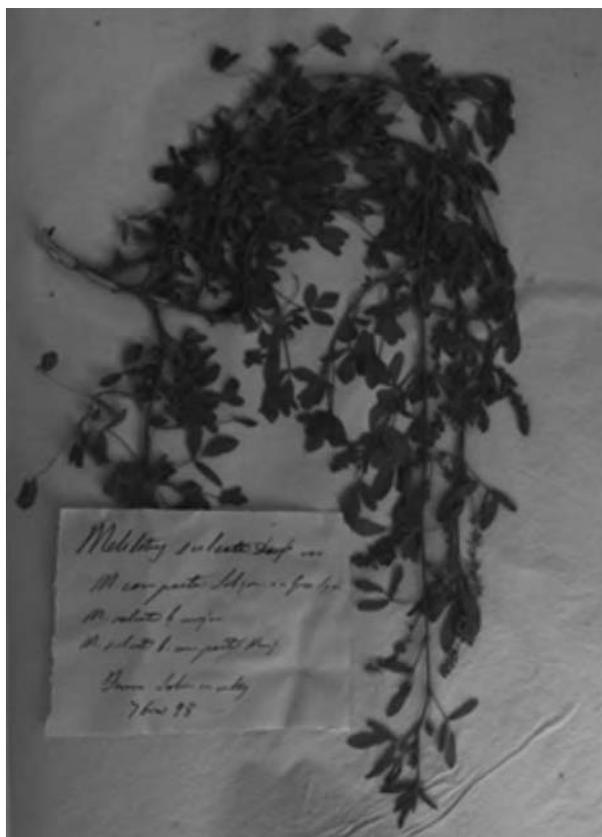


Fig. 1  
Campione di *Melilotus sulcata* Desf. (Erbario De Nicolò).  
Specimen of *Melilotus sulcata* Desf. (Erbario De Nicolò).

base ad una stima approssimativa risulta che circa il 60% dei campioni è in buone condizioni, mentre per la restante parte consta di campioni molto deteriorati o irrecuperabili e pertanto riteniamo indispensabile un tempestivo intervento di tipo conservativo.

Altro aspetto interessante è la presenza di numerosi campioni provenienti dagli erbari di illustri botanici della scuola napoletana quali G. Gussone, G. Gasparrini, N. A. Pedicino, G. A. Pasquale. Viceversa nell'erbario "Gussone Generale" sono presenti circa 170 campioni raccolti e/o determinati dal De Nicolò, tutti di provenienza pugliese e raccolti nel periodo compreso tra il 1842 ed il 1847. Inoltre, su alcune etichette dell'erbario De Nicolò, è stato riportato che l'autore aveva raccolto alcuni campioni in compagnia del Gussone (Fig. 2). Tutto ciò ci permette di affermare che fu uno dei botanici corrispondenti per la Puglia della scuola napoletana.

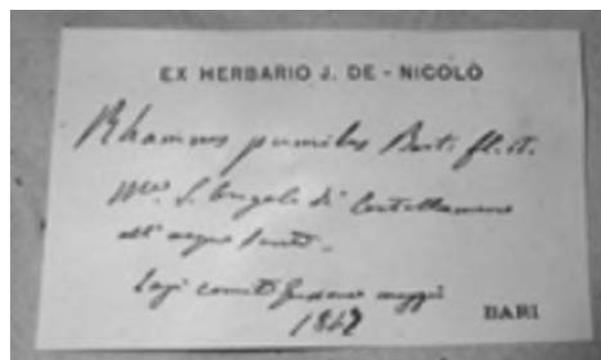


Fig. 2  
Etichetta del campione di *Rhamnus pumila* (Erbario De Nicolò).  
Specimen's label of *Rhamnus pumila* (Erbario De Nicolò).

Sulla base dei dati raccolti, possiamo sostenere che si tratta di un erbario molto interessante sul piano scientifico e storico e pertanto riteniamo utile proseguire nell'esame dei campioni in quanto permetterà di avere maggiori informazioni sulla Flora pugliese del XIX secolo, che risulta sino ad oggi poco conosciuta, e di ricostruire un tassello della storia della botanica pugliese.

*Ringraziamenti* – Gli Autori ringraziano le Dr. Vallariello e Santangelo dell'*Herbarium Neapolitanum* per la proficua collaborazione e le informazioni fornite ed il Preside del Liceo Classico Statale "Orazio Flacco" di Bari, Antonio d'Itollo, per aver permesso la consultazione dell'erbario.

#### LETTERATURA CITATA

- BALSAMO F., GEREMICCA M., 1913 – *Botanici e Botanofili Napoletani. Cenni biografici e storici*. *Bullettino dell'Orto Botanico della Reale Università di Napoli*. Tomo III.
- DE FRENZA L., 2007 – *L'Università prima dell'Università*. In: de Ceglia (Ed.), *Scienziati di Puglia*: 374-376. Ed. Adda, Bari.
- DE NATALE A., 2007 – *Herbarium Porticense*. In:

- MAZZOLENI S., PIGNATELLI S. (a cura di), *I Musei delle Scienze Agrarie. L'evoluzione delle Wunderkammern*: 52-74. Ed. Università di Napoli Federico II.
- FIMIANI P., 2003 – *Città, Università, Accademie nella vita di un grande lucano*. Atti Convegno “Guglielmo Gasparrini il sommo botanico”. Comune di Castelgrade.
- GUSSONE G., 1826 – *Plantae rariores*. Ex Regia Typographia Neapoli.
- MOGGI G., 2012a – *Definizione e significato dell'erbario*. In: TAFFETANI F. (a cura di), *Herbaria. Il grande libro degli erbari italiani*: 33-48. Nardini Editore, Firenze.
- , 2012b – *Appendice. Gli erbari in Italia*. In: TAFFETANI F. (a cura di), *Herbaria. Il grande libro degli erbari italiani*: 707-814. Nardini Editore, Firenze.
- SACCARDO P.A., 1895 – *La Botanica in Italia*. Real Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti. Vol. XXV n° 4.
- S.B.I., 1888 – *Bollettino Società Botanica Italiana*. Nuovo Giorn. Bot. Ital.
- TENORE M., 1811-1838 – *Flora Napolitana*. Stamperia Reale Napoli.
- VITERBO M., 1972 – *Vito Nicola De Nicolò deputato di Bari*. Archivio Storico Pugliese, fasc. 1-2. 45 pp. Bari, Tip. Del Sud.

RIASSUNTO – Presso il Liceo Classico “Orazio Flacco” di Bari è presente “l'Erbario G. De Nicolò”, corredato da un catalogo. Dalle ricerche condotte è emerso che si trat-

ta di un erbario inedito dell'ottocento. L'autore, Giuseppe De Nicolò, fu' medico e botanico ed insegnò queste discipline nel corso di Farmacia presso il Regio Liceo delle Puglie che nel corso dei decenni si trasformerà nell'attuale Liceo Classico “Orazio Flacco”. Secondo l'indice riportato nel catalogo i fascicoli dovrebbero essere 78 mentre attualmente l'erbario è costituito da 77 fascicoli. Si è inoltre riscontrato che alcuni campioni riportati nel catalogo mancano e viceversa altri sono stati aggiunti. I campioni sono riposti, senza essere bloccati, su fogli di 40x50 cm piegati in due e nella maggior parte dei casi si tratta della pregiata carta bambagina o di Amalfi. I campioni, che stimiamo intorno ai 6.000, provengono soprattutto dalla Puglia, in particolare dalla Provincia di Bari e da altre regioni meridionali. Sono presenti numerosi campioni provenienti dagli erbari di illustri botanici quali G. Gussone, G. Gasparrini, N.A. Pedicino, G.A. Pasquale, e viceversa numerosi campioni del De Nicolò sono presenti nella collezione “Gussone Generale”. Da tutto ciò si evince la collaborazione scientifica tra l'autore e G. Gussone. Tutte le caratteristiche riscontrate ci portano a sostenere che si tratta di un erbario realizzato secondo i dettami della scuola napoletana del Tenore. Per quanto sinora riscontrato possiamo sicuramente affermare che si tratta di erbario interessante sul profilo storico e scientifico e riteniamo utile proseguire nella schedatura informatizzata di tutti i campioni.

#### AUTORI

Viviana Cavallaro (viviana.cavallaro@uniba.it), Luigi Forte, Mario De Tullio, Dipartimento di Biologia e Museo Orto Botanico, Università di Bari “Aldo Moro”, Via E. Orabona 4, 70126 Bari  
 Francesca Carruggio, Francesca Mantino, Museo Orto Botanico, Università di Bari “Aldo Moro”, Via E. Orabona 4, 70126 Bari

## Loci classici delle piante vascolari endemiche italiane descritte per la Puglia

R.P. WAGENSOMMER, P. MEDAGLI, A. ALBANO, L. PERUZZI, F. BARTOLUCCI, M. VILLANI, F. CONTI, N.G. PASSALACQUA, A. ALESSANDRINI, G. BARBERIS, L. BERNARDO, E. BANFI, A. CROCE, G. DOMINA, G. GALASSO, S. PECCENINI, A. PISTARINO, A. SANTANGELO

ABSTRACT - Loci classici of the Italian endemic vascular plants described for Apulia - The Italian endemic vascular plants described for Apulia Region are presented. Altogether, 66 Italian endemics have their *locus classicus* in Apulia, including 9 *taxa* whose protologues cite several localities, both in Apulia and in other Regions.

Key words: Apulia, Italian endemics, *locus classicus*, protologue, vascular plant

### INTRODUZIONE

Nell'ambito del progetto nazionale sul censimento dei *Loci classici* delle specie e sottospecie di piante vascolari descritte per l'Italia (DOMINA *et al.*, 2012), sono state individuate le entità endemiche italiane descritte per la Puglia, che vengono qui presentate.

### MATERIALI E METODI

Vengono elencati i *taxa* specifici e sottospecifici, attualmente ritenuti validi da un punto di vista tassonomico, di piante vascolari endemiche italiane descritte per la Puglia, con i relativi *loci classici*. Le entità endemiche pugliesi sono precedute da un asterisco (\*).

### RISULTATI E DISCUSSIONE

Le entità endemiche italiane attualmente ritenute valide e descritte per la Puglia sono 66. Di queste, 33 sono le endemiche pugliesi. Le famiglie più rappresentate sono le *Orchidaceae* (17 *taxa*), le *Asteraceae* (13 *taxa*), le *Fabaceae* e le *Plumbaginaceae* (entrambe con 4 *taxa*), mentre i generi più rappresentati sono *Ophrys* (16 *taxa*), *Centaurea* (8 *taxa*), *Limonium* (4 *taxa*), *Allium* e *Stipa* (entrambi con 3 *taxa*). La maggior parte delle specie ha il *locus classicus* sul Gargano (24 entità), mentre 14 entità sono state descritte per il Salento, 10 per le Murge baresi e tarantine e 4 per le Isole Tremiti. Infine, 5 entità sono state descritte per più subregioni della Puglia e 9 *taxa* per più Regioni.

#### Entità descritte per le Isole Tremiti

\* *Allium diomedaeum* Brullo, Guglielmo, Pavone & Salmeri – San Domino (BRULLO *et al.*, 2002).

\* *Asperula staliana* Vis. subsp. *diomedea* Korica, Lausi & Ehrend. – S. Nicola (KORICA *et al.*, 1992).

\* *Centaurea diomedea* Gasp. – San Domino nel lato rivolto a mezzogiorno (GASPARRINI, 1837).

\* *Limonium diomedaeum* Brullo – Punta Diamante, S. Domino (BRULLO, 1988b).

#### Entità descritte per il Gargano

\* *Allium garganicum* Brullo, Pavone, Salmeri & Terrasi – Presso Peschici (BRULLO *et al.*, 2009).

\* *Abyssum diffusum* Ten. subsp. *garganicum* Španiel, Marhold, N.G.Passal. & Lihová – Gargano, quarries near San Marco in Lamis toward San Nicandro Garganico (ŠPANIEL *et al.*, 2011).

\* *Asperula garganica* Huter, Porta & Rigo ex Ehrend. & Krendl – Gargano, in rupestribus elatioribus montis St. Angelo (EHRENDORFER, KRENDL, 1974).

\* *Campanula garganica* Ten. subsp. *garganica* – Gargano; ad rudera vetustissimi coenobii montis Sacri; nec non ad Aediculam et arcem Divi Angeli (TENORE, 1827).

*Centaurea subtilis* Bertol. – Gargano; *ibidem* al Castel dell'Angiolo in adscensu di Manfredonia (BERTOLONI, 1854).

*Erysimum crassistylum* C.Presl subsp. *garganicum* Peccenini & Polatschek – Statale 89, 17 km NE Mattinata (PECCENINI, POLATSCHEK, 2014).

*Genista michelii* Spach – Gargano (SPACH, 1844).

\* *Iris bicapitata* Colas. – Between Apricena and Sannicandro Garganico (COLASANTE, 1996).

*Micromeria graeca* (L.) Benth. ex Rchb. subsp. *garganica* (Briq.) Guinea – Mont Gargano (BRIQUET, 1895).

*Onosma echioides* (L.) L. subsp. *angustifolia* (Lehm.) Peruzzi & N.G.Passal. – Apulia (LEHMANN, 1818). Entità tipificata su materiale proveniente dal Gargano (PERUZZI, PASSALACQUA, 2008).

\* *Ophrys bertolonii* Moretti subsp. *bertoloniiformis* (O.Danesch & E.Danesch) H.Sund – Nahe Monte S. Angelo (DANESCH, DANESCH, 1971a).

*Ophrys cinnabarina* Romolini & Soca – San Marco in Lamis (ROMOLINI, SOCA, 2011).

*Ophrys lojaconoi* P.Delforge – Provincia Foggia, Siponto (DELFORGE, 1995).

\* *Ophrys mattinatae* Medagli, A.Rossini, Quitadamo, D'Emerico & Turco – Apud Mattinata (FG) (MEDAGLI *et al.*, 2012).

\* *Ophrys oestriifera* M.Bieb. subsp. *montis-gargani* Van de Vijver & W.Looken – Behind chapel of Madonna di Loreto between Peschici and Vieste (VAN DE VIJVER *et al.*, 2010).

*Ophrys promontorii* O.Danesch & E.Danesch – Nahe Monte S. Angelo (DANESCH, DANESCH, 1971b).

*Ophrys sipontensis* (Gumpr.) O.Danesch & E.Danesch – Gargano, lido di Siponto bei Monte S. Angelo und S. Giovanni Rotondo (GREILHUBER, EHRENDORFER, 1975).

*Ornithogalum etruscum* Parl. subsp. *umbratile* (Tornad. & Garbari) Peruzzi & Bartolucci – Gargano, Umbra Forest (TORNADORE *et al.*, 2003).

\* *Serapias orientalis* (Greuter) H.Baumann & Künkele subsp. *apulica* H.Baumann & Künkele – Gargano, Siponto (BAUMANN, KÜNKELE, 1989).

*Stipa austroitalica* Martinovský subsp. *austroitalica* – Rodi, Coppe di Ceccatole (MARTINOVSKÝ, 1965).

\* *Stipa oligotricha* Moraldo subsp. *kiemii* (Martinovský) Moraldo – Mons Sant'Angelo: apud viam sub "Monte Acuto" sitam et a vico "Monte Sant'Angelo" venientem (MARTINOVSKÝ, 1972).

*Stipa oligotricha* Moraldo subsp. *oligotricha* – Gargano: Valico del Lupo (MORALDO, 1986).

*Verbascum niveum* Ten. subsp. *garganicum* (Ten.) Murb. – M. S. Angelo, sul litorale di Vieste (TENORE, 1824-1829).

\* *Viola merxmulleri* Erben – Gargano: Mte. San Angelo (ERBEN, 1984).

#### Entità descritte per le Murge baresi e tarantine

\* *Arum apulum* (Carano) P.C.Boyce – Gioia del Colle, nelle due contrade Marchesana e Monte Sannace (CARANO, 1934).

*Centaurea brulla* Greuter – Monte S. Nicola presso Monopoli (BRULLO, 1988a).

*Dianthus tarentinus* Lacaita – Gravina di Leucaspide (LACAITA, 1911).

\* *Limonium apulum* Brullo – Giovinazzo (BRULLO *et al.*, 1990).

\* *Limonium peucetium* Pignatti – Bari (PIGNATTI, 1982).

\* *Ophrys murgiana* Cillo, Medagli & Margh. – Apud Altamura (MEDAGLI, CILLO, 2009).

\* *Ophrys oxyrhynchos* Tod. subsp. *ingrassiae* Dura, Turco, Gennaio & Medagli – Apud Martina Franca (DURA *et al.*, 2011).

*Ophrys parvimaculata* (O.Danesch & E.Danesch)

Paulus & Gack – Apulien, 6.5 km westlich von Ostuni (DANESCH, DANESCH, 1970).

\* *Ophrys peucetiae* Lozito, D'Emerico, Medagli & Turco – Apud Ruvo di Puglia (TURCO *et al.*, 2012).

*Ophrys tarentina* Gözl & H.R.Reinhard – Ad urbem Mottola (GÖLZ, REINHARD, 1982).

#### Entità descritte per il Salento

\* *Allium apulum* Brullo, Guglielmo, Pavone & Salmeri – Torre di Inserraglio (BRULLO *et al.*, 2002).

*Anthemis hydruntina* H.Groves subsp. *hydruntina* – Prope Hydruntum (=Otranto) in collibus ad lacum Alimini proximis (GROVES, 1887).

\* *Anthyllis hermanniae* L. subsp. *japygica* Brullo & Giusso – Torre del Pizzo, Gallipoli (BRULLO, GIUSSO DEL GALDO, 2006).

\* *Centaurea iapygica* (Lacaita) Brullo – Novaglia prope Corsano (Terra d'Otranto) (LACAITA, 1925).

\* *Centaurea leucadea* Lacaita – Capo di Leuca (LACAITA, 1925).

\* *Centaurea nobilis* (H.Groves) Brullo – Montagna d'Oro prope Hydruntum (GROVES, 1887).

*Centaurea tenacissima* (H.Groves) Brullo – Prope Callipolem (= Gallipoli) (GROVES, 1887).

\* *Dianthus japygicus* Bianco & Brullo – Capo di Leuca (BRULLO, 1988a).

\* *Iris revoluta* Colas. – In insula "Mojuso", ad Portum Cesareum (Lecce) (COLASANTE, 1978).

\* *Limonium japygicum* (H.Groves) Pignatti ex Pignatti, Galasso & Nicoletta – In lapidosis maritimis insulae "S. Andrea" prope Callipolem (GROVES, 1887).

*Ophrys apulica* (O.Danesch & E.Danesch) O.Danesch & E.Danesch – Apulien, 5 km östlich von Lecce (DANESCH, DANESCH, 1970).

\* *Ophrys pseudomelena* Turco, Medagli & D'Emerico – San Cataldo (LE) (TURCO *et al.*, 2012).

\* *Ophrys tardans* O.Danesch & E.Danesch – Bei Lecce (DANESCH, DANESCH, 1972).

\* *Vicia giacominiiana* Segelb. – Provincia di Lecce: Porto Badisco (SEGELBERG, 1968).

#### Entità descritte per più subregioni della Puglia

*Centaurea centauroides* L. – Italia (LINNAEUS, 1753). Specie tipificata su materiale pugliese (JARVIS, 2007).

*Crepis apula* (Fiori) Bab. – Puglie al Gargano tra S. Marco e S. Nicandro, presso Otranto, a Leucaspide (FIORI, PAOLETTI, 1903-1904).

*Euphorbia nicaeensis* All. subsp. *japygica* (Ten.) Arcang. – *Sine loco* (TENORE, 1830a); in collibus Japygiae: Lecce; Peucetiae: Gravina (TENORE, 1831).

*Leontodon apulus* (Fiori) Brullo – Puglie al Gargano, T. d'Otranto (FIORI, PAOLETTI, 1903-1904).

*Onobrychis alba* (Waldst. & Kit.) Desv. subsp. *echinata* (Guss.) P.W.Ball – Japygia (GUSSONE, 1825).

Nel XIX secolo il termine "Japygia" veniva solitamente utilizzato per indicare la Puglia meridionale (Province di Lecce, Taranto e Brindisi).

#### Entità descritte per la Puglia e per altre Regioni

*Bupleurum gussonei* (Arcang.) Snogerup & B.Snogerup – Capo di Lecce e colli di Cassano in

Calabria (ARCANGELI, 1882).

*Cirsium lobelii* Ten. – In pascuis montosis Aprutii, et Samnii; var. B ad montem Divi Angeli Stabiarum: al piano di Faito; et in Gargano (TENORE, 1830b).

*Heptaptera angustifolia* (Bertol.) Tutin – Tricarico; ex maritimis Apuliae prope Gravina (BERTOLONI, 1838).

*Melampyrum variegatum* Huter, Porta & Rigo ex Porta – Gargano pr. Vico; Calabria: Dirupata di Morano (HUTER, 1907).

*Nigella arvensis* L. subsp. *glaucescens* (Guss.) Greuter & Burdet – In arenosis maritimis Calabriae orientalis, Siderno, Francavilla, Cotrone; Japygiae, Taranto; Peucetiae, Monopoli (GUSSONE, 1826).

*Ophrys tenthredinifera* Willd. subsp. *neglecta* (Parl.) E.G. Camus – Maremma Toscana nei prati umidi della Rugginosa presso Grosseto e alla Badiola; Roma sul Monte Testaccio e nella villa Borghese; terra di Otranto a Brindisi; Puglia; Basilicata; Isola di Capri; Regno di Napoli (PARLATORE, 1860).

*Rhaponiticoides centaurium* (L.) M.V. Agab. & Greuter – In Alibus Gargano, Baldo, Tataria (LINNAEUS, 1753).

*Thymus spinulosus* Ten. – *Sine loco* (TENORE, 1812). La specie è stata tipificata su materiale proveniente da Puglia e Basilicata (BARTOLUCCI *et al.*, 2013).

#### Entità descritte per territori vasti e generici

\* *Aubrieta columnae* Guss. subsp. *italica* (Boiss.) Mattf. – Planta Italiae australis (BOISSIER, 1867).

Entità indicata nel protologo genericamente per l'Italia meridionale, ma attualmente considerata endemica del Gargano (WAGENSOMMER, 2010; WAGENSOMMER *et al.*, 2012).

#### CONCLUSIONI

Sono stati raccolti in un database i protologi delle piante vascolari endemiche italiane descritte per la Puglia. Si tratta di 66 entità, tra specie e sottospecie, attualmente ritenute valide da un punto di vista tassonomico. Le entità il cui protologo riporta più località, solo in parte ricadenti in Puglia, necessitano di tipificazione (alcune di esse sono già state tipificate), affinché sia possibile indicare se il *locus classicus* ricade in territorio pugliese o al di fuori di esso.

#### LETTERATURA CITATA

- ARCANGELI G., 1882 – *Compendio della Flora Italiana*, Ed. I. Loescher. Torino, Roma.  
 BARTOLUCCI F., PERUZZI L., PASSALACQUA N.G., 2013 – *Taxonomic notes and typification of names within the genus Thymus L.* (Lamiaceae). *Taxon*, 62: 1308-1312.  
 BAUMANN H., KÜNKELE S., 1989 – *Die Gattung Serapias L. - eine taxonomische übersicht*. Mittl. Bl. Arbeitskr. Heim. Orch. Baden-Württ., 21(3): 701-946.  
 BERTOLONI A., 1838 – *Flora Italica*, 3. Bologna.  
 —, 1854 – *Flora Italica*, 9. Bologna.  
 BOISSIER E., 1867 – *Flora Orientalis*. H. Georg. Genevae.  
 BRIQUET J., 1895 – *Les Labiées des Alpes Maritimes*, 3. H. Georg, Libraire Editeur. Genève et Bale.  
 BRULLO S., 1988a – *Note tassonomiche sulla flora pugliese (Italia meridionale)*. *Braun-Blanquetia*, 2: 31-32.  
 —, 1988b – *Miscellaneous notes on the genus Limonium*

(Plumbaginaceae). *Willdenowia*, 17: 11-18.

- BRULLO S., GIUSSO DEL GALDO G., 2006 – *Taxonomic remarks on the Anthyllis hermanniae L.* (Fabaceae, Faboideae) *species complex in the Mediterranean flora*. *Novon*, 16: 304-314.  
 BRULLO S., GUGLIELMO A., PAVONE P., SALMERI C., 2002 – *Osservazioni tassonomiche e cariologiche sulle specie del ciclo di Allium paniculatum L. in Italia*. *Inform. Bot. Ital.*, 33(2)(2001): 500-506.  
 BRULLO S., GUGLIELMO A., TERRASI M.C., 1990 – *Osservazioni citotassonomiche su alcune specie di Limonium dell'Italia meridionale*. *Giorn. Bot. Ital.*, 124(1): 122.  
 BRULLO S., PAVONE P., SALMERI C., TERRASI M.C., 2009 – *Allium garganicum* (Alliaceae), *a new species from Apulia (SE Italy)*. *Plant Biosyst.*, 143, suppl.: 78-84.  
 CARANO E., 1934 – *Un nuovo elemento della flora meridionale d'Italia: l'Arum nigrum Schott var. apulum*. *Ann. Bot. (Roma)*, 20: 579-585.  
 COLASANTE M., 1978 – *Un nuovo endemismo italiano: Iris revoluta n. sp. e relativa analisi citotassonomica*. *Ann. Bot. (Roma)*, 35-36: 155-168.  
 —, 1996 – *Taxonomic note on some Italian Bearded Iries: Iris relicta Colas. nom. nov. and Iris bicapitata Colas. sp. nov.*. *Fl. Medit.*, 6: 213-217.  
 DANESCH O., DANESCH E., 1970 – *Drei neue Ophrys fuciflora-Sippen aus Italien*. *Die Orchidee*, 21: 17-22.  
 —, 1971a – *Ophrys bertoloniiformis O. & E. Danesch, sp. nov., eine Sippe hybridogenen Ursprungs*. *Die Orchidee*, 22: 115-117.  
 —, 1971b – *Ophrys promontorii O. & E. Danesch sp. nov. eine hybridogene Sippe aus Südtalien*. *Die Orchidee*, 22: 256-258.  
 —, 1972 – *Orchideen Europas, Ophrys-Hybriden*. Hallwag Verlag, Berg und Stuttgart.  
 DELFORGE P., 1995 – *Ophrys lojaconoi P. Delforge, un nom approprié pour une espèce italienne du sous-groupe d'Ophrys fusca*. *Les Naturalistes belges*, 76(3): 277-290.  
 DOMINA G., GIUSSO DEL GALDO G., GARGANO D., LABRA M., PECCENINI S., PERUZZI L., RAIMONDO F.M., 2012 – *The Italian Loci classici census*. *Taxon*, 61(6): 1351-1353.  
 DURA T., TURCO A., GENNAIO R., MEDAGLI P., 2011 – *Una nuova entità della Puglia: Ophrys oxyrrhynchos Tod. subsp. ingrassiae Dura, Turco, Gennaio & Medagli*. *GIROSI Notizie*, 46: 37-39.  
 EHRENDORFER F., KRENDL F., 1974 – *Notes on Rubiaceae in Europe*. In: V.H. Heywood, *Flora Europaea. Notulae Systematicae ad Floram Europaeam spectantes No. 15*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 68: 268-272.  
 ERBEN M., 1984 – *Viola merxmülleri - eine neue Art der Gattung Viola Sektion Melanium aus Mittel-Italien (Gargano)*. *Mitt. Bot. München*, 20: 29-38.  
 FIORI A., PAOLETTI G., 1903-1904 – *Flora Analitica d'Italia*. 3. Padova.  
 GASPARRINI G., 1837 – *Descrizione delle isole Tremiti e del modo come renderle coltivate*. *Annali Civili del Regno delle due Sicilie*, 15(30): 79-105.  
 GÖLZ P., REINHARD H.R., 1982 – *Orchideen in Südtalien. Ein Beitrag zur Kenntnis der Orchideenflora Apuliens, der Basilicata, Kalabriens und Siziliens*. *Mitt. Bl. Arbeitskr. Heim. Orch. Baden-Württ.*, 14(1): 1-124.  
 GREILHUBER J., EHRENDORFER F., 1975 – *Chromosome Numbers and Evolution in Ophrys* (Orchidaceae). *Pl. Syst. Evol.*, 124: 125-138.  
 GROVES E., 1887 – *Flora della costa meridionale della Terra d'Otranto*. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, 19: 110-219.

- GUSSONE G., 1825 – *Index Sem. Hort. Boccad.*: 1-12.  
 —, 1826 – *Plantae Rariores quas in itinere per oras Ioniae ad Adriatici maris...* Regia Typographia, Napoli.
- HUTER R., 1907 – *Herbar-Studien*. Österr. Bot. Zeitschr., 57(6): 238-246.
- JARVIS C., 2007 – *Order out of Chaos. Linnean Plant Names and their Types*. The Linnean Society of London.
- KORICA B., LAUSI D., EHRENDORFER F., 1992 – *A new subspecies of the trans-Adriatic Asperula staliana from the Isole Tremiti: subsp. diomedea, and its ecology*. Fl. Medit., 2: 65-76.
- LACAITA C., 1911 – *Flora Italica Exsiccata 1456*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., 18: 511-512.  
 —, 1925 – *Piante italiane critiche o rare XCVIII-CXIV*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., 32: 102-114.
- LEHMANN J.G.C., 1818 – *Plantae e Familiae Asperifoliarum Nuciferae*. 2: 252-478.
- LINNAEUS C., 1753 – *Species Plantarum*. Stockholm.
- MARTINOVSKÝ J.O., 1965 – *Die italienischen Stipa-Sippen der Sektion Pennatae*. Webbia, 20: 711-736.  
 —, 1972 – *Studien über einige submediterrane Federgrassippen*. Preslia, 44(1): 7-23.
- MEDAGLI P., CILLO N., 2009 – *Ophrys murgiana Cillo, Medagli & Margherita, specie nuova delle Murge (Puglia, Italia meridionale)*. GIROS Notizie, 41: 23-25.
- MEDAGLI P., ROSSINI A., QUITADAMO G., D'EMERICO S., TURCO A., 2012 – *Ophrys martinatae, specie nuova del Gargano*. GIROS Notizie, 51: 102-104.
- MORALDO B., 1986 – *Il genere Stipa (Gramineae) in Italia*. Webbia, 40(2): 203-278.
- PARLATORE F., 1860 – *Flora Italica 3(2)*. Firenze.
- PECCENINI S., POLATSCHKEK A., 2014 – *The genus Erysimum (Brassicaceae) in Italy, part II: Description of new species and subspecies*. Ann. Naturhist. Mus. Wien B, 116: 107-117.
- PERUZZI L., PASSALACQUA N.G., 2008 – *Taxonomy of the Onosma echioides (L.) L. complex (Boraginaceae) based on morphometric analysis*. Bot. J. Linnean Soc., 157: 763-774.
- PIGNATTI S., 1982 – *New species of Limonium from Italy and Tunisia*. Webbia, 36(1): 47-56.
- ROMOLINI R., SOCA R., 2011 – *New species in Ophrys (Orchidaceae) to the Italian and French Florae*. J. Eur. Orch., 43(4): 759-784.
- SEGELBERG I., 1968 – *Notes on the genus Vicia in Southern Italy*. Festschrift I. Hedenius: 181-184.
- SPACH E., 1844 – *Revisio generis Genista*. Ann. Sci. Nat., Bot. ser. 3, 2: 237-279.
- ŠPANIEL S., MARHOLD K., PASSALACQUA N.G., ZOZOMOVÁ-LIHOVÁ J., 2011 – *Intricate variation patterns in the diploid-polyploid complex of Alyssum montanum-A. repens (Brassicaceae) in the Apennine Peninsula: evidence for long-term persistence and diversification*. Am. J. Bot., 98(11): 1887-1904.
- TENORE M., 1812 – *Flora Napolitana 1(3)*: 35. Napoli.  
 —, 1824-1829 – *Flora Napolitana 3*. Napoli.  
 —, 1827 – *In Florae Neapolitanae Prodromum addenda et emendanda*. In: *Appendix ad indicem seminum Horti Regii Neapolitani, pro anno 1827*. Napoli.  
 —, 1830a – *Flora Napolitana 4*. Napoli.  
 —, 1830b – *Semina anno 1830 collecta, quae in horto botanico Neapolitano pro mutua commutatione offeruntur*. Napoli.  
 —, 1831 – *Sylloge plantarum vascularium florae neapolitanae hucusque detectarum*. Ex Typographia Fibreni, Napoli.
- TORNADORE N., MARCUCCI R., GARBARÌ F., 2003 – *Ornithogalum umbratile (Hyacinthaceae), a new species from Gargano's Promontory, southeastern Italy*. Taxon, 52: 577-582.
- TURCO A., D'EMERICO S., LOZITO L., MEDAGLI P., 2012 – *Ophrys peuceetiae e Ophrys pseudomelena, due nuovi taxa per la Puglia*. GIROS Notizie, 50: 4-11.
- VAN DE VIJVER B., VAN LOOKEN W., THIERS G., CUYPERS A., 2010 – *Ophrys oestriifera subsp. montis-gargani, a new subspecies from the Gargano (Italy)*. J. Eur. Orch., 42(1): 167-180.
- WAGENSOMMER R.P., 2010 – *Indagini sulla distribuzione puntuale delle specie rare: alcuni casi studio della flora del Gargano (Puglia)*. Inform. Bot. Ital., 42(2): 451-463.
- WAGENSOMMER R.P., DI PIETRO R., FOGGI B., 2012 – *Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana: Aubrieta columnae Guss. subsp. italica (Boiss.) Mattf.*. Inform. Bot. Ital., 44(1): 210-212.

RIASSUNTO – Vengono presentate le piante vascolari endemiche italiane descritte per la Puglia, per un totale di 66 entità, compresi 9 taxa i cui protologhi citano più località, ricadenti sia in Puglia che in altre Regioni.

## AUTORI

Robert Philipp Wagensommer (robwagensommer@yahoo.it), Piero Medagli, Antonella Albano, Lorenzo Peruzzi, Fabrizio Bartolucci, Mariacristina Villani, Fabio Conti, Nicodemo G. Passalacqua, Alessandro Alessandrini, Giuseppina Barberis, Liliana Bernardo, Enrico Banfi, Antonio Croce, Gianniantonio Domina, Gabriele Galasso, Simonetta Peccenini, Annalaura Pistarino, Annalisa Santangelo, Società Botanica Italiana, Via G. La Pira 4, 50121 Firenze

## Il genere *Aegilops* (*Poaceae*) in Puglia: distribuzione, stato di conservazione e chiave dicotomica per la determinazione delle specie

R.P. WAGENSOMMER, E.V. PERRINO

**ABSTRACT** - *The genus Aegilops (Poaceae) in Apulia: distribution, conservation status and dichotomous key for the identification of the species* - According to literature, there are ten species of genus *Aegilops* occurring in Italy (three species no longer recorded). Three of them are allochthonous. Eight species are recorded in the Apulia region (two are allochthonous, both are no longer recorded in Apulia). Three species occurring in Apulia are included in the national Red List. A dichotomous key for the identification of all *Aegilops* species growing in Italy is provided.

*Key words:* *Aegilops*, Apulia, dichotomous key, distribution, *Poaceae*

### INTRODUZIONE

Il genere *Aegilops* L. è stato studiato in modo approfondito per la sua affinità genetica con il genere *Triticum* L., che comprende numerosi cereali coltivati, e per i programmi di miglioramento genetico delle specie cerealicole (HU *et al.*, 2012).

Da numerosi studi sulla sua filogenesi (KIMBER, ZHAO, 1983; HSIAO *et al.*, 1995; KELLOGG, APPELS, 1995; KELLOGG *et al.*, 1996; SEBERG, FREDERIKSEN, 2001; PETERSEN, SEBERG, 2002; VAKHITOV *et al.*, 2003; MASON-GAMER, 2005; PETERSEN *et al.*, 2006; ALNADDAF *et al.*, 2012) emerge che il genere *Aegilops* può essere considerato monofiletico escludendo *Aegilops speltoides* Tausch, con genoma B, che va incluso nel genere *Sitopsis* (Jaub. & Spach) Á. Löve (LÖVE, 1984; PETERSEN *et al.*, 2006). Pertanto, sulla base di questi risultati, il genere *Aegilops* va tenuto separato dal genere *Triticum* (MASON-GAMER, KELLOGG, 1996; SALLARES, BROWN, 2004; BORDBAR *et al.*, 2011), anche se non tutti gli autori sono concordi (CONTI *et al.*, 2005, 2007; BANFI *et al.*, 2011). In Italia sono presenti 10 specie appartenenti al genere *Aegilops*. Sette specie sono autoctone e tre sono alloctone. Per tre di esse, due alloctone e una autoctona, mancano conferme recenti (PERRINO *et al.*, 2014).

### MATERIALI E METODI

La nomenclatura segue PIGNATTI (1982) e la monografia di VAN SLAGEREN (1994). Le informazioni sulla distribuzione delle specie in Puglia sono state aggiornate con nuovi dati raccolti sul campo (i campioni sono depositati in BI), analizzando i dati ripor-

tati in bibliografia e visionando i campioni depositati nei seguenti erbari: BI, BM, CAT, FI, G, GE, JE, LE, LEC, LY-Gandoger, MJG-Herb. Garganicum, OXF, TUB, W. Le informazioni sulla conservazione delle specie sono riferite alle recenti schede per una Lista Rossa delle piante d'Italia (PERRINO, WAGENSOMMER, 2012, 2013a, b; ROSSI *et al.*, 2013). La chiave dicotomica è stata realizzata per tutte le specie presenti in Italia, sulla base dei dati di letteratura e delle osservazioni personali (cfr. PERRINO *et al.*, 2014).

### RISULTATI E DISCUSSIONE

La Puglia è la regione con il maggior numero di specie del genere *Aegilops* in Italia. Sono presenti, infatti, le seguenti otto specie: *Aegilops biuncialis*, *Ae. cylindrica*, *Ae. geniculata*, *Ae. neglecta*, *Ae. peregrina*, *Ae. triuncialis*, *Ae. uniaristata* e *Ae. ventricosa*. Di queste, due sono alloctone: *Ae. cylindrica* e *Ae. peregrina*. Entrambe non sono state confermate recentemente in Regione. Di seguito vengono riportate la distribuzione regionale e l'eventuale inclusione nelle Liste Rosse nazionali delle specie presenti in Puglia, oltre alla chiave analitica per la determinazione di tutte le specie del genere *Aegilops* presenti in Italia.

#### *Aegilops biuncialis* Vis.

Questa specie è presente in Puglia nelle province di Lecce, Taranto e Bari.

In letteratura è indicata nelle seguenti località: Gravina di Leucaspide (GROVES, 1887; CURTI, 1986), Laghi Alimini (MELE *et al.*, 2006), Gravina di Palagianello (CARRUGGIO *et al.*, 2008), Capitolo

(PERRINO, SIGNORILE, 2009), Santeramo in Colle a Murge della Morsara e Masseria Cingavalle, Mottola a Monte Sant'Elia e Masseria Semeraro, Gravina di Pentimelle (PERRINO, WAGENSOMMER, 2013a), Vernole (MEDAGLI *et al.*, 2014), Portico del Ladro a Massafra (cfr. PERRINO *et al.*, 2014).

Negli erbari consultati sono presenti i seguenti campioni pugliesi: Gravina di Leucaspide, *Lacaïta s.n.*, *exsiccata* Italia Fiori & Beguinot (FI, GE); Gravina di Palagianello, *E.V. Perrino 36252* (BI); Mottola, Monte Sant'Elia, *E.V. Perrino 35849* (BI); Mottola, Masseria Semeraro, *E.V. Perrino 36251-36265* (BI); Massafra, Portico del Ladro, *F. Mantino & F. Caruggio 35796* (BI); Santeramo in Colle, Murge della Morsara, *R.P. Wagensommer, E.V. Perrino & G.N. Silletti 36018-36019* (BI); Santeramo in Colle, Masseria Cingavalle, *E.V. Perrino & G.N. Silletti 36174* (BI).

Da un punto di vista conservazionistico, a livello nazionale questa specie è considerata Vulnerabile: VU B1ab(i,ii,iii,iv)+2ab(i,ii,iii,iv) (PERRINO, WAGENSOMMER, 2013a).

#### *Aegilops cylindrica* Host

La presenza in Puglia di questa specie alloctona, indicata per Gravina in Puglia in provincia di Bari (PIGNATTI, 1982), necessita di conferma.

#### *Aegilops geniculata* Roth

Specie ampiamente diffusa in tutta la Puglia. Di seguito si riportano solo alcuni dei campioni d'erbario visionati: Gravina di Laterza, *S. Brullo, P. Signorello & G. Spampinato 70099-1* (CAT); Martina Franca, Bosco delle Pianelle, *S. Brullo, P. Signorello & G. Spampinato 70116* (CAT); costa del Salento, *S. Brullo, G. Spampinato & P. Signorello 70103* (CAT); Veglie, *Müller s.n.* (G, JE, LE, TUB); tra Gravina in Puglia e Altamura, *Negri & Messeri s.n.* (FI); Celenza Valfortore, Monte Ingotto, *E.V. Perrino, 36258* (BI); Lesina, Zappino, *F. Pantaleo 31780* (BI); a nord-est di Mattinata, Valle Ripe Rosse, *W. Licht* (MJG – Herb. Garganicum); a sud di Peschici, *W. Licht* (MJG – Herb. Garganicum).

#### *Aegilops neglecta* Requien ex Bertoloni

Specie rinvenuta in Puglia in provincia di Lecce e di Taranto e sul Gargano, mentre non è certo che vadano qui riferite le segnalazioni sub *Aegilops tria(ri)stata* W. della provincia di Bari (Palanza ex BIANCO, 1962). Negli erbari consultati sono presenti i seguenti campioni pugliesi: Otranto, Alimini, *Groves s.n.* (OXF); Gargano, Gravina di Campolato, *S. Brullo & S. Signorello 70117* (CAT); Martina Franca, Bosco delle Pianelle, *Brullo, Signorello & Spampinato 70116* (CAT); Laterza, Masseria Cangiulli, *E.V. Perrino 36266* (BI).

#### *Aegilops peregrina* (Hackel in J. Fraser) Maire & Weiller

Questa specie alloctona è stata segnalata in Puglia nel XIX secolo, in provincia di Lecce presso Gallipoli, ma necessita di conferme. Negli erbari consultati sono presenti i seguenti cam-

pioni pugliesi: *in incultis prope* Gallipoli, 1881, *H. Groves* sub *Ae. triuncialis* L. var. *breviaristata* Hack., rev. van Slageren 1992 sub *Ae. peregrina* (Hack. in J. Fraser) Eig (FI); *in herbosis prope Callepolem* (= Gallipoli), 1881, sub *Ae. triaristata* var. *breviaristata* Hack., rev. van Slageren 1992 sub *Ae. peregrina* (Hack. in J. Fraser) Eig var. *brachyathera* (Boiss.) Maire & Weiller (FI).

#### *Aegilops triuncialis* L.

Questa specie è stata raccolta in passato nella provincia di Lecce, ma attualmente è nota in Puglia solo in provincia di Taranto.

Negli erbari consultati sono presenti i seguenti campioni pugliesi: Lecce e Gallipoli, *Groves s.n.* (GE, W); Crispiano, *E.V. Perrino 36256-36257* (BI); Mottola, presso Masseria Primicerio, *E.V. Perrino 36253* (BI); Mottola, Masseria Semeraro, *E.V. Perrino 36175* (BI); Palagianello, *E.V. Perrino 36254-36255* (BI).

#### *Aegilops uniaristata* Vis.

Questa specie è nota in Puglia nelle province di Lecce, Taranto, Brindisi e Bari.

In letteratura è indicata nelle seguenti località: Leucaspide (GROVES, 1887), area sudorientale delle Murge (Taranto), Gravina di Laterza, presso Bosco delle Pianelle a Martina Franca, tra Spongano e Surano (BIANCO *et al.*, 1989), Bosco di Rauccio e Santa Cesarea Terme (MARCHIORI *et al.*, 1993), Bosco Difesa Grande di Gravina in Puglia (FORTE, 2001), tra Maruggio e Manduria (CAFORIO, MARCHIORI, 2006), tra Fasano e Brindisi (PERRINO, 2011).

Negli erbari consultati sono presenti i seguenti campioni pugliesi: Veglie, *P. Medagli* (LEC); tra Fasano e Brindisi, *E.V. Perrino 35682* (BI); Laterza a Selva San Vito, *F. Angiulli & M. Campochiaro 35804* (BI); Laterza, Jazzo Pallanculo, *E.V. Perrino 36263-36264* (BI); Gravina di Palagianello, *E.V. Perrino 36261-36262* (BI); Santeramo in Colle a Murge della Morsara, *E.V. Perrino 36259-36260* (BI); Santeramo in Colle a Bosco La Gravinella, *A. Natuzzi 35466* (BI).

Da un punto di vista conservazionistico, a livello nazionale questa specie è considerata Vulnerabile: VU B1ab(iii,v)+2ab(iii,v) (PERRINO, WAGENSOMMER, 2012; ROSSI *et al.*, 2013).

#### *Aegilops ventricosa* Tausch

Questa specie è nota in Puglia nelle province di Taranto e di Bari.

Negli erbari consultati sono presenti i seguenti campioni pugliesi: s. loc., *Gasparrini s.n.* (FI); Mottola, Bosco Santantuono, *E.V. Perrino 36173* (BI); Gravina in Puglia, Bosco Difesa Grande, *F. Angiulli & M. Campochiaro 35840* (BI); Gravina in Puglia, Bosco Difesa Grande, *E.V. Perrino 36176* (BI).

Da un punto di vista conservazionistico, a livello nazionale questa specie è considerata Vulnerabile: VU B2ab(i,ii,iii,iv) (PERRINO, WAGENSOMMER, 2013b).

**Chiave analitica per le specie italiane**

- 1 Spiga ovoidale o subovoide, lunga (senza le reste) 1-4 cm ..... 2  
 - Spiga cilindrica, subcilindrica o moniliforme, lunga fino a 15 cm ..... 6  
 2 Gluma con (3-)4-5 reste (quella apicale raramente con 2 reste), più corte verso l'apice della spiga: 2-4,5 cm alla base e 1-3,5 cm all'apice; spiga con (2-)3-4 spiglette, la superiore sterile, le inferiori 1-3 subventricose, con la massima larghezza al centro o nella metà inferiore, ristrette in alto; cariosside lunga 4-6 mm ..... *Ae. geniculata*  
 - Gluma con 1-2(-3) reste, cariosside lunga 5-8 mm ..... 3  
 3 Gluma con 1 resta, spiga subovoide (raramente moniliforme) ..... *Ae. uniaristata*  
 - Gluma con 2-3 reste, spiga ovoidale ..... 4  
 4 Gluma con nervature di differente larghezza, immerse nella superficie della gluma, irregolarmente spaziate; cariosside aderente a lemma e palea .....  
 ..... (da confermare in Italia) *Ae. peregrina*  
 - Gluma con nervature tutte della stessa larghezza, ± parallele, sporgenti dalla superficie, regolarmente spaziate; cariosside non aderente a lemma e palea ..... 5  
 5 Spiglette 2-3, tutte fertili; spiglette rudimentali 1(-2), resta pressoché scabra ..... *Ae. biuncialis*  
 - Spiglette 3-6, le superiori 1-3 sterili; spiglette rudimentali (2-)3, resta pressoché liscia ..... *Ae. neglecta*  
 6 Spiga subcilindrica o distintamente moniliforme, glume (a volte solo le apicali) con reste lunghe 1-6 cm ..... 7  
 - Spiga strettamente cilindrica, glume lunghe 1-pochi mm, prive di reste (eccetto in *Ae. caudata*) o solo quelle della spigletta apicale con 1 resta ..... 8  
 7 Spiga subcilindrica, glume con 2-3 reste; spiglette rudimentali (2-)3, cariosside libera .... *Ae. triuncialis*  
 - Spiga distintamente moniliforme, glume (a volte solo le apicali) con 1 sola resta; spiglette rudimentali assenti (raramente 1-2), cariosside aderente .....  
 ..... *Ae. ventricosa*  
 8 Spiga lunga 3-10(-12) cm, gluma della spigletta apicale con resta lunga 3-12 cm ..... 9  
 - Spiga lunga 7-15 cm, glume di tutte le spiglette prive di reste ..... 10  
 9 Spiga lunga 5-8(-12) cm (senza le reste), gluma della spigletta apicale con resta di 3-6 cm con 2 denti alla base (a volte non sviluppati), lemma della spigletta apicale con resta di 4-8 cm; reste della gluma e del lemma apicali sempre più corte della lunghezza della spiga, spiglette rudimentali 1-2 .....  
 ..... *Ae. cylindrica*  
 - Spiga lunga 3-12 cm (senza le reste), gluma della spigletta apicale con resta divergente di 4,5-12 cm (più lunga della spiga), senza denti laterali; lemma della spigletta apicale con resta corta, spiglette rudimentali 1-3 .... (da confermare in Italia) *Ae. caudata*  
 10 Lemma dei soli 2 fiori inferiori della spigletta apicale provvisti di reste, di uguale lunghezza (4,5-10 cm); spiglette lunghe 7-15 cm .....  
 .. (da confermare in Italia) *Ae. speltoides* var. *speltoides*  
 - Lemmi di tutti i fiori fertili laterali e apicali provvisti di reste, di lunghezza crescente dai 2,5 cm nelle

spiglette basali fino a 10 cm; spiglette lunghe 7-10 cm .. (da confermare in Italia) *Ae. speltoides* var. *ligustica*

**CONCLUSIONI**

I risultati di indagini di campo, uniti ai dati d'erbario e di letteratura, hanno consentito di delineare un quadro più preciso della distribuzione geografica delle specie del genere *Aegilops* in Puglia. Nella Regione sono presenti otto specie (sei autoctone e due alloctone), di cui due non rinvenute in tempi recenti (*Aegilops cylindrica* e *Ae. peregrina*, entrambe alloctone).

Tre specie (*Aegilops biuncialis*, *Ae. uniaristata* e *Ae. ventricosa*) sono incluse nella Lista Rossa nazionale, tutte nella categoria Vulnerabile.

La chiave analitica, che contempla tutte le specie italiane del genere *Aegilops*, viene fornita per facilitare la determinazione, non sempre agevole, delle specie di questo interessante genere della famiglia delle *Poaceae*.

**LETTERATURA CITATA**

- ALNADDAF L.M., MOUALLA M.Y., HAIDER N., 2012 – *Resolving genetic relationships among Aegilops L. and Triticum L. species using analysis of chloroplast DNA by Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)*. Asian J. Agric. Sci., 4: 270-279.
- BANFI E., GALASSO G., SOLDANO A., 2011 – *Notes on systematics and taxonomy for the Italian vascular flora. 2*. Atti Soc. it. Sci. nat. Museo civ. Stor. nat. Milano, 152(2): 85-106.
- BIANCO P., 1962 – *Flora e vegetazione delle Murge di Nord-Ovest*. Ann. Fac. Agr. Univ. Bari, 16: 459-640.
- BIANCO P., MEDAGLI P., D'EMERICO S., 1989 – *Nuovi dati distributivi e osservazioni morfologiche su Aegilops uniaristata Vis. (Gramineae), entità mediterraneo-orientale riaccertata per la flora italiana*. Webbia, 43: 19-24.
- BORDBAR F., RAHIMINEJAD M.R., SAEIDI H., BLATTNER F.R., 2011 – *Phylogeny and genetic diversity of D genome species of Aegilops and Triticum (Triticeae, Poaceae) from Iran based on microsatellites, ITS, and trnL-F*. Plant Syst. Evol., 291: 117-131.
- CAFORIO F., MARCHIORI S., 2006 – *Nuove segnalazioni e specie rare per la flora infestante le colture della Puglia*. Inform. Bot. Ital., 38(1): 37-40.
- CARRUGGIO F., MANTINO F., D'AMICO F.S., FORTE L., 2008 – *Analisi floristica del territorio comunale di Palagianello (Taranto) compreso nel Parco naturale regionale "Terra delle gravine". Dati preliminari*. Inform. Bot. Ital., 40(suppl. 3): 94-95.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C. (Eds.), 2005 – *An annotated Checklist of the Italian Vascular Flora*. Palombi Ed., Roma.
- CONTI F., ALESSANDRINI A., BACCHETTA G., BANFI E., BARBERIS G., BARTOLUCCI F., BERNARDO L., BONACQUISTI S., BOUVET D., BOVIO M., BRUSA G., DEL GUACCHIO E., FOGGI B., FRATTINI S., GALASSO G., GALLO L., GANGALE C., GOTTSCHLICH G., GRÜNANGER P., GUBELLINI L., IIRITI G., LUCARINI D., MARCHETTI D., MORALDO B., PERUZZI L., POLDINI L., PROSSER F., RAFFAELI M., SANTANGELO A., SCASSELLATI E., SCORTEGAGNA S., SELVI F., SOLDANO A., TINTI D., UBALDI D., UZUNOV D., VIDALI M., 2007 – *Integrazioni alla checklist della flora vascolare italiana*. Natura Vicentina, 10 (2006): 5-74.
- CURTI L., 1986 – *Contributo alla conoscenza della Flora del*

- Salento (Puglia-Italia). 2. Poaceae. Boll. Mus. Civ. St. Nat. Verona, 13: 327-348.
- FORTE L., 2001 – *Flora e vegetazione del bosco comunale "Difesa Grande" di Gravina in Puglia. Primo contributo*. Atti Conv. "Territorio e Società nelle aree meridionali". Bari-Matera 24-27 Ottobre 1996: 183-228. Museo Orto Botanico Univ. Bari, Mario Adda Ed.
- GROVES H., 1887 – *Flora della costa meridionale della Terra d'Otranto*. Giorn. Bot. Ital., 19: 110-219.
- HSIAO C., CHATTERTON N.J., ASAY K.H., JENSEN K.B., 1995 – *Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences*. Genome, 38: 211-223.
- HU X.G., WU B.H., YAN Z.H., DAI S.F., ZHANG L.Q., LIU D.C., ZHENG Y.L., 2012 – *Characteristics and polymorphism of NAM gene from Aegilops section Tritopsis species*. African J. Agric. Res., 7: 5252-5258.
- KELLOGG E.A., APPELS R., 1995 – *Intraspecific and interspecific variation in 5S RNA genes are decoupled in diploid wheat relatives*. Genetics, 140: 325-343.
- KELLOGG E.A., APPELS R., MASON-GAMER R.J., 1996 – *When genes tell different stories: the diploid genera of Triticeae (Gramineae)*. Syst. Bot., 21: 321-347.
- KIMBER G., ZHAO Y.H., 1983 – *The D genome of the Triticeae*. Can. J. Gen. Cytol., 25: 581-589.
- LÖVE Á., 1984 – *Conspectus of the Triticeae*. Feddes Repertorium, 95: 425-521.
- MARCHIORI S., MEDAGLI P., SABATO S., RUGGIERO L., 1993 – *Remarques chorologiques sur quelques taxa nouveaux ou rares dans le Salento (Pouilles, Italie)*. Inform. Bot. Ital., 25(1): 37-45.
- MASON-GAMER R.J., 2005 – *The  $\beta$ -amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae)*. Am. J. Bot., 92: 1045-1058.
- MASON-GAMER R.J., KELLOGG E.A., 1996 – *Chloroplast DNA analysis of the monogenomic Triticeae: phylogenetic implications and genome-specific markers*. In: P.P. JAUHAR (Ed.), *Methods of Genome Analysis in Plants*: 301-325. CRC Press, Boca Raton, FLA.
- MEDAGLI P., SCIANDRELLO S., MELE C., DI PIETRO R., WAGENSOMMER R.P., URBANO M., TOMASELLI V., 2014 – *Analisi della biodiversità vegetale e cartografia della vegetazione, degli habitat e dell'uso del suolo della Riserva Naturale Statale "Le Cesine" (Lecce - Puglia)*. Quad. Bot. Amb. Appl., in stampa.
- MELE C., CAFORIO F., MARCHIORI S., 2006 – *Remarkable species occurring in the Alimini Lakes (Apulia South Italy), an area proposed as a Site of Community Interest*. Bocconea, 19: 253-260.
- PERRINO E.V., 2011 – *New data on Aegilops uniaristata Vis. in Italy*. Natura Croatica, 20(1): 117-123.
- PERRINO E.V., SIGNORILE G., 2009 – *Costa di Monopoli (Puglia): check-list della flora vascolare*. Inform. Bot. Ital., 41(2): 263-279.
- PERRINO E.V., WAGENSOMMER R.P., 2012 – *Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana: Aegilops uniaristata Vis.* Inform. Bot. Ital., 44(1): 201-203.
- , 2013a – *Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana: Aegilops biuncialis Vis.* Inform. Bot. Ital., 45(1): 119-121.
- , 2013b – *Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana: Aegilops ventricosa Tausch.* Inform. Bot. Ital., 45(2): 323-326.
- PERRINO E.V., WAGENSOMMER R.P., MEDAGLI P., 2014 – *Aegilops (Poaceae) in Italy: taxonomy, geographical distribution, ecology, vulnerability and conservation*. Syst. Biodiv., 12(3): 331-349 (with online Supplement).
- PETERSEN G., SEBERG O., 2002 – *Molecular evolution and phylogenetic application of DMC1*. Mol. Phylogen. Evol., 22: 43-50.
- PETERSEN G., SEBERG O., YDE M., BERTHELSEN K., 2006 – *Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (Triticum aestivum)*. Mol. Phylogen. Evol., 39: 70-82.
- PIGNATTI S., 1982 – *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- ROSSI G., MONTAGNANI C., GARGANO D., PERUZZI L., ABELI T., RAVERA S., COGONI A., FENU G., MAGRINI S., GENNAI M., FOGGI B., WAGENSOMMER R.P., VENTURELLA G., BLASI C., RAIMONDO F.M., ORSENIGO S. (Eds.), 2013 – *Lista Rossa della Flora Italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate*. Comitato Italiano IUCN, Min. Ambiente e Tutela Territorio e Mare. Roma. 54 pp.
- SALLARES R., BROWN T.A., 2004 – *Phylogenetic analysis of complete 5' external transcribed spacers of the 18S ribosomal RNA genes of diploid Aegilops and related species (Triticeae, Poaceae)*. Gen. Res. Crop Evol., 51: 701-712.
- SEBERG O., FREDERIKSEN S., 2001 – *A phylogenetic analysis of the monogenomic Triticeae (Poaceae) based on morphology*. Bot. J. Linnean Soc., 136: 75-97.
- SLAGEREN VAN M.W., 1994 – *Wild wheats: a monograph of Aegilops L. and Amblyopyrum (Jaub. et Spach) Eig (Poaceae)*. Wageningen Agricultural University, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, 9.
- VAKHITOV V.A., CHEMERIS A.V., SABIRZHANOV B.E., AKHUNOV E.D., KULIKOV A.M., NIKONOROV Y.M., GIMALOV F.R., BIKBULATOVA S.M., BAYMIEV A.K., 2003 – *The phylogeny of Triticum L. and Aegilops L. inferred from comparative analysis of nucleotide sequences in rDNA promoter regions*. Russian J. Gen., 39: 1-11.

RIASSUNTO - Da dati di letteratura risultano presenti in Italia 10 specie appartenenti al genere *Aegilops* (di cui tre specie sono da confermare). Tre di queste sono alloctone. Otto specie sono riportate per la Puglia (di cui due sono alloctone, entrambe da confermare). Tre specie presenti in Puglia sono incluse nella Lista Rossa nazionale. Viene fornita infine una chiave dicotomica per la determinazione di tutte le specie del genere *Aegilops* presenti in Italia.

## AUTORI

Robert Philipp Wagensommer (robwagensommer@yahoo.it), Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Catania, Via A. Longo 19, 95125 Catania  
 Enrico Vito Perrino (enicoperrino@yahoo.it), Museo Orto Botanico, Università di Bari "Aldo Moro", Via E. Orabona 4, 70124 Bari e CIHEAM - Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Via Ceglie 28, 70010 Valenzano (Bari)

## Estrazione di polisaccaridi bioattivi dai cereali per la preparazione di pasta funzionale

P.P. MARRESE, A. MONTEFUSCO, A. IURLARO, G. DALESSANDRO, G. PIRO, M.S. LENUCCI

**ABSTRACT** - *Extraction of bioactive polysaccharides from cereals for the preparation of functional pasta* - In this work a protocol for  $\beta$ -glucan extraction from wholemeal oat flour was developed. The extract containing 33-36%  $\beta$ -glucans was mixed with durum wheat semolina, cultivar Pietrafitta, in a ratio 1:10 by weight and used in pasta-making tests. Pasta made with 100% semolina (control) or with a blend semolina/barley flour (11%  $\beta$ -glucans) 6:4 by weight were also made and assayed for total carbohydrates and  $\beta$ -glucans. The amount of  $\beta$ -glucans in raw and cooked pasta (fusilli shape) was lower than theoretically expected but still higher than the minimum amount (1 g/serving) imposed by EFSA for placement of the health claim on the label. Release of  $\beta$ -glucans in cooking water was negligible in both functionalized pastas.

**Key words:**  $\beta$ -glucans extraction, functional pasta, total carbohydrates, wholemeal oat flour

### INTRODUZIONE

Il crescente interesse per gli alimenti funzionali ha notevolmente stimolato la ricerca finalizzata alla formulazione di pasta secca arricchita in fibre. Diverse fonti di fibre alimentari solubili e insolubili sono state miscelate in rapporto variabile con la semola per ottenere paste funzionali (fibre di legumi, crusca, inulina, guar,  $\beta$ -glucani, arabinosilani, amido resistente, ecc.) (FOSCHIA *et al.*, 2013).

Una delle fibre dietetiche più interessanti per la funzionalizzazione della pasta è rappresentata dai (1-3, 1-4)- $\beta$ -D-glucani, omopolimeri lineari costituiti da oligomeri di glucosio (2-4 residui) legati con legame  $\beta$ -(1,4), separati da un singolo legame  $\beta$ -(1,3) (Fig. 1). Questi polisaccaridi sono presenti (con talune differenze in struttura, peso molecolare e quantità) in tutti i cereali dove costituiscono costituenti strutturali della parete cellulare. Nel frumento duro costituiscono un componente minoritario della cariosside (0.5-2.3%) e sono prevalentemente localizzati nello strato aleuronico e, in minor percentuale, nell'endosperma amilaceo. In altri cereali possono raggiungere percentuali rilevanti (orzo 2.0-20.0%; avena 3.8-6.1%) in dipendenza della cultivar, ed hanno una distribuzione diversa a seconda delle specie: strato sub-aleuronico nell'avena; endosperma amilaceo nell'orzo (COLLINS *et al.*, 2010; DORNEZ *et al.*, 2011). I  $\beta$ -glucani sono largamente utilizzati dall'industria alimentare per la preparazione di prodotti da forno, lattiero-caseari, condimenti, zuppe, bevande, insac-

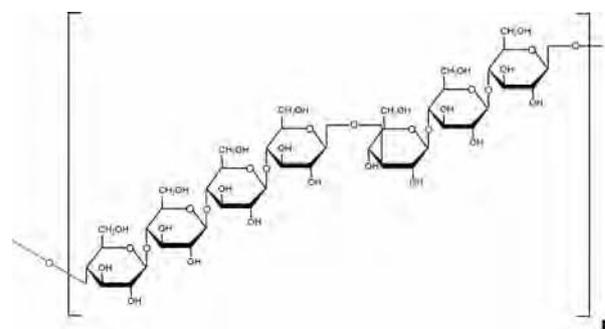


Fig. 1  
Struttura chimica dei (1-3, 1-4)- $\beta$ -D-glucani.  
Chemical structure of (1-3, 1-4)- $\beta$ -D-glucans.

cati a ridotto contenuto di grassi, ecc. La loro aggiunta sotto forma di idrocolloidi (LEE *et al.*, 2009) o microparticoli (HUNTER *et al.*, 2002) incide sull'aspetto, consistenza, *texture* e proprietà organolettiche dei cibi, in modo dipendente dalla concentrazione, peso molecolare e struttura, determinando, in alcuni casi, un miglioramento delle proprietà sensoriali del prodotto (KALINGA, MISHRA, 2009).

Recentemente, la *Food and Drug Administration* ha incluso i  $\beta$ -glucani nell'elenco dei prodotti che contribuiscono alla diminuzione del colesterolo nel sangue, consigliando un consumo di  $\sim 3$  g/die. L'*Euro-*

pean Food Safety Authority (EFSA) ha inoltre stabilito che il *claim* “i  $\beta$ -glucani contribuiscono al mantenimento dei livelli normali di colesterolo nel sangue” possa essere applicato ad alimenti contenenti almeno 1 g/porzione di  $\beta$ -glucani (MOTILVA *et al.*, 2014).

Attualmente sono disponibili in commercio paste arricchite in  $\beta$ -glucani preparate miscelando macinati integrali di cereali con semola di frumento duro. In tal caso spesso si evidenziano problematiche legate all'interferenza, da parte delle particelle di crusca e germe, alla corretta formazione del glutine nell'impasto (MANTHEY, SCHORNO, 2002) che risulta meno omogeneo e influenza negativamente la colorazione, la tenuta alla cottura e le proprietà sensoriali della pasta rispetto a quella di sola semola (FOSCHIA *et al.*, 2013). In questo lavoro un estratto solubile ottenuto a partire da farina di avena è stato utilizzato per la preparazione di una pasta funzionale arricchita in  $\beta$ -glucani. La quantità di  $\beta$ -glucani nella pasta è stata valutata a crudo e dopo cottura, e confrontata con quella di una pasta controllo (di sola semola) e di una pasta arricchita in  $\beta$ -glucani preparata miscelando la semola con il 40% di farina di orzo.

#### MATERIALI E METODI

L'estrazione dei  $\beta$ -glucani è stata condotta utilizzando farina integrale di avena (Molino Flli De Leo – Lequile, Lecce). Le farine sono state impacchettate in due veli di garza sterile ed immerse in 2,5 l di acqua. L'estrazione è stata condotta a diverse temperature (25 °C, 50 °C, 75 °C, 100 °C e 120 °C) per 1 ora. Al termine dell'estrazione la farina è stata allontanata e la soluzione lasciata raffreddare. L'amido passato in soluzione è stato idrolizzato aggiungendo 2 ml/l di *Termamyl* 120L (829 U/ml, *Sigma*), un'amilasi termoresistente, e 70mg/l di  $\text{CaCl}_2$ . L'idrolisi è stata condotta a 96 °C per 1 ora. Dopo aver concentrato l'estratto a 100 ml, la componente polimerica è stata precipitata in etanolo freddo (-20 °C) alla concentrazione finale del 50%, centrifugando a 6000g per 15 minuti. Il pellet ottenuto è stato liofilizzato per ottenere un materiale pulverulento che è stato idrolizzato in acido trifluoroacetico 2M e sottoposto ad analisi della composizione glicosidica secondo il metodo descritto da LENUCCI *et al.* (2008). Il protocollo ottimale di estrazione è stato applicato per preparare la quantità di farina necessaria ad effettuare prove di pastificazione. In queste ultime, effettuate presso il pastificio Belladauna (Candela, Foggia), è stata usata semola di grano duro della cultivar Pietrafitta, caratterizzata da un elevato contenuto proteico e un buon indice di glutine. Sono stati preparati diversi impasti: sola semola (controllo), semola/estratto di  $\beta$ -glucani (10:1 in peso) e semola/farina di orzo (6:4 in peso). Dopo aver aggiunto acqua (44-45%) l'impasto è stato lavorato per 15 minuti ed estruso a ~50 °C in formato fusillo. La pasta è stata quindi essiccata a 50 °C per 16 h.

La quantificazione dei  $\beta$ -glucani in tutti i campioni è stata effettuata secondo il metodo ufficiale AOAC 995.16 utilizzando l'apposito *kit* della *Megazyme* (Megazyme International Ireland, Wicklow, Ireland).

Tali analisi sono state condotte anche sulla pasta cotta e sull'acqua di cottura previa liofilizzazione dei campioni. La determinazione della quantità di carboidrati totali nella pasta è stata effettuata con il metodo dell'antrone (LEYVA *et al.*, 2008).

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Partendo da una farina di avena integrale con contenuto di  $\beta$ -glucani pari a ~4% è stato messo a punto un protocollo per la preparazione di un estratto ricco in fibre solubili. La temperatura di estrazione influenza notevolmente la quantità di estratto liofilizzato ottenuto e la quantità totale di polisaccaridi in esso presenti (Tab. 1). Il massimo rapporto polisaccaridi/estratto (50%) è stato ottenuto a 75 °C, inoltre, la componente polisaccaridica estratta a tale temperatura risultava costituita per circa il 96,9% da glucosio, seguito da arabinosio (2,7%) e acido galatturonico (0,4%), indice della presenza prevalente di glucani. Nello specifico, la quantità di  $\beta$ -glucani è risultata compresa tra 33-36%.

TABELLA 1

*Effetto della temperatura di estrazione sulle quantità di estratto liofilizzato e polisaccaridi totali ottenute da farina integrale di avena. I valori in tabella rappresentano le medie di almeno 3 determinazioni indipendenti.*

*Effect of extraction temperature on the amount of freeze-dried extract and polysaccharides obtained from wholemeal oat flour. Values in table are the average of at least 3 independent determinations.*

Temp. (°C)	Estratto (g/Kg farina di avena)	Polisaccaridi	P/E %
25	54,8	13,5	25
50	59,9	15,2	25
75	120,7	60,3	50
100	187,4	58,2	31
120	242,2	76,8	32

L'estratto liofilizzato è stato miscelato con semola di grano duro della cultivar “Pietrafitta”, il cui contenuto di  $\beta$ -glucani è risultato essere ~0,2%, in modo tale da ottenere una quantità teorica di tali polisaccaridi nella miscela pari a ~3%. Alternativamente la semola è stata utilizzata tal quale (controllo) o miscelata con una farina di orzo (contenente ~11% di  $\beta$ -glucani) in rapporto 6:4.

La quantità di carboidrati totali è risultata essere pari al 64,7% nella pasta controllo, 65,6% in quella con farina di orzo e 69,8% in quella preparata con l'estratto; tali valori non sono statisticamente differenti e rientrano nei valori tipici della pasta secca di frumento duro. La quantità di  $\beta$ -glucani misurata nella pasta funzionalizzata (Tab. 2) è risultata significativamente inferiore rispetto a quella attesa (~3% e ~5% nella pasta ottenuta miscelando la semola con l'estratto e con farina di orzo, rispettivamente), verosimilmente a causa della degradazione parziale dei  $\beta$ -glucani durante il processo produttivo o al loro

intrappolamento nelle maglie del glutine che non ne permette la corretta quantificazione. Tale riduzione è risultata maggiore nella pasta preparata con l'estratto contenente  $\beta$ -glucani (-56%) rispetto a quella preparata con farina di orzo (-28%).

TABELLA 2

Contenuto di  $\beta$ -glucani nella pasta prima e dopo cottura. I valori in tabella rappresentano le medie di almeno 3 determinazioni indipendenti.

Amount of  $\beta$ -glucans in pasta before and after cooking. Values in table are the average of at least 3 independent determinations.

Pasta	Quantità di $\beta$ -glucani (g/100g peso secco)	
	Cruda	Cotta
Controllo	< 0,1	~ 0,1
Semola/orzo	~ 3,6	~ 3,7
Semola/estratto	~ 1,3	~ 1,5

La perdita di  $\beta$ -glucani nell'acqua di cottura è risultata essere trascurabile (-2%) in entrambe le paste funzionalizzate; allo stesso tempo la percentuale di  $\beta$ -glucani nella pasta dopo cottura è risultata leggermente aumentata, probabilmente per il rilascio di amido nell'acqua di cottura. Considerando 70 g la porzione media giornaliera di pasta che un soggetto sano dovrebbe assumere in regime dietetico la quantità di  $\beta$ -glucani in entrambe le paste funzionali è risultata superiore al limite imposto dall'EFSA per l'applicazione in etichetta del *claim* salutistico.

*Ringraziamenti* – Si ringrazia il pastificio Belladauna di Marinaccio Rocco e C. s.a.s e la Dott.ssa Lamacchia Carmela per la disponibilità ed il supporto nelle prove di pastificazione. Questo lavoro è finanziato con fondi PON, progetto Pro.Ali.Fun. - PON02\_00186\_2937475.

## LETTERATURA CITATA

- COLLINS H.M., BURTON R.A., TOPPING D.L., LIAO M.L., BACIC A., FINCHER G.B., 2010 – *Variability in the fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition*. Cereal Chem., 87: 272-282.
- DORNEZ E., CUYVERS S., HOLOPAINEN U., NORDLUND E., POUTANEN K., DELCOUR J.A., COURTIN C.M., 2011 – *Inactive fluorescently labeled xylanase as a novel probe for microscopic analysis of arabinoxylan containing wheat cell walls*. J. Agric. Food Chem., 59: 6369-6375.

## AUTORI

Pier Paolo Marrese (pierpaolo.marrese@unisalento.it), Anna Montefusco (anna.montefusco@unisalento.it), Andrea Iurlaro (iurlaro.andrea@libero.it), Giuseppe Dalessandro (giuseppe.dalessandro@unisalento.it), Gabriella Piro (gabriella.piro@unisalento.it), Marcello Salvatore Lenucci (marcello.lenucci@unisalento.it), Di.S.Te.B.A., Università del Salento, Via Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce

- FOSCHIA M., PERESSINI D., SENSIDONI A., BRENNAN C.S., 2013 – *The effects of dietary fibre addition on the quality of common cereal products*. J. Cereal Sci., 58: 216-227.
- HUNTER K.W., GAULT R.A., BERNER M.D., 2002 – *Preparation of microparticulate  $\beta$ -glucan from Saccharomyces cerevisiae for use in immune potentiation*. Lett. Appl. Microbiol., 35: 267-271.
- KALINGA D., MISHRA V.K., 2009 – *Rheological and physical properties of low fat cakes produced by addition of cereal  $\beta$ -glucan concentrates*. J. Food Process. Preserv., 33: 384-400.
- LEE S., INGLETT G.E., PALMQUIST D., WARNER K., 2009 – *Flavor and texture attributes of foods containing  $\beta$ -glucan-rich hydrocolloids from oats*. LWT-Food Sci. Technol., 42: 350-357.
- LENUCCI M.S., LEUCCI M.R., PIRO G., DALESSANDRO G., 2008 – *Variability in the content of soluble sugars and cell wall polysaccharides in red-ripe cherry and high-pigment tomato cultivars*. J. Sci. Food Agr., 88: 1837-1844.
- LEYVA A., QUINTANA A., SÁNCHEZ M., RODRÍGUEZ E.N., CREMATA J., SÁNCHEZ J.C., 2008 – *Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation*. Biologicals, 36: 134-141.
- MANTHEY F.A., SCHORNO A., 2002 – *Physical and cooking quality of spaghetti made from wholewheat durum*. Cereal Chem., 79: 504-510.
- MOTILVA M.J., SERRA A., BORRÁS X., ROMERO M.P., DOMÍNGUEZ A., LABRADOR A., PEIRÓ L., 2014 – *Adaptation of the standard enzymatic protocol (Megazyme method) to microplate format for  $\beta$ -(1,3)(1,4)-D-glucan determination in cereal based samples with a wide range of  $\beta$ -glucan content*. J. Cereal Sci., 59: 224-227.

**RIASSUNTO** - In questo lavoro è stato messo a punto un protocollo per l'estrazione dei  $\beta$ -glucani da farina integrale di avena. L'estratto, contenente 33-36% di  $\beta$ -glucani, è stato combinato con semola di grano duro della cultivar Pietrafitta in un rapporto ponderale di 1:10 e utilizzato in prove di pastificazione. Allo stesso tempo è stata preparata una pasta controllo costituita da 100% di semola e una pasta costituita da semola e farina di orzo (-11% di  $\beta$ -glucani) in rapporto ponderale di 6:4. Tutte le tipologie di pasta sono state analizzate per il contenuto di carboidrati totali e  $\beta$ -glucani. La quantità di  $\beta$ -glucani nella pasta (fusilli) cruda e cotta è risultata inferiore a quella teoricamente prevista, ma comunque superiore al limite minimo (1 g/porzione) imposto dall'EFSA per l'applicazione in etichetta del *claim* salutistico. Il rilascio di  $\beta$ -glucani nell'acqua di cottura è risultato trascurabile in entrambe le paste funzionalizzate.