

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA

SEZIONE PUGLIESE

RIUNIONE SCIENTIFICA

ABSTRACTS DELLE RELAZIONI

Lecce  
18 gennaio 2008



## Riunione Scientifica della Sezione Pugliese della Società Botanica Italiana

Lecce, 18 gennaio 2008

### Localizzazione *in vivo* di CesA6-GFP in protoplasti di *Nicotiana tabacum* L.

M. DE CAROLI, M. LENUCCI, G. DALESSANDRO e G. PIRO. Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

Conoscere i meccanismi che regolano la biosintesi dei polisaccaridi, la deposizione, l'assemblaggio e le interazioni con gli altri componenti della parete è fondamentale visto il ruolo che questi polimeri svolgono non solo nella pianta, ma anche in numerose applicazioni che coinvolgono l'uomo. Studi effettuati su cotone e *Arabidopsis* hanno permesso l'identificazione dei geni *CesA* che codificano per una famiglia di proteine (*CesA*) che costituiscono le subunità catalitiche della cellulosa sintasi (PEAR *et al.*, 1996). Grazie al sequenziamento dell'intero genoma di *Arabidopsis* è stato possibile identificare la presenza di dieci geni codificanti per *CesA* (HOLLAND *et al.*, 2000). La funzione della maggior parte di questi geni non è del tutto nota. Analisi effettuate seguendo il differenziamento della parete hanno evidenziato che almeno tre isoforme di *CesA* (*CesA1*, 3 e 6), durante la formazione della parete primaria, e tre (*CesA4*, 7 e 8), durante la formazione della parete secondaria, svolgono ruoli distinti nei meccanismi di biosintesi della cellulosa. Il complesso cellulosa sintasi è stato caratterizzato fondamentalmente attraverso studi di microscopia elettronica e analisi biochimiche (BROWN, SAXENA, 1996; DELMER, 1999). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di visualizzare *in vivo* il *sorting* di una subunità catalitica del complesso cellulosa sintasi effettuando una fusione tra la Green Fluorescent Protein (GFP) e la porzione C-terminale della subunità *CesA6* del complesso cellulosa sintasi di *Arabidopsis*. È stato prodotto il costrutto *CesA6-gfp*. Il pattern di fluorescenza della chimera è stato seguito in protoplasti ottenuti da foglie di tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) trasformati in maniera transiente con *CesA6-gfp*. Le osservazioni effettuate al microscopio confocale, dopo 18 ore di trasformazione, hanno permesso di stabilire che la proteina di fusione *CesA6-GFP* entra nella via di secrezione marcando il RE, i dattiosomi, la membrana plasmatica e compartimenti prevacuolari. A livello della membrana plasmatica la fluorescenza dovuta alla presenza di *CesA6-GFP* appare distribuita in maniera puntiforme e discontinua. Test di plasmolisi in presenza di NaCl 0.6 M, associati con prove di collocazione con FM4-64, un colorante specifico per la membrana plasmatica, hanno confermato la presenza di *CesA6-GFP* sulla membrana plasmatica. I test

condotti con cicloesimide, inibitore della sintesi proteica, hanno permesso di confermare che la localizzazione definitiva di *CesA6-GFP* è, in minima parte, in strutture puntiformi sulla membrana plasmatica e, maggiormente, in compartimenti prevacuolari. Per valutare la funzionalità della chimera, protoplasti controllo e protoplasti trasformati con *CesA6-gfp* sono stati incubati per 18 ore in presenza di D-[U-<sup>14</sup>C] glucosio come tracciante radioattivo, secondo quanto riportato in LEUCCI *et al.* (2007). L'assenza di differenze rilevanti nella quantità di cellulosa neosintetizzata nei protoplasti controllo e nei protoplasti trasformati ha indicato che *CesA6-GFP* non è una chimera funzionale. Le osservazioni confocali e le indagini radioisotopiche sono state avvalorate da analisi biochimiche. Il *western blot* delle proteine estratte dai protoplasti trasformati con *CesA6-gfp* ha evidenziato che la proteina chimerica non è rilevabile a livello di plasmalemma, mentre si riscontra nella frazione di proteine solubili come unica banda di circa 116 kD. Poiché la GFP ha un peso molecolare di 27 kDa, per differenza è possibile calcolare il peso molecolare presunto della subunità *CesA6* matura che risulta essere di circa 89 kDa. Attraverso analisi bio-informatiche (WWW.EXPASY.IT) è stato ipotizzato un peso molecolare di circa 112,5 kDa per la subunità *CesA6* non matura.

I risultati ottenuti in questo lavoro indicano che *CesA6-GFP* ha un *turnover* molto elevato, la chimera arriva attraverso la via di secrezione alla membrana plasmatica, ma viene rapidamente internalizzata nei compartimenti prevacuolari. Tale riciclo non sembra essere dovuto ad un eccesso della proteina chimerica rispetto alle altre subunità della rosetta con le quali deve interagire per la formazione di un complesso stabile in quanto, analisi di espressione semi-quantitativa, hanno chiarito che la sovraespressione di *CesA6-gfp* attiva anche l'espressione di *CesA1*, subunità coinvolta nella produzione di cellulosa nella parete primaria. Sembra verosimile che il veloce *turnover* di *CesA6-GFP* dal plasmalemma al vacuolo sia dovuto al fatto che la GFP nella chimera è legata alla porzione C-terminale di *CesA6* determinando un ingombro sterico che potrebbe impedire il corretto inserimento delle sequenze transmembrana a livello di membrana plasmatica. La mancata formazione di un complesso cellulosa sintasi funzionale determinerebbe l'immediato riciclo della chimera al vacuolo.

#### LETTERATURA CITATA

BROWN R.M.J., SAXENA I.M., 2000 – *Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers*. Plant Physiol. Biochem., 38: 57-67.

- DELMER D.P., 1999 – *Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50: 245-276.
- HOLLAND N., HOLLAND D., HELENTJARIS T., DHUGGA K.S., XOCONOSTLE-CAZARES B., DELMER D.P., 2000 – *A comparative analysis of the plant cellulose synthase (CesA) gene family*. Plant Physiol., 123: 1313-1324.
- LEUCCI M.R., DI SANSEBASTIANO G.-P., GIGANTE M., DALESSANDRO G., PIRO G., 2007 – *Secretion marker proteins and cell-wall polysaccharides move through different secretory pathways*. Planta, 225: 1001-1017.
- PEAR J.R., KAWAGOE Y., SCHRECKENGOST W.E., DELMER D.P., STALKER D.M., 1996 – *Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 12637-12642.
- WWW.EXPASY.IT

Questo lavoro è stato finanziato con i fondi del progetto PRIN 2005.

### Studio “in vivo” della specificità delle SNARE

M. FARACO, G. DALESSANDRO e G.-P. DI SANSEBASTIANO. Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

Il 16-20% del genoma vegetale è dedicato al mantenimento del complesso di endomembrane anche noto come sistema di secrezione.

La sua complessità aumenta negli organismi pluricellulari, nei quali si è resa indispensabile la secrezione regolata e polarizzata. La complessità cresce in particolare nei passaggi che interessano l'esocitosi e lo smistamento post-Golgi che vede il differenziarsi di compartimenti lisosomiali, vacuolari ed endosomiali. Un tale percorso evolutivo è stato reso possibile dalla duplicazione e diversificazione di proteine SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; SANDERFOOT, 2007) e Rab (RUTHEFORD, MOORE, 2002).

Le piante superiori, fra tutti gli eucarioti, hanno il maggior numero di geni della famiglia SNARE (così come di geni Rab). Con un numero di geni tra 65 e 74, ne hanno quasi il doppio di mammiferi come l'uomo ed il triplo di molti eucarioti unicellulari. Le piante sembrano quindi gli organismi in cui le endomembrane hanno raggiunto il maggior grado di complessità. In molti casi però resta da chiarire se la duplicazione e diversificazione dei geni SNARE corrispondano realmente ad una specificità funzionale. Le proteine SNARE regolano la specificità del traffico di membrana interagendo in complessi eterologhi. L'ambiente cellulare in cui interagiscono modula l'interazione e gli studi *in vitro* portano irrimediabilmente a sottostimare la loro specificità e rendono essenziale la ricerca di nuovi approcci *in vivo*.

Una potente strategia per studi *in vivo* è emersa negli ultimi anni e prevede la neutralizzazione selettiva di specifiche interazioni attraverso lo sviluppo e l'espressione in cellula di mutanti dominanti negativi (DN). Tale strategia si applica perfettamente allo studio delle SNARE. La presenza di una versione muta-

ta di una proteina SNARE impedisce il funzionamento anche delle altre proteine del complesso, rivelandone l'identità e la specificità d'azione.

Grazie all'uso di marcatori enzimatici della secrezione come secRGUS, o del trasporto vacuolare come RGUS-Chi (DI SANSEBASTIANO *et al.*, 2007), possiamo oggi testare la partecipazione di più proteine ad uno stesso evento di traffico vescicolare. Associando la metodica all'osservazione di tag fluorescenti che mettono in evidenza la normale o alterata dinamica delle membrane in presenza dei mutanti DN, si riesce a evidenziare se DN diversi si distinguono o sono ridondanti nel loro effetto inibitorio. Dimostrando nell'ultimo caso che il loro effetto si esplica nel controllo del medesimo pathway.

Validando questo metodo con ulteriori approcci sperimentali e concentrando l'attenzione sul trasporto Golgi-plasmalemma, abbiamo sinora potuto dimostrare che SYP121 e SYP122 definiscono eventi di esocitosi separati; Rab11 opera nella regolazione specifica di SYP122; SNAP33 interagisce sia con SYP121 che SYP122. La significatività dei dati è stata testata statisticamente grazie all'elevato numero di combinazioni che ha bilanciato il ridotto numero di repliche (Student-Newman-Keuls per ANOVA post hoc test [F(20)=11,65; p=0.000]) e sostiene l'attendibilità dell'approccio sperimentale. Oltre a completare l'analisi delle più interessanti situazioni osservate sulla membrana plasmatica, stiamo ora estendendo questo genere di analisi comparative anche a SNARE vacuolari.

#### LETTERATURA CITATA

- DI SANSEBASTIANO G.-P., REHMAN R.U., NEUHAUS J.-M., 2007 – *Development of rat  $\beta$ -glucuronidase as a reporter protein for the analysis of the plant secretory pathway*. Plant Biosystems, 141(3): 329-336.
- RUTHERFORD S., MOORE I., 2002 – *The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation*. Curr Opin Plant Biol., 5(6): 518-528.
- SANDERFOOT A., 2007 – *Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants*. Plant Physiol., 144(1): 6-17.

### Glicoproteine in *Leptolyngbya VRUC 135*

D. CADINU, M. LENUCCI, G. DALESSANDRO e G. PIRO. Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

I cianobatteri costituiscono un ampio e diversificato gruppo di procarioti fotosintetici. Questi organismi non posseggono un sistema di endomembrane, sito degli eventi di glicosilazione negli eucarioti; pertanto, le glicosiltransferasi coinvolte nella sintesi dei polisaccaridi, e in generale dei glicconiugati, sono localizzate a livello di membrana interna ed esterna e interagiscono attivamente con i fosfolipidi e con proteine strutturali e regolatorie (HOICZYK, HANSEL, 2000; SELTMANN, HOLST, 2002). Ancora poco si conosce sui meccanismi che regolano la biosintesi

delle catene oligosaccaridiche delle glicoproteine nei cianobatteri; caratteristiche comuni con gli organismi eucarioti sono l'utilizzo di zuccheri attivati (nucleosidi difosfato zuccheri) per l'assemblaggio della catena oligosaccaridica e l'utilizzo di un lipide ancorato alla membrana come intermediario nella via biosintetica (SCHAFFER *et al.*, 2001).

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare, *in vivo*, la presenza di glicoproteine in *Leptolyngbya VRUC 135*, un cianobatterio fototrofico isolato da affreschi della *Domus aurea* a Roma (ALBERTANO, 1991). Le indagini sono state condotte studiando il metabolismo della D-glucosamina e la biosintesi delle glicoproteine utilizzando (D)-[U-<sup>14</sup>C]-glucosamina come tracciante radioattivo. Dopo 3 ore di incubazione, circa il 78% della glucosamina radioattiva viene assunto, metabolizzato ed incorporato nelle glicoproteine intra ed extracellulari. L'analisi quantitativa e qualitativa dei composti radioattivi presenti nel pool solubile estratto in etanolo al 95% ha permesso di identificare gli intermediari della via metabolica della glucosamina in *Leptolyngbya VRUC 135*. La D-glucosamina viene convertita in D-glucosamina 6-P (19%), N-acetil-D-glucosamina (33%), N-acetil-D-glucosamina 6-P (6%), N-acetil-D-glucosamina 1-P (7%), UDP-N-acetil-D-glucosamina (7%) e UDP-N-acetil-D-galattosamina (2%). La contemporanea presenza di D-glucosamina 6-P e N-acetil-D-glucosamina porta a dedurre che in *Leptolyngbya* la prima tappa del metabolismo delle esosamine avvenga sia attraverso la fosforilazione della D-glucosamina, sia attraverso la sua acetilazione. Le percentuali con cui i due intermediari sono presenti sembrano evidenziare una maggiore efficienza nell'acetilazione della D-glucosamina piuttosto che una sua fosforilazione. UDP-N-acetil-D-glucosamina e UDP-N-acetil-D-galattosamina rappresentano nei cianobatteri i donatori utilizzati per biosintesi delle catene oligosaccaridiche di glicoproteine, glicolipidi e di peptidoglicani. Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state rotte mediante sonicazione. La caratterizzazione delle glicoproteine è stata effettuata su tre frazioni proteiche: proteine dello spazio periplasmico e associate ai rivestimenti esterni (precipitate a 12000g), proteine di membrana (precipitate a 100000g) e proteine solubili (SN 100000g). Composti radiomarcanti sono presenti in ogni frazione. La frazione solubile è risultata quella più ricca in proteine (7,7 mg), in larga parte per la presenza di grandi quantità di ficobiliproteine; seguita dalle proteine associate alle membrane (1,1 mg) e dalla frazione precipitata a 12000g (0,5 mg). Considerando la radioattività per microgrammo di proteine, valore che esprime la distribuzione relativa dei composti radioattivi nelle varie frazioni, le glicoproteine sembrano essere presenti fondamentalmente nella frazione attribuita al periplasma e ai rivestimenti esterni (1178 dpm/ mg di proteine totali); sono meno presenti a livello di membrana (176 dpm/mg di proteine totali) e nel solubile (78 dpm/mg di proteine totali). La separazione elettroforetica dei composti radioattivi presenti nelle 3 frazioni evidenzia una serie di bande glicoproteiche

nelle proteine precipitate a 12000g; solo una banda di PM tra 42 e 66 KDa identifica composti glicosilati associati alle membrane mentre non sono state evidenziate glicoproteine nella frazione solubile.

Peculiarità dei cianobatteri è quella di rilasciare materiale polisaccaridico nell'ambiente circostante. Sono stati quindi analizzati anche i composti presenti nel mezzo di incubazione per evidenziare l'eventuale presenza di glicoproteine. Il pattern elettroforetico di questa frazione presenta numerose bande radiomarcate che, ad una prima analisi, sembrano essere lipopolisaccaridi. Questo tipo di molecole contenenti N-acetil-glucosamina e presenti sulla membrana esterna del cianobatterio possono essere facilmente rilasciati nel mezzo esterno.

Le notizie a disposizione nel campo delle glicoproteine cianobatteriche sono ancora lontane dal fornire un quadro completo sull'argomento, è quindi importante andare continuamente ad aggiornare con nuove evidenze le informazioni disponibili in letteratura.

Si ringrazia la Prof.ssa P. Albertano (Università di Roma, "Tor Vergata") per aver fornito il ceppo di *Leptolyngbya VRUC 135*.

#### LETTERATURA CITATA

- ALBERTANO P., 1991 – *Effects of monochromatic lights on four species of leptolyngbya*. Arch. Hydrobiol., Algol. Studies, 64: 199-214.  
 HOICZYK E., HANSEL A., 2000 – *Cyanobacterial cell walls: New from an unusual prokaryotic envelope*. J. Bacteriol., 182: 1191-1199.  
 SCHAFFER C., GRANINGER M., MESSNER P., 2001 – *Prokaryotic glycosilation*. Proteomics, 1: 248-261.  
 SELTMANN G., HOLST O., 2002 – *The bacterial cell wall*. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

#### Analisi molecolare del processo di senescenza in grano duro

S. PATALEO<sup>1</sup>, A. RISO<sup>1</sup>, C. GERARDI<sup>2</sup>, P. RAMPINO<sup>1</sup> e C. PERROTTA<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Di.S.Te.B.A., Università del Salento. <sup>2</sup>ISPA-CNR, Unità di Lecce.

Nelle piante la senescenza è un processo di deterioramento che dipende dalla loro età, che si verifica a livello delle cellule, dei tessuti, degli organi o dell'intero organismo e che porta alla morte cellulare o alla fine del ciclo vitale della pianta (NOODÉN, 1988). La senescenza non è un processo passivo e disordinato di degenerazione, ma è altamente regolato e prevede l'espressione di geni specifici. Al momento, le basi molecolari che ne regolano l'induzione e la progressione non sono ancora completamente note. Esso è fondamentalmente controllato dallo stadio di sviluppo della pianta, ma anche da diversi stimoli sia interni che esterni; infatti, è stato ampiamente dimostrato che tutte le condizioni ambientali sfavorevoli possono determinare l'attivazione prematura del processo di senescenza (LIM *et al.*, 2003, 2007).

In agricoltura, la senescenza fogliare rappresenta un limite alla produttività delle colture, poiché interrompe la fase di crescita della pianta, causando l'ingiallimento delle foglie, il deperimento post-raccolto e la perdita dei nutrienti. Alla luce di ciò, comprendere le basi molecolari della senescenza è di fondamentale importanza, sia a livello biologico sia a livello biotecnologico, nella prospettiva, ad esempio, di riuscire a modulare il fenomeno della senescenza per ottenere piante con attività fotosintetica più duratura e quindi più produttive. Ciò sarebbe particolarmente interessante nel caso di piante annuali come i cereali, importantissimi dal punto di vista agronomico.

Lo scopo della ricerca è stato quello di studiare le basi molecolari della senescenza con l'obiettivo di identificare e caratterizzare geni che attivano e regolano tale processo, in una pianta fondamentale per l'agricoltura pugliese quale il grano duro. Questo tipo di ricerca è stato realizzato utilizzando, come materiale di partenza, le foglie a bandiera prelevate da piante di grano duro (*Triticum durum* Desf., cultivar Trinakria) allevate in serra; le foglie sono state prelevate a partire dallo stadio di fioritura e per tempi successivi, fino a quando le piante erano completamente secche e presentavano le spighe sgranate.

Per poter effettuare una valutazione quantitativa del sintomo della senescenza fogliare, sono stati utilizzati un parametro fisiologico ed un parametro molecolare (RAMPINO *et al.*, 2006). È stato quindi determinato il contenuto di clorofilla, considerato un indice adatto a controllare l'inizio e l'andamento temporale del processo di senescenza; è stata effettuata inoltre un'analisi molecolare, mediante la valutazione dell'induzione di geni la cui espressione, secondo quanto riportato in letteratura, è regolata differenzialmente durante la senescenza. Tra i numerosi geni noti, sono stati scelti *rbcS* (sub unità piccola della Rubisco), *cab* (proteina che lega la clorofilla a/b) e *G6PDH* (glucosio-6-fosfato deidrogenasi), la cui espressione diminuisce al progredire della senescenza; sono stati selezionati inoltre due geni denominati *HvS40* (gene di *H. vulgare* la cui funzione è sconosciuta) e *LSC650* (ipotetica catalasi di *B. napus*), i cui trascritti si accumulano specificamente durante la senescenza. È stata effettuata l'analisi di espressione mediante RT-PCR, utilizzando *primer* specifici per i geni di interesse.

I risultati ottenuti dall'analisi fisiologica e dall'analisi molecolare indicano che il processo di senescenza, nella cultivar utilizzata, ha inizio a 25 giorni dopo la fioritura (DAF) e termina a 29 DAF, quando le piante sono completamente gialle e con spighe sgranate. Ciò corrisponde, a livello molecolare, alla minima espressione dei geni *rbcS*, *cab* e *G6PDH* e alla massima espressione dei geni *HvS40* e *LSC650*.

La maggior parte degli studi sulla regolazione del processo di senescenza è stata realizzata utilizzando principalmente due approcci: l'approccio genetico e l'approccio molecolare. L'approccio genetico consiste nell'isolamento e caratterizzazione di mutanti che evidenziano il fenotipo senescenza alterato (HENSEL *et al.*, 1993). L'approccio alternativo è quello di identificare e caratterizzare geni per i quali è stato dimo-

strato un incremento o una riduzione dell'espressione durante la senescenza fogliare; quest'ultimo è l'approccio seguito nello studio qui riportato.

Negli ultimi anni sono state messe a punto diverse tecniche che hanno consentito di individuare numerosi "Geni Associati alla Senescenza" (SAG) (ANDERSSON *et al.*, 2004; BUCHANAN-WOLLASTON *et al.*, 2005). Tra tutte queste tecniche, allo scopo di identificare geni espressi differenzialmente durante la senescenza, è stata utilizzata la tecnica del cDNA-AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*). Questa tecnica è basata sulla PCR, non richiede conoscenze preliminari sulle sequenze dei geni da identificare, ed è caratterizzata da un'elevata riproducibilità e sensibilità.

Le reazioni di cDNA-AFLP sono state allestite utilizzando l'RNA totale estratto dalle foglie a bandiera prelevate allo stadio di fioritura della pianta, fase in cui il processo di senescenza non era attivo, e a 29 DAF, quando il processo di senescenza era in fase avanzata. Sono state utilizzate 23 diverse combinazioni di *primer*. Questo tipo di analisi ha consentito di visualizzare in totale circa 2500 frammenti (TDF); di questi, 82 erano relativi a geni differenzialmente espressi. In particolare, 45 TDF corrispondevano a geni inibiti e 37 a geni indotti durante la senescenza. Tutti questi frammenti sono stati eluiti dal gel, clonati e sequenziati; le sequenze nucleotidiche ottenute e quelle amminoacidiche dedotte sono state confrontate con quelle presenti nelle banche dati. Tra le sequenze analizzate, 30 presentavano un'elevata omologia con geni noti (per proteine coinvolte nel rimodellamento della parete cellulare, per proteine ribosomali, per cicline e per fattori di trascrizione), 14 presentano un'elevata omologia con EST identificate in diverse situazioni di stress (disidratazione, infezione da patogeni, trattamento con alluminio); infine, 3 TDF presentavano un'elevata omologia con geni espressi in piantine eziolate e 8 con geni, già identificati, i cui trascritti si accumulano specificamente dopo la fioritura. Le sequenze relative a 7 TDF non presentavano nessuna omologia.

I risultati ottenuti suggeriscono che la senescenza è caratterizzata dalla modulazione dell'espressione di numerosi geni coinvolti in diversi processi quali il rimodellamento della parete cellulare. Questi processi sono regolati da diversi fattori che partecipano alla trasduzione del segnale. Inoltre, è evidente che durante la senescenza fogliare sono attivate alcune risposte biologiche simili a quelle che vengono attivate in situazioni di stress. Infine, interessanti sono anche le sequenze che non presentano nessuna omologia con altre sequenze presenti nelle banche dati. Infatti, ci si propone di chiarirne la funzione molecolare allo scopo di ottenere nuove informazioni utili a comprendere le basi molecolari del processo di senescenza.

#### LETTERATURA CITATA

- ANDERSSON A., KESKITALO J., SJODIN A., BHALERAO R., STERKY F., WISSEL K., TANDRE K., ASPEBORG H., MOYLE R., OHMIYA Y., BRUNNER A., GUSTAFSSON P., KARLSSON J., LUNDEBERG J., NILSSON O., SANDBERG

- G., STRAUSS S., SUNDBERG B., UHLEN M., JANSSON S., NILSSON P., 2004 – *A transcriptional timetable of autumn senescence*. *Genome Biol.*, 5: R24.
- BUCHANAN-WOLLASTON V., PAGE T., HARRISON E., BREEZE E., LIM P.O., NAM H.G., LIN J., WU S., SWIDZINSKI J., ISHIZAKI K., LEAVER C.J., 2005 – *Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis*. *Plant J.*, 42: 567-585.
- HENSEL L., GRBIC V., BAUMGARTEN D.A., BLEECKER A.B., 1993 – *Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 5: 553-564.
- LIM P.O., KIM H.J., NAM H.G., 2007 – *Leaf Senescence*. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 58: 115-136.
- LIM P.O., WOO H.R., NAM H.G., 2003 – *Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 8: 272-278.
- NOODÉN L.D., 1988 – *The phenomena of senescence and aging*. In: NOODÉN L.D., LEOPOLD A.C. (Eds.), *Senescence and Aging in Plants*. 1-50. San Diego, Academic.
- RAMPINO P., SPANO G., PATALEO S., MITA G., NAPIER J.A., DI FONZO N., SHEWRY P.R., PERROTTA C., 2006 – *Molecular analysis of a durum wheat 'stay green' mutant: Expression pattern of photosynthesis-related genes*. *J. Cereal Sci.*, 43: 160-168.

### La risposta del girasole alle alte temperature: espressione di due geni per sHSP

E. ASSAB<sup>1</sup>, M. DE PASCALI<sup>1</sup>, P. RAMPINO<sup>1</sup>, G. MITA<sup>2</sup> e C. PERROTTA<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Di.S.Te.B.A., Università del Salento. <sup>2</sup>ISPA-CNR, Unità di Lecce.

Le alte temperature rappresentano uno dei fattori ambientali che maggiormente influenzano lo sviluppo e la produttività delle piante. Le piante, come tutti gli organismi viventi, rispondono alle alte temperature sintetizzando specifiche proteine, denominate *heat shock protein* (HSP), che hanno la funzione di proteggere la cellula dai danni causati dallo stress (SUN *et al.*, 2002).

Nelle piante, le HSP a basso peso molecolare o *small HSP* (sHSP) sono le HSP più abbondanti e caratterizzano la risposta HS dei vegetali (LAVOIE *et al.*, 1995). L'accumulo di queste proteine durante lo stress termico è proporzionale all'aumento della temperatura e alla durata dello stress (KOPEČEK *et al.*, 2001). Tuttavia, anche in assenza di stress si ha la sintesi di sHSP in alcune fasi dello sviluppo, nell'embriogenesi, durante la germinazione, lo sviluppo del polline e la maturazione dei frutti (SUN *et al.*, 2001). Le sHSP sono tutte codificate da geni nucleari e sono raggruppate in sei classi in base all'omologia di sequenza e alla loro localizzazione intracellulare (WATERS, 1995). Tali geni sono regolati principalmente a livello trascrizionale, mediante l'interazione di specifici fattori trascrizionali (HSF) con elementi *cis*-agenti o *heat shock element* (HSE), presenti nei loro promotori (BARROS *et al.*, 1992).

Allo scopo di chiarire le basi molecolari della risposta delle piante alle alte temperature, sono stati studiati

due geni di girasole, che codificano per sHSP (*HaHSP20.5* e *HaHSP17.6*), identificati all'interno di uno stesso clone genomico. I due geni sono particolarmente interessanti in quanto le loro *ORF*, separate da una regione intergenica di 3820 pb, hanno orientamento invertito. Inoltre, le sequenze nucleotidiche dei due geni hanno una elevatissima omologia e differiscono soprattutto per la presenza di una porzione aggiuntiva all'estremità 3' del gene denominato *HaHSP20.5*. Le sequenze amminoacidiche dedotte presentano le tipiche regioni consenso delle sHSP di classe CI; confrontando tali sequenze con quelle di altre sHSP vegetali è stato costruito un albero filogenetico, dal quale appare evidente l'origine comune delle due sHSP. Il fatto che i due geni siano fisicamente associati e che le loro sequenze amminoacidiche presentino una elevata similarità, consente di ipotizzare che essi si siano originati in seguito ad un evento di duplicazione genica.

Per comprendere meglio i meccanismi molecolari specificatamente coinvolti nella regolazione della trascrizione di questi due geni, è stata analizzata la struttura dei loro promotori. Tale analisi ha messo in evidenza che i due promotori sono sostanzialmente diversi. In entrambi sono presenti gli HSE, ma ad essi sono associati altri elementi *cis*-agenti coinvolti nella regolazione trascrizionale di geni indotti da altri fattori, quali ad esempio elementi di risposta alla carenza idrica (DRE) o di risposta alle basse temperature (LTR) etc., differenti per tipo, numero e posizione all'interno dei due promotori.

È stato analizzato il profilo di espressione di questi geni in piantine sottoposte a diversi tipi di stress. In particolare è stata analizzata la risposta alle alte temperature, sottoponendo piantine di girasole a diverse temperature (tra 25 °C e 50 °C) e per tempi differenti (da 10 minuti a 48 ore). Questa analisi è stata effettuata mediante RT-PCR quantitativa. È risultato evidente che entrambi i geni sono indotti dalle temperature elevate, ma differiscono significativamente nella cinetica di espressione e nel livello di induzione.

Inoltre è stata analizzata, mediante RT-PCR semiquantitativa, la risposta a stress diversi. Freddo, sale, siccità, ABA, etanolo, ioni metallici, acido salicilico e mannitolo inducono l'espressione del gene *HaHSP17.6*; l'espressione del gene *HaHSP20.5* è indotta solo da CoCl<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub> e NaCl.

I risultati ottenuti indicano che i due geni si esprimono in maniera diversa e che probabilmente ciò è associato ad una specificità della loro regolazione determinata dalla struttura delle sequenze di regolazione. In base a questi dati si può quindi ipotizzare che le due sHSP, pur appartenendo alla stessa classe, svolgono, all'interno della cellula sottoposta a stress, una diversa funzione.

### LETTERATURA CITATA

- BARROS M.D., CZARNECKA E., GURLEY W.B., 1992 – *Mutational analysis of a plant heat shock element*. *Plant Mol. Biol.*, 19: 665-675.
- KOPEČEK P., ALTMANNOVÁ K., WEIGL E., 2001 – *Stress proteins: nomenclature, division and functions*. *Biomed. Papers*, 142: 39-47.

- LAVOIE J.N., LAMERT H., HICKEY E., WEBER L.A., LANDRY J., 1995 – *Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27*. Mol. Cell. Biol., 15: 505–516.
- SUN W., CATHERINE B., VAN DE COTTE B., VAN MONTAGU M., VERBRUGGEN N., 2001 – *At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression*. Plant J., 27: 407–415.
- SUN W., VAN MONTAGU M., VERBRUGGEN N., 2002 – *Small heat shock proteins and stress tolerance in plants*. Biochim. Biophys. Acta, 1577: 1–9.
- WATERS E.R., 1995 – *The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants*. Genetics, 141: 785–795.

### Isolamento e caratterizzazione di geni codificanti polifenolo ossidasi da basidiomiceti appartenenti all'ordine *Agaricales*

C. LEZZI<sup>1</sup>, G. BLEVE<sup>2</sup>, P. RAMPINO<sup>1</sup>, C. PERROTTA<sup>1</sup>, G. MITA<sup>2</sup> e F. GRIECO<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Di.S.Te.B.A., Università del Salento. <sup>2</sup> CNR-ISPA, UO - Lecce.

L'avvento delle biotecnologie consente di produrre grandi quantitativi di enzimi ad elevati livelli di purezza (KIRK *et al.*, 2002). Questi possono essere utilizzati in diversi processi industriali per aumentare l'efficienza delle reazioni, ridurre i consumi ed i costi di produzione, ridurre gli scarti chimici liberati in seguito ai processi di lavorazione (VAN BEILEN, LI, 2002). Le polifenolo ossidasi e in particolare le tirosinasi, che costituiscono una loro sottoclasse, sono enzimi ubiquitari ed hanno applicazioni biotecnologiche in ambito biomedico, farmaceutico, cosmetico, industriale ed ambientale. La tirosinasi può quindi fungere da catalizzatore enzimatico nella bioconversione di determinati substrati, in alternativa alle tradizionali reazioni di sintesi chimica: produzione di orto-difenoli con proprietà antiossidanti, (HALAOULI *et al.*, 2006), sintesi di idrossitirosolo dal tirosolo (ESPÍN, WICHERS, 1999) e di L-DOPA (L-3,4-dihydroxy phenylalanine) dall'L-tirosina (RAJU *et al.*, 1993); nel trattamento di reflui contenenti sostanze tossiche e polifenoli altamente inquinanti (KARAM, NICELL, 1997). I funghi sono stati da tempo consumati dall'uomo come alimento ed anche utilizzati come fonti di derivati o sostanze naturali. Funghi appartenenti ai generi *Agaricus* e *Pleurotus* appartengono alla classe dei basidiomiceti e sono largamente utilizzati per l'estrazione e la purificazione di enzimi. Specie incluse nei suddetti due generi rappresentano ottimi candidati per studi d'isolamento e caratterizzazione di geni di interesse biotecnologico. Oggetto di questo lavoro è stato l'isolamento e la caratterizzazione di geni codificanti per polifenolo ossidasi da *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*, due specie di basidiomiceti appartenenti all'ordine degli *Agaricales*. Utilizzando primer realizzati sulle sequenze di polifenolo ossidasi fungine note, è stato possibile isolare e clonare i cDNA completi di *PPO1Ab*

(polifenolo ossidasi) e *PPO2Ab* (tirosinasi) dal carpoforo di *A. bisporus* e il gene *PPO2Po* dal DNA estratto dal micelio di *P. ostreatus*. Le sequenze relative ai geni *PPO1Ab*, *PPO2Ab* e *PPO2Po* sono lunghe rispettivamente 1.7, 1.67 e 1.67 Kb. L'allineamento delle sequenze amminoacidiche relative a tirosinasi e polifenolo ossidasi di funghi ascomiceti e basidiomiceti ha dimostrato la presenza di considerevoli omologie a livello dei domini che legano il rame che sono caratteristici della funzionalità di questi enzimi. L'analisi filogenetica ha rivelato l'esistenza di gruppi di sequenze nettamente distinti ai quali appartengono la *PPO1* di *A. bisporus* var. *albidus* (*PPO1Ab*) da una parte e le *PPO2* di *A. bisporus* var. *albidus* (*PPO2Ab*) e di *P. ostreatus* (*PPO2Po*) dall'altra. I prodotti della traduzione dei cDNA di *PPO1Ab* e *PPO2Ab* e del DNA di *PPO2Po* corrispondono a proteine di circa 64 kDa e possiedono probabili siti di N-glicosilazione, fosforilazione e attivazione vicini all'estremità C-terminale.

Allo scopo di ottenere informazioni sulle loro caratteristiche funzionali sono stati prodotti plasmidi ricombinanti adatti per l'espressione eterologa in forma nativa delle tre proteine. Il tentativo di espressione nel batterio *Escherichia coli* non ha prodotto alcuna espressione delle tre proteine e quindi le tre sequenze geniche isolate sono state inserite in un opportuno vettore ed usate per trasformare ceppi del lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

L'analisi elettroforetica delle proteine totali estratte da lieviti trasformati con i vettori contenenti le sequenze nucleotidiche relative a *PPO2Ab* e *PPO2Po*, ha rilevato la presenza di una proteina espressa, dal peso molecolare atteso di circa 64 kDa. I risultati ottenuti dall'espressione delle proteine *PPO2Ab* e *PPO2Po* in *S. cerevisiae* costituiscono i primi dati relativi all'espressione eterologa di tirosinasi di basidiomiceti in tale organismo riportati in un lavoro scientifico.

La possibilità di esprimere in forma eterologa ed in elevate quantità tirosinasi di *A. bisporus* e *P. ostreatus* enzimaticamente attive potrà consentire lo sviluppo di studi sulla loro struttura e funzione ed estendere non solo le conoscenze sull'attività biologica, ma anche le possibili applicazioni biotecnologiche di questi enzimi. Le tirosinasi infatti mostrano importanti possibili futuri impieghi nella biocatalisi industriale quali il trattamento di materiali proteici (LANTTO *et al.*, 2002) e la produzione di polimeri polifenolici (DELLA CIOPPA *et al.*, 1997) ed in campo biomedico e farmacologico (SHI *et al.*, 2002).

#### LETTERATURA CITATA

- DELLA CIOPPA G.R., GARGER S.J., HOLTZ R.B., MCCULLOCH M.J., SVERLOW G.G., 1997 – *Method for making stable, extracellular tyrosinase and synthesis of polyphenolic polymers therefrom*. Biotechnol. Adv., 15: 223.
- ESPÍN J.C., WICHERS H.J., 1999 – *Activation of a latent mushroom (Agaricus bisporus) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform*. J. Agr. Food Chem., 47: 3518–3525.



- HALAOULI S., RECORD E., CASALOT L., HAMDI M., SIGOILLOT J.C., ASTHER M., LOMASCOLO A., 2006 – *Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus Pycnoporus sanguineus, and overproduction of the recombinant protein in Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 70: 580-589.
- KARAM J., NICELL J.A., 1997 – *Potential applications of enzymes in waste treatment*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 69: 141-153.
- KIRK O., BORCHERT T.V., FUGLSANG C.C., 2002 – *Industrial enzyme applications*. Curr. Opin. Biotech., 13: 345-351.
- LANTTO R., NIKU-PAAVOLA M.L., SCHONBERG C., BUCHERT J., 2002 – *A tyrosinase enzyme*. International Patent WO 02/14484A1.
- RAJU B.G.S., RAO G.H., AYYANNA C., 1993 – In: *Bioconversion of L-tyrosine to LDOPA using Aspergillus oryzae*: 106-110. Visakhapatnam India, CBS Publishers.
- SHI Y.L., JAMES A.E., BENZIE I.F.F., BUSWELL J.A., 2002 – *Mushroom-derived preparations in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to cellular DNA*. Teratog., Carcinog. Mutag., 22: 103-111.
- VAN BEILEN J.B., LI Z., 2002 – *Enzyme technology: an overview*. Curr. Opin. Biotech., 13: 388-344.

### Isolamento e caratterizzazione di un gene codificante per una acquaporina del tonoplasto in radici di zucca (*Cucurbita pepo* L.). Studi preliminari

N. DIPIERRO<sup>1</sup>, C. PACIOLLA<sup>1</sup>, S. DIPIERRO<sup>1</sup> e G. CALAMITA<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari. <sup>2</sup>Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università di Bari.

Le acquaporine vegetali fanno parte di una ampia famiglia di proteine largamente diversificata. Questa famiglia può, a sua volta, essere suddivisa in quattro sottofamiglie in relazione alle similarità delle sequenze amminoacidiche. Così come in altri organismi, anche le acquaporine vegetali hanno un importante ruolo nel facilitare i movimenti di molecole di acqua di cellula in cellula e a volte possono anche determinare il movimento di piccoli soluti neutri. La permeabilità all'acqua delle membrane delle cellule vegetali può variare anche notevolmente e dati recenti indicano che le acquaporine vegetali possono essere regolate da diversi meccanismi di controllo.

I possibili fattori che si ritiene influenzino il flusso sono: la fosforilazione, il pH, il livello di Ca<sup>2+</sup>, la pressione, la temperatura e il gradiente di soluti. La regolazione dell'attività delle acquaporine potrebbe anche rappresentare un modo per modulare la permeabilità delle membrane (CHAUMONT *et al.*, 2005). Dalla scoperta della prima acquaporina vegetale (MAUREL *et al.*, 1993) sono stati effettuati numerosi studi che le indicano come un'importante via selettiva per i movimenti dell'acqua attraverso le membrane cellulari oltre a considerarle un meccanismo attraverso il quale le piante possono regolare i flussi d'acqua in differenti condizioni fisiologiche (TYERMAN *et al.*, 1999, 2002; MAUREL *et al.*, 2002).

Con questo lavoro ci si prefigge di studiare le acqua-

porine delle membrane vegetali iniziando con l'ottenere l'intera sequenza del gene codificante per una acquaporina di zucca, sequenza che sarebbe assente in banca dati. A questo si è effettuato un multiallineamento di sequenze di acquaporine di specie affini alla zucca. Più specificamente sono state utilizzate due sequenze di *Brassica napus* L. e una sequenza di ricino presenti in banca dati. Nella regione più conservata di queste tre sequenze, contenente i motivi NPAVT ed NPA (ottenuti dopo conversione in sequenza amminoacidica) è stata disegnata una coppia di primers degeneri, in grado di amplificare un frammento di circa 500bp. Gli esperimenti di RT-PCR con i primers degeneri hanno dato un unico prodotto di amplificazione di 500bp. Questo prodotto veniva dapprima purificato per rimuovere ogni traccia di sali e primers, quindi veniva clonato in T-A Vector della promega. Con il frammento clonato si effettuava la trasformazione di cellule competenti, le quali venivano quindi messe a crescere su opportuni terreni a 37 °C. le colonie positive, venivano recuperate dalla piastra, inoculate in mezzo di coltura liquido, messe a crescere a 37 °C. Dopo crescita over night, le cellule venivano recuperate ed il DNA plasmidico estratto mediante metodica opportuna. Il plasmide purificato veniva quindi sequenziato. La sequenza ottenuta è stata poi confrontata con tutte le sequenze presenti in banca dati e, dal confronto, è emersa l'omologia con altre sequenze di acquaporine note. Peraltro la conversione della sequenza nucleotidica in sequenza amminoacidica metteva in evidenza la presenza dei motivi conservati NPAVT ed NPA presenti sulle sequenze usate per la costruzione dei primers degeneri. Per ottenere l'intera sequenza codificante l'acquaporina di zucca, si è deciso di ricorrere ad una strategia differente per ottenere l'intera sequenza dell'acquaporina di zucca. A tale scopo, avendo già la sequenza parziale (frammento da 500bp), sulla sequenza parziale sono stati costruiti due primers gene specifici e con quelli si procederà all'esecuzione di reazioni di RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) su cDNA ottenuto per retrotrascrizione a partire da RNA estratto da radici di plantule di zucca.

### LETTERATURA CITATA

- CHAUMONT F., MOSHELION M., DANIELS M.J., 2005 – *Regulation of plant aquaporin activity*. Biol. Cell, 97: 749-764.
- MAUREL C., JAVOT H., LAUVERGEAT V., GERBEAU P., TOURNAIRE C., SANTONI V., HEYES J., 2002 – *Molecular physiology of aquaporins in plants*. Int. Rev. Cytol., 215: 105-148.
- MAUREL C., REIZER J., SCHROEDER J.I., CHRISPEELS M.J., 1993 – *The vacuolar membrane protein g-TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes*. EMBO J., 12: 2241-2247.
- TYERMAN S.D., BOHNERT H.J., MAUREL C., STEUDLE E., SMITH J.A.C., 1999 – *Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations*. J. Exp. Bot., 50: 1055-1071.
- TYERMAN S.D., NIEMIETZ C.M., BRAMLEY H., 2002 – *Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles*. Plant Cell Environ., 25: 173-194.

## Attività/espressione degli enzimi del metabolismo dei fruttani nella cariosside di *Triticum durum*

E. GRECO<sup>1</sup>, A. PARADISO<sup>1</sup>, M.G. D'EGIDIO<sup>2</sup>, C. CECCHINI<sup>3</sup> e L. DE GARA<sup>1, 3</sup>. <sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari. <sup>2</sup>Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma. <sup>3</sup>Centro Interdipartimentale Ricerche Biomediche, Università Campus Biomedico (Roma).

I fruttani sono polimeri del fruttosio, presenti sia in Monocotiledoni che in Dicotiledoni, che si differenziano per il tipo di legame glicosidico tra le unità di fruttosio (tipo  $\beta$  2-1 o  $\beta$  2-6), per il grado di polimerizzazione e per la presenza/assenza di ramificazioni laterali.

Il ruolo fisiologico dei fruttani è ancora oggetto di studio: se in un primo momento sono stati interpretati come molecole di riserva associate all'amido ed al saccarosio, dati più recenti mettono in risalto il loro coinvolgimento nella resistenza ad alcuni tipi di stress come lo stress idrico e stress termico (YANG *et al.*, 2004).

L'interesse vero i fruttani non si limita al loro ruolo in pianta, ma si allarga all'ambito alimentare dal momento che sono considerati prebiotici, alimenti cioè che favoriscono lo sviluppo della flora intestinale con conseguenti benefici per l'organismo (WALZEM, 2004). Lo studio dei fruttani e del loro metabolismo assume particolare importanza in piante di interesse agro-alimentare, come il frumento, che potrebbero garantire un apporto naturale di queste molecole.

Il nostro gruppo di ricerca sta studiando il metabolismo dei fruttani nel corso della maturazione della cariosside di frumento, indagando su attività ed espressione dei principali enzimi coinvolti. I risultati finora ottenuti indicano che la cariosside accumula quantità elevate di fruttani nelle prime fasi della maturazione quando, inoltre, presentano un'alta percentuale di molecole ad alto grado di polimerizzazione. Con il procedere della maturazione della cariosside, invece, si osserva un drastico calo del pool totale di fruttani e la prevalenza di fruttani a più basso grado di polimerizzazione.

Per avere una maggior comprensione del metabolismo dei fruttani in cariosside sono stati analizzati gli enzimi che lo regolano. I dati presenti in letteratura si riferiscono ai fusti ed alle foglie della pianta di frumento, per cui non sono al momento disponibili indicazioni sulla loro presenza e regolazione in cariosside. Al fine di verificare se le cariosside sono dei semplici siti sink o se al contrario presentano una capacità autonoma di sintesi, sono stati analizzati gli enzimi responsabili della biosintesi dei fruttani.

La sintesi è promossa da diverse fructosil trasferasi, localizzate nel vacuolo, che aggiungono unità di fruttosio a specifiche molecole accettrici (saccarosio o fruttani), prelevandole da specifiche molecole dona-

trici (saccarosio o fruttani a più alto grado di polimerizzazione). L'analisi dell'attività totale di sintesi dei fruttani indica che le cariosside sono un sito source di tali molecole di fruttani anche se non si può escludere un processo di trasporto di fruttani dalle foglie e dal fusto verso la cariosside. L'attività biosintetica è molto elevata nelle fasi iniziali della maturazione, concordemente con quanto ritrovato per il contenuto dei fruttani. L'attività sembra essere massima nei punti in cui è molto alta la disponibilità di saccarosio, che potrebbe quindi essere un fattore di regolazione di questi enzimi.

I processi di idrolisi sono condotti da diversi enzimi specifici per i tipi di legame, definiti fruttano esoidrolasi ( $\beta$  2-1 e  $\beta$  2-6 FEH) che, rimuovendo l'unità terminale di fruttosio, riducono il grado di polimerizzazione dei fruttani. L'attività di questi enzimi è massima in prossimità dei punti in cui si registra un calo del contenuto in fruttani.

L'analisi dell'espressione degli enzimi coinvolti sia nella biosintesi che nell'idrolisi evidenzia che non ci sono variazioni significative durante la maturazione della cariosside. Questi risultati suggeriscono che gli enzimi che controllano i livelli di fruttani nella cariosside non sono regolati a livello di trascrizione; sembra possibile che la disponibilità dei substrati giochi un ruolo chiave nella loro regolazione.

Risulta necessario uno studio più approfondito delle componenti metaboliche che portano alla sintesi e all'accumulo di fruttani, al fine di ottimizzarne la resa e la qualità.

### LETTERATURA CITATA

- YANG J., ZHANG J., WANG Z., ZHU Q., LIU L., 2004 – *Activities of fructan and sucrose metabolizing enzymes in wheat stems subject to water stress during grain filling*. *Planta*, 220: 331-343.  
WALZEM R., 2004 – *Functional foods*. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 518.

### Variazioni dei sistemi antiossidanti indotte dall'esposizione di piante di *Lemna minor* L. ad alcune "terre rare"

M.P. IPPOLITO\*, C. FASCIANO\*, L. D'AQUINO\*\* e F. TOMMASI\*. \* Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari. \*\*ENEA, Centro di Ricerche di Portici (Napoli).

Con il termine "terre rare" si indicano gli elementi chimici compresi nella Tavola Periodica fra il lantanio ed il lutezio e l'ittrio e lo scandio. Le terre rare si trovano in natura sotto forma di minerali e la loro presenza nell'ambiente è in continuo aumento poiché sono largamente utilizzate nell'industria e nell'agricoltura. La notevole diffusione di concimi contenenti elevate quantità di terre rare in Estremo Oriente, e soprattutto in Cina, suscita crescenti preoccupazioni per la possibile contaminazione di

suolo ed acque, in quanto le conoscenze circa il destino di questi metalli e gli effetti sugli organismi viventi sono piuttosto scarse. In letteratura sono presenti numerosi dati, talvolta contraddittori, relativi ai reali effetti dei lantanidi su varie specie di piante coltivate. Alcuni autori indicano che essi promuovono la germinazione dei semi, lo sviluppo di radici e germogli, la fioritura, la produttività in campo, la tolleranza a vari tipi di stress (HU *et al.*, 2004). Altri studi riportano risultati nulli o addirittura inibitori di tali sostanze sui sistemi vegetali. Dati recenti hanno messo in evidenza che gli effetti dell'esposizione a terre rare leggere variano in base alla specie, al suo stato fisiologico, al tipo ed alla durata dei trattamenti. In particolare, quantunque fossero stati descritti risultati positivi sulla germinazione dei semi di varie *Poaceae*, il bagno di semi di grano duro (*Triticum durum* Desf.) in una soluzione contenente nitrato di lantanio o miscele di nitrati di diverse terre rare leggere non influenza la germinazione né lo sviluppo delle plantule, mentre l'esposizione prolungata dei semi in fase di germinazione causa uno stress ossidativo alle plantule, soprattutto a livello radicale, ed una marcata inibizione della crescita di coleottili e radichette (TOMMASI *et al.*, 2005). In *Phaseolus vulgaris* L. trattamenti dei semi durante le prime fasi dell'imbibizione ne promuovono la germinazione, ma tale effetto è dose dipendente, in quanto trattamenti a concentrazioni più elevate la inibiscono (TOMMASI *et al.*, 2006). Pochi dati sono disponibili sull'effetto dei lantanidi in ambienti acquatici: studi condotti su *Daphnia carinata* evidenziano una tossicità dei lantanidi dipendente dalla dose e dal tempo di esposizione (BARRY, MEEHAN, 2000). *Lemna minor* L., specie modello frequentemente utilizzata per lo studio delle contaminazioni ambientali, tollera l'esposizione ad inquinanti di vario tipo ed anche al nitrato di lantanio (IPPOLITO *et al.*, 2006). L'esposizione ad inquinanti causa frequentemente alterazioni dello stato redox cellulare e di alcuni sistemi cellulari, quali l'ascorbato e il glutatione che, con gli enzimi del loro metabolismo, costituiscono il ciclo ascorbato - glutatione, coinvolto nella rimozione di specie reattive dell'ossigeno (MITTLER, 2002). Scopo del presente lavoro è stato lo studio degli effetti dell'esposizione a varie concentrazioni di nitrato di lantanio e ad una miscela di nitrati di diverse terre rare leggere (La, Ce, Pr, Nd), in rapporti di concentrazione noti, su alcuni parametri di crescita e sul ciclo ascorbato-glutatione in *Lemna minor*. Si è voluto anche studiare se la durata del trattamento influenza la risposta della pianta. I dati ottenuti hanno evidenziato una diminuzione del contenuto di proteine totali in tutti i trattamenti, indipendentemente dalla loro durata e dalla concentrazione utilizzata. Clorosi, alterazioni morfologiche delle piantine, variazioni del peso secco e del contenuto di clorofilla, dipendono dalla concentrazione e dal tempo di esposizione. Il contenuto e lo stato redox dell'ascorbato e del glutatione mostrano lievi variazioni soprattutto in relazione alla durata del trattamento. Un significativo aumento delle attività degli enzimi coin-

volti nel ciclo ascorbato - glutatione sembra causato sia dalla concentrazione che dalla durata del trattamento. Inoltre, le alterazioni dei sistemi antiossidanti indotte dalle terre rare non sembrano influenzare positivamente le risposte di *L. minor* a stress da basse temperature.

#### LETTERATURA CITATA

- BARRY M.J., MEEHAN B.J., 2000 – *The acute and chronic toxicity of lanthanum to Daphnia carinata*. Chemosphere, 41: 1669-1674.
- HU Z., RICHTER H., SPAROVEK G., SCHNUG E., 2004 – *Physiological and biochemical effects of Rare Earth elements on plants and their agricultural significance: a Review*. J. Plant Nutrition, 27: 183-220.
- IPPOLITO MP., PACIOLLA C., L. D'AQUINO, M. MORGANA, TOMMASI F., 2007 – *Effect of rare earth elements on growth and antioxidant metabolism in Lemna minor L.* Caryologia, 60: 125-128.
- MITTLER R., 2002 - *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends Plant Sci., 7: 405-410.
- TOMMASI F., BIANCO L., PACIOLLA C., NARDI L., MORGANA M., D'AQUINO L., 2006 – *Effetto di alcune "terre rare" sulla germinazione dei semi e sulla crescita di plantule di Phaseolus vulgaris L.* Inform. Bot. Ital., 38: 182-183.
- TOMMASI F., DE PINTO M.C., NARDI L., CARBONI M., MORGANA M., D'AQUINO L., 2005 – *Effetto delle "terre rare" sul ciclo ascorbato/glutatione in plantule di Triticum durum*. Inform. Bot. Ital., 37: 1263-1264.

#### Effetti dell'irraggiamento sul sistema ascorbico-glutatione in cariossidi di *Triticum durum* Desf. cv Appio

C. PACIOLLA, B. LEONI e O. ARRIGONI.  
Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale,  
Università di Bari.

Il centro d'origine del frumento corrisponde alla zona del Medio Oriente dove, da studi effettuati su cariossidi ritrovate da scavi archeologici, ebbe inizio la coltivazione del frumento (*Triticum monococcum* e *dicoccum*) circa 10000 anni fa. Attualmente, i frumenti coltivati sono rappresentati dai frumenti duri (*T. durum*) e teneri (*T. aestivum*). Il frumento, tra i cereali, è la specie più largamente coltivata, inoltre, è il prodotto primario più consumato al mondo (ORTH, SHELLENBERGER, 1988). Quello che comunemente viene indicato come seme, in realtà è un frutto secco indeiscente denominato cariosside. La cariosside matura è formata da tre parti fondamentali: il germe o embrione (3-4%), la crusca (17%) e l'endosperma (80%) (EVERS, MILLART, 2002). L'estesa coltivazione del frumento trova spiegazione nel buon profilo nutrizionale; la cariosside, infatti, contiene un elevato contenuto di carboidrati (65-75%) principalmente sottoforma di amido, una limitata quantità di proteine (7-15%) e di lipidi (2-9%), fibre e minerali (SHEWRY *et al.*, 1995). Altre componenti importanti presenti sono i composti antiossidanti quali fenoli, carotenoidi, tocoferoli e vitamine

tra le quali l'acido ascorbico, in grado di prevenire malattie croniche e degenerative proprio grazie alla loro capacità antiossidante. Acido ascorbico e glutazione, insieme agli enzimi ascorbico perossidasi (APX; EC 1.11.1.11) monodeidroascorbico riduttasi (MDHAR; EC 1.6.5.4), deidroascorbico riduttasi (DHAR; EC 1.8.5.1) e glutazione riduttasi (GR; EC 1.6.4.2) costituiscono il sistema ascorbico-glutazione, che contribuisce a controllare lo stato redox della cellula e a convertire il perossido di idrogeno, generato dal metabolismo cellulare, in acqua a spese del NADPH (CONKLIN, BARTH, 2004; FOYER, NOCTOR, 2005). Tra le derrate di origine vegetale, il frumento rappresenta una delle matrici a più alto rischio di contaminazione e per tale motivo è necessario prevedere misure di detossificazione e decontaminazione delle granaglie attraverso dei processi chimici o fisici. Un processo fisico utilizzato è l'irraggiamento che determina inattivazione di eventuali patogeni presenti. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se l'irraggiamento di cariossidi di frumento potesse alterare le componenti biochimiche del sistema ascorbico-glutazione. Gli esperimenti sono stati condotti su farina di frumento duro (*Triticum durum*) della varietà Appio ottenuta da cariossidi irraggiate con raggi gamma di intensità di 10 KGy a temperatura ambiente per 4 ore e su farina della stessa varietà di cariossidi non sottoposte a radiazioni, come controllo. È stata fatta sia l'analisi spettrofotometrica per determinare il contenuto di ascorbico, di glutazione e l'attività degli enzimi del ciclo, sia l'analisi elettroforetica nativa per evidenziare i patterns dei diversi enzimi. L'analisi del contenuto delle forme ossidate e ridotte di ascorbico e glutazione ha evidenziato: un incremento del contenuto di ascorbico e del suo stato redox e una diminuzione significativa del livello di deidroascorbico nel campione irraggiato rispetto al controllo, mentre il pool totale dell'ascorbico è rimasto invariato; un decremento significativo del contenuto di glutazione ridotto e del pool totale di glutazione e nessun cambiamento significativo sia del contenuto di glutazione ossidato che dello stato redox di questo metabolita nel campione irraggiato rispetto al controllo. Per quanto riguarda l'attività degli enzimi del ciclo ascorbico-glutazione si è osservato: una diminuzione non significativa dell'attività specifica dell'enzima MDHAR nel campione irraggiato; una diminuzione altamente significativa dell'attività specifica della DHAR nell'irraggiato, riscontrabile anche nell'analisi elettroforetica; nessun cambiamento di attività dell'enzima GR nel campione irraggiato. Inoltre in entrambi i campioni, in accordo con precedenti studi (TOMMASI *et al.*, 1999), non è stata rilevata alcuna attività specifica o banda di attività su gel dell'enzima APX. Sebbene in letteratura sia riportato che l'irraggiamento non determina alterazioni del contenuto e delle proprietà fisico-chimiche di proteine, lipidi, carboidrati e altri nutrienti, nelle nostre condizioni sperimentali tale processo fisico ha comportato una modifica nel contenuto di alcune componenti del sistema ascorbico-glutazione.

#### LETTERATURA CITATA

- CONKLIN P.L., BARTH C., 2004 – *Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plant to ozone, pathogens, and the onset of senescence*. *Plant Cell Environ.*, 27: 959-970.
- EVERS T., MILLART S., 2002 – *Cereal grain structure and development: some implications for quality*. *J. Cereal Sci.*, 36: 261-284.
- FOYER C.H., NOCTOR G., 2005 – *Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context*. *Plant Cell Environ.*, 28: 1056-1071.
- ORTH R.H., SHELLENBERGER J.A., 1988 – *Origin, production and utilization of wheat*. *Wheat Chemistry and Technology*. In: POMERANZ Y. (Ed.), *American Association of Cereal Chemists*: 1-14. St. Paul, Minnesota.
- SHEWRY P.R., MILES M.J., TATHAM A.S., 1995 – *Plant storage proteins*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 70: 375-426.
- TOMMASI F., PACIOLLA C., ARRIGONI O., 1999 – *The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds*. *Physiol. Plant.*, 105: 193-198.

#### Contenuto di lignina ed attività perossidasi in espianti di lattuga irradiati con luce bianca, rossa e blu

G. ROTONDO, C. GADALETA, G. BORRACCINO, F. TOMMASI, L. MASTROPASQUA. Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari.

Le perossidasi sono enzimi largamente distribuiti in vari tessuti delle piante e giocano un ruolo fisiologico importante che include il catabolismo dell'auxina, i meccanismi di difesa dai patogeni, le modificazioni della parete cellulare, la lignificazione. Esistono vari tipi di perossidasi (POD) con differenti localizzazioni cellulari e caratteristiche strutturali. Fra questi, le POD extracellulari anioniche o acide e quelle cationiche o basiche, hanno un importante ruolo nei processi di lignificazione (LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2003). Tali enzimi, nella parete cellulare, catalizzano la formazione di legami covalenti tra i vari polimeri e, utilizzando come substrato l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sono responsabili della formazione dei legami difenolici fra i residui dei carboidrati e intervengono nell'accoppiamento ossidativo degli alcoli cinnamili durante la formazione della lignina. Il processo di deposizione della lignina nella parete cellulare è un processo altamente complesso e non del tutto chiarito anche se numerosi studi sono stati effettuati su tessuti e colture di cellule al fine di chiarire le diverse tappe della biosintesi e la loro regolazione (MÖLLER *et al.*, 2005). Fra i fattori che svolgono un ruolo nella regolazione del processo di biosintesi della lignina la luce ha sicuramente un ruolo fondamentale in quanto ad essa è strettamente legata la morfogenesi. Dati ottenuti *in vivo* su plantule di pisello (MASTROPASQUA *et al.*, 2005) hanno mostrato una correlazione fra qualità della luce, contenuto di lignina, contenuto e stato redox dell'ascorbico e attività delle POD. Scopo del pre-

sente lavoro è stato lo studio del ruolo della luce sulle POD e sulla lignificazione durante la xilogenesi *in vitro* in calli di midollo di *Lactuca sativa* L. var. Capitata. I calli, inizialmente del tutto privi di elementi lignificati, sono stati ottenuti da espianti di midollo di fusto fatti crescere su MS base arricchito di saccarosio, IAA 57  $\mu\text{M}$  e Kinetina 0,46  $\mu\text{M}$  per 20 giorni al buio, in luce bianca, rossa e blu. Dopo tale periodo, elementi tracheali ben differenziati e lignificati sono stati osservati in calli sviluppatasi in tutte le condizioni sperimentali utilizzate. Di questi sono stati analizzati, insieme al peso secco quale parametro di crescita, il contenuto di lignina, di clorofilla, il contenuto e lo stato redox dell'ascorbico, le attività delle POD intracellulari e di parete. La luce bianca e, in minor misura, quella rossa e blu, ha influito sulla sintesi di lignina determinandone un aumento significativo, in accordo con i dati *in vivo* (MASTROPASQUA *et al.*, 2005). Un dato inatteso, è stato invece la considerevole lignificazione dei calli cresciuti al buio che, probabilmente, hanno impiegato buona parte delle riserve di carboidrati disponibili nel mezzo di coltura nella costruzione della parete cellulare. La luce, soprattutto rossa, sembra avere effetto sulle POD intracellulari e di parete ionicamente legate. Le POD intercellulari mostrano attività meno elevata rispetto alle POD ionicamente legate e la loro attività, maggiore a luce bianca, ha un andamento simile a quello del contenuto di lignina, facendo ipotizzare che siano quelle più facilmente disponibili e utilizzabili per la formazione dei fenossiradicali. L'incremento delle POD intracellulari e ionicamente legate indotto da luce rossa, dato già riportato in studi precedenti su segmenti apicali di pisello (BORRACCINO *et al.*, 2005), suggerisce l'intervento del fitocromo durante i processi di distensione della parete cellulare, lignificazione e differenziamento. Il contenuto in AA, inteso come AA totale (AA+DHA), non sembra subire modificazioni sostanziali dipendenti dalla luce. Tuttavia variazioni dello stato redox sembrano essere regolate dalla luce bianca e blu. Questi dati preliminari inducono a ricercare ulteriormente sull'effetto che le diverse qualità di luce esplicano sulla xilogenesi e evidenziano il ruolo chiave delle POD nella lignificazione della parete cellulare. Obiettivo futuro sarà la caratterizzazione delle POD sia intercellulari che ionicamente e covalentemente legate.

#### LETTERATURA CITATA

- BORRACCINO G., BELLAPIANTA R., BIANCO L., MASTROPASQUA L., 2005 – *Effetto della qualità della luce sulla sintesi e contenuto di acido ascorbico in piantine di pisello (Pisum sativum L. cv. 'Mezza Rama')*. Inform. Bot. Ital., 37: 630-631.
- LOPEZ-SERRANO M., FERNÁNDEZ M.D., POMAR F., PEDREÑO M.A., ROS BARCELÒ A., 2003 – *Zinnia elegans uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels*. J. Exp. Bot., 55: 423-431.
- MASTROPASQUA L., MARZANO G., BIANCO L., BORRACCINO G., 2005 – *Correlazione tra acido ascorbico e lignina: effetto della qualità della luce sulla sintesi di lignina in piantine di pisello (Pisum sativum L. cv. 'Mezza Rama')*. Inform. Bot. Ital., 37: 654-655.
- MÖLLER R., BALL R.D., HENDERSON A.R., MODZEL G., FIND J., 2005 – *Effect of light and activated charcoal on tracheary element differentiation in callus cultures of Pinus radiata D. Don*. Plant Cell, Tissue Organ Cult., 85: 161-171.

#### Induzione di anossia in colture cellulari di *Arabidopsis thaliana* coltivate in bioreattore

A. PARADISO<sup>1</sup>, S. CARETTO<sup>2</sup>, A. LEONE<sup>2</sup>, R. NISI<sup>2</sup> e L. DE GARA<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari. <sup>2</sup>CNR-ISPRA, Lecce.

Lo stato delle piante o delle cellule in relazione alla concentrazione di ossigeno può essere definito come normossico, ipossico e anossico. Per sopravvivere in condizioni di povertà o carenza di ossigeno le piante hanno perfezionato dei meccanismi adattativi che prevedono cambiamenti sia a livello anatomico che a livello genetico e metabolico. Dati di letteratura evidenziano come non solo l'induzione dell'anossia ma anche il successivo ripristino della normossia possa rappresentare un fattore di stress per la pianta (BIEMELT *et al.*, 1998). In questo lavoro, gli effetti dell'anossia e del ripristino della normossia sono stati studiati in colture cellulari di *Arabidopsis thaliana*, cresciute in bioreattore (BioFlo 110, New Brunswick).

Nel corso dell'anossia (5 ore) e del ripristino della normossia sono state prelevate delle aliquote della coltura cellulare per analizzare la vitalità cellulare, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di ossido nitrico (NO) e la risposta dei sistemi antiossidanti.

L'osservazione delle cellule al microscopio confocale, con l'utilizzazione di specifici fluorofori (dihydrohodamine 123 e DAF-2DA), ha evidenziato una notevole produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e di NO a livello intracellulare, con un picco massimo a tempi brevi dall'induzione dell'anossia.

I livelli di queste molecole rimangono alti anche nel corso del ripristino della normossia sebbene presentino una progressiva diminuzione fino a raggiungere i valori presenti prima dell'induzione dell'anossia nell'arco delle 24 ore.

La produzione e l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotto dall'anossia sembra essere dovuto, almeno in parte, alla riduzione della capacità di eliminazione delle ROS. L'analisi dei sistemi antiossidanti, infatti, mostra un forte calo dell'ascorbato, del glutatione e degli enzimi deputati alla rimozione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al contrario degli antiossidanti citosolici, il tocoferolo, fondamentale antiossidante della frazione lipofila, aumenta significativamente nel corso dell'anossia.

Con il ripristino della normossia le attività degli enzimi di rimozione delle ROS tornano a valori simili ai controlli (tempo 0) e in alcuni casi superiori.

La capacità delle cellule di ripristinare rapidamente il proprio stato redox suggerisce che *Arabidopsis thaliana* abbia un buon livello di resistenza a questo tipo di stress.

## LETTERATURA CITATA

BIEMELT S., KEETMAN U., ALBRECHT G., 1998 – *Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings*. *Plant Physiol.*, 116(2): 651-658.

### Effetto dello shock termico a due diverse temperature sull'equilibrio redox di cellule di tabacco BY-2

C. GADALETA<sup>1</sup>, V. LOCATO<sup>1</sup>, L. DE GARA<sup>1,2</sup> e M.C. DE PINTO<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari. <sup>2</sup>Interdisciplinary Center for Biomedical Research (CIR), Università Campus Biomedico.

Gli stress termici sono la principale causa della diminuzione di produttività delle piante. L'assenza di meccanismi di regolazione della temperatura e la dipendenza delle piante dall'energia luminosa facilita l'aumento di temperatura all'interno delle cellule vegetali. Per sopravvivere allo stress termico le piante devono quindi attivare appropriati meccanismi di difesa in modo da evitare danni al metabolismo cellulare. Una delle conseguenze dello shock termico è l'aumento di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le ROS sono note per la loro tossicità ma negli ultimi anni è stato sottolineato anche il loro ruolo come molecole segnale (MITTLER, 2002). I cambiamenti nella produzione di ROS possono attivare delle risposte contrastanti: un aumento o una diminuzione nei sistemi di eliminazione di ROS, che rispettivamente garantiscono la sopravvivenza delle cellule o ne inducono la morte (MITTLER *et al.*, 2004).

Scopo di questo lavoro è stato studiare l'effetto dello shock termico (HS) a due diverse temperature su colture cellulari di tabacco BY-2. Le cellule che normalmente crescono a 27 °C sono state esposte per 10 minuti a 35 °C o a 55 °C e successivamente riportate alla loro normale temperatura di crescita. L'esposizione delle cellule a 35 °C non ne altera la vitalità cellulare mentre lo shock termico a 55 °C determina morte cellulare con caratteristiche tipiche dell'apoptosi (VACCA *et al.*, 2004). In entrambi le condizioni di shock termico vi è un aumento di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ma con un comportamento diverso: nell'HS a 35 °C si verifica nelle prime ore dopo l'esposizione solo un leggero e transiente aumento di questa ROS, mentre l'HS a 55 °C ne determina un incremento maggiore e con un andamento bifasico. Il primo picco di produzione è riscontrabile sin dalle prime ore dopo l'HS mentre il secondo, più intenso rispetto al primo, appare solo dopo 24 ore. Inoltre solo l'HS a 55 °C determina danni a livello cellulare in quanto crea un aumento di perossidazione lipidica e di ossidazione delle proteine, marker tipici di stress ossidativo. Poiché è noto che lo stato redox cellulare è determinato dal bilancio tra sistemi che producono ROS e quelli coinvolti nella loro eliminazio-

ne (MITTLER *et al.*, 2004) abbiamo analizzato l'attività antiossidante totale (TAA) nelle frazioni idro e liposolubili di cellule controllo e cellule esposte a HS. La TAA delle cellule BY2 è dominata dall'attività antiossidante idrofila (HAA) con una più piccola componente di attività antiossidante lipofila (LAA). Nelle cellule sottoposte a 35 °C la LAA è paragonabile al controllo mentre aumenta moderatamente l'HAA. Al contrario le cellule sottoposte a HS a 55 °C presentano un calo di LAA e HAA già nelle prime ore dopo il trattamento che diventa più marcato dopo 24 h dall'induzione dell'HS.

Tra gli antiossidanti idrofili sono state analizzate le variazioni dei due maggiori antiossidanti cellulari: ascorbato e glutatione. Nelle cellule esposte a 35 °C il contenuto totale di ascorbato non cambia rispetto al controllo mentre è evidente un aumento del contenuto di glutatione. L'esposizione delle cellule a 55 °C determina, invece, una diminuzione nel contenuto di ascorbato e glutatione totale. Anche il comportamento dei due enzimi di rimozione del perossido di idrogeno, ascorbato perossidasi (APX) e catalasi (CAT) è diverso in risposta ai due tipi di HS. Infatti l'esposizione a 35 °C induce un aumento di APX e CAT particolarmente evidente nelle prime ore dopo l'induzione dell'HS. L'esposizione a 55 °C determina invece un aumento transiente di CAT nelle prime ore di trattamento, in corrispondenza del primo picco di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al contrario l'APX mostra un forte ed immediato calo di attività già evidente subito dopo l'esposizione a 55 °C.

In conclusione, i due HS inducono risposte completamente differenti: l'esposizione a 35 °C determina un potenziamento dei sistemi antiossidanti che permette alle cellule di eliminare le ROS prodotte e di sopravvivere; l'esposizione a 55 °C inibisce i sistemi antiossidanti e determina un'amplificazione del segnale delle ROS, che induce danni ossidativi alle cellule e l'attivazione di un processo di morte cellulare programmata.

## LETTERATURA CITATA

- MITTLER R., 2002 – *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410.  
 MITTLER R., VANDERAUWERA S., GOLLERY M., VAN BREUSEGEM F., 2004 – *Reactive oxygen gene network of plants*. *Trends Plant Sci.*, 9: 490-498.  
 VACCA R.A., DE PINTO M.C., VALENTI D., PASSARELLA S., MARRA E., DE GARA L., 2004 – *Production of Reactive Oxygen Species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells*. *Plant Physiol.*, 134: 1100-1112.

### Alterazione delle dinamiche stomatiche in *Nicotiana tabacum* che sovraesprime il gene per ascorbico ossidasi

G.A. GIUSTINO e M.C. DE TULLIO. Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari.

Le piante hanno evoluto un complesso meccanismo di percezione degli stimoli esterni che inducono adeguate risposte molecolari allo scopo di adattarsi in tempo reale all'ambiente circostante. Il controllo delle dinamiche stomatiche costituisce una delle risposte più immediate alle variazioni di condizioni ambientali. Finora ABA, perossido di idrogeno e monossido di azoto sono stati identificati come molecole segnale che intervengono nella regolazione delle dinamiche stomatiche (BRIGHT *et al.*, 2006), ma vi sono anche indicazioni di un controllo esercitato attraverso il sistema dell'acido ascorbico (AA). Piante di tabacco che sovraesprimono il gene codificante per deidroascorbico (DHA) riduttasi presentano stomi più aperti e maggiore traspirazione, mentre piante antisenso per lo stesso gene hanno stomi più chiusi e minor dispersione di acqua (CHEN, GALLIE, 2004). Allo scopo di verificare se vi sia un rapporto tra lo stato redox dell'apoplasto e la regolazione dei movimenti stomatici, sono state analizzate piante di *Nicotiana tabacum* trasformate con il gene di *Cucumis sativus* che codifica per l'enzima ascorbico ossidasi (AAO) sotto il controllo del promotore costitutivo 35S. Tali piante presentano un netto sbilanciamento verso una condizione ossidata nello stato redox dell'apoplasto (SANMARTIN *et al.*, 2003). Piante di diverse linee che sovraesprimono AAO, pur non presentando variazioni nel numero di stomi per unità di superficie, differiscono dai controlli per una minore traspirazione stomatica ed un maggiore contenuto relativo di acqua. Perossido di idrogeno 100  $\mu\text{M}$ , concentrazione pienamente efficace per la chiusura degli stomi in *strips* di epidermide delle piante non trasformate, risulta insufficiente per ottenere la chiusura degli stomi nelle linee transgeniche. I nostri dati suggeriscono la possibilità di una interazione tra DHA e  $\text{H}_2\text{O}_2$  che porterebbe alla regolazione dei movimenti stomatici in risposta a stimoli ambientali o endogeni in grado di modificare lo stato redox dell'apoplasto.

#### LETTERATURA CITATA

- BRIGHT J., DESIKAN R., HANCOCK J.T., WEIR I.S., NEILL S.J., 2006 – *ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on  $\text{H}_2\text{O}_2$  synthesis*. Plant J., 45: 113-122.
- CHEN Z., GALLIE D.R., 2004 – *The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement*. Plant Cell, 16: 1143-1162.
- SANMARTIN M., DROGOUDI P.A., LYONS T., PATERAKI I., BARNES J., KANELIS A.K., 2003 – *Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone*. Planta, 216: 918-928.

#### Rapporti tra anatomia del fusto di *Arundo donax* e proprietà sonore delle ance da oboe

P. GRAZZI<sup>1</sup> e M.C. DE TULLIO<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Conservatorio di Musica "Dall'Abaco", Verona. <sup>2</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari.

L'ancia è una sottile linguetta mobile la cui vibrazione fa suonare gli strumenti detti appunto ad ancia. Variamente accoppiata ad un sistema di cavità risonanti e messa in vibrazione da un flusso d'aria, l'ancia pone in vibrazione tutto il sistema e vi instaura un sistema di onde stazionarie all'origine dell'emissione sonora. Le ance battenti doppie (famiglia degli oboi) sono costruite contrapponendo due linguette sottili in modo che combacino perfettamente in chiusura per ottenere una vibrazione indotta dalla pressione e depressione provocata dal ripetuto battere tra loro delle due ance. Solitamente le ance sono ricavate da porzioni del fusto di *Arundo donax* L., una specie diffusa in Puglia ed in molte altre regioni d'Italia (CONTI *et al.*, 2005). La qualità delle ance è spesso un grande problema per gli strumentisti. Le difficoltà sono ancor maggiori per oboisti e fagottisti, data la mancanza di produzioni industriali standardizzate di ance doppie (a differenza di quanto avviene per le ance singole di clarinetti e sassofoni). Alcuni studi suggeriscono una possibile relazione tra la struttura anatomica dei fusti di *A. donax* e la qualità del suono (OBATAYA, NORIMOTO, 1999; GLAVE *et al.*, 1999). Nell'ambito di una indagine preliminare per identificare criteri per una valutazione qualitativa *a priori*, abbiamo analizzato mediante microscopia in fluorescenza e confocale alcuni campioni di canna di diversa provenienza, caratterizzati da differenti proprietà acustiche. I risultati fin qui ottenuti mostrano una correlazione tra qualità del suono (timbro scuro) e presenza di un maggior numero di cellule parenchimatice, mentre ance di qualità più scadente per durata e timbro presentano numerose fibre e cellule con pareti molto ispessite e lignificate. Sono attualmente in corso ulteriori indagini su un numero maggiore di campioni allo scopo di verificare tale correlazione.

#### LETTERATURA CITATA

- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C., 2005 – *An annotated checklist of Italian Vascular Flora*. Palombi Editori, Roma.
- GLAVE S., PALLON J., BORNMAN C., BJÖRN L., WALLÉN R., RÅSTAM J., KRISTIANSSON P., ELMAN M., MALMQVIST K., 1999 – *Quality indicators for woodwind reed material*. Nucl. Instr. Meth. B, 150: 673-678.
- OBATAYA E., NORIMOTO J., 1999 – *Acoustic properties of a reed (Arundo donax L.) used for the vibrating plate of a clarinet*. J. Acoust. Soc. Am., 106: 1106-1110.

#### Produzione di bioetanolo dai residui derivati dalla preparazione di matrici biologiche da bacche di pomodoro

M. DURANTE, M. LENUCCI, A. CACCIOPPOLA, e G. DALESSANDRO. Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

Il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) è la più importante coltura orticola in termini di produzione e commercio a livello mondiale. La sua coltivazione si estende su circa 3,6 milioni di ettari distribuiti su tutti i continenti, con una produzione annua di 100

milioni di tonnellate, pari al 18% della produzione orticola mondiale. La coltivazione del pomodoro in Italia ha un'estensione totale di circa 130000 ettari, di questi, 107000 sono coltivati come pomodoro da industria. Più del 42% della produzione di pomodoro da destinare alla trasformazione industriale si concentra in tre regioni (Emilia Romagna, Campania e Puglia) (POLLEDRI *et al.*, 2007). Annualmente, dal *processing* delle bacche di pomodoro, si ottengono enormi quantità di materiale eliminato come scarti della lavorazione. Questi scarti rappresentano un'importante biomassa con diverse alternative di utilizzo. La biomassa vegetale è stata riconosciuta come la maggiore fonte mondiale di energia rinnovabile per sopperire alla sempre minore disponibilità di risorse fossili utilizzate come carburanti (JEFFERSON, 2006). Il suo utilizzo in bio-processi risolverebbe, in parte, il problema dello smaltimento dei rifiuti e contribuirebbe ad uno sviluppo sostenibile (LIN, TANAKA, 2006).

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di ottenere bioetanolo utilizzando la componente polisaccaridica presente nei residui ottenuti durante il processo di trasformazione di bacche di pomodoro in una matrice biologica disidratata (liofilizzata) idonea all'estrazione del licopene con CO<sub>2</sub> supercritica. Durante questo processo, si ottengono due tipologie di scarti rappresentati dal *tomato pomace* e dalla matrice esausta. Il *tomato pomace* è costituito essenzialmente da bucce e semi ed è ottenuto per omogeneizzazione e setacciatura delle bacche di pomodoro. La matrice esausta rappresenta il materiale che rimane dopo estrazione del licopene dalla matrice liofilizzata ed è costituita da aggregati (>500 µm) di cellule parenchimatiche delipidate e parzialmente deproteinate. La saccharificazione dei polisaccaridi presenti nel *tomato pomace* e nella matrice esausta è stata condotta enzimaticamente utilizzando una miscela di endo- ed eso-glicosidasi (Driselasi) in grado di idrolizzare indistintamente tutti i polisaccaridi di parete (FRY, 2000). Al fine di stabilire una strategia sperimentale utile a rendere il processo di idrolisi enzimatica più economico e rapido, sono state testate concentrazioni crescenti di Driselasi (0,01%-1%). Nell'ambito delle concentrazioni testate, la concentrazione di Driselasi 0,1% è risultata quella ottimale. Tre idrolisi sequenziali con Driselasi allo 0,1% (24 ore, 37°C) hanno idrolizzato il 44% del contenuto totale dei polisaccaridi presenti nel *tomato pomace*, e il 30% nella matrice esausta. L'analisi qualitativa e quantitativa degli idrolizzati, effettuata mediante HPAEC-PAD (*High pH Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector*), ha evidenziato che glucosio e fruttosio sono i monosaccaridi più abbondanti, entrambi fermentabili in bioetanolo. Il fruttosio e una piccola percentuale di glucosio hanno verosimilmente un'origine vacuolare. Gli altri zuccheri presenti (ramnosio, arabinosio, galattosio, mannosio, xilosio, isoprimeverosio, xilobiosio, cellobiosio, acido galatturonico e acido glucuronico) e la maggior parte del glucosio derivano dall'idrolisi dei polisaccaridi di parete. Per la fermentazione degli zuccheri sono state

utilizzate cellule di *Saccharomyces cerevisiae* (Cispa 161) incapsulate in una matrice di alginato di sodio (ZAYED, 1997).

Nel caso dei substrati ottenuti dall'idrolisi con Driselasi del *tomato pomace*, le fermentazioni sono state condotte con concentrazioni di glucosio e fruttosio pari a 5,2 g/L (substrato A), 15,5 g/L (substrato B), 28,6 g/L (substrato C) e 57,0 g/L (substrato D) con lo scopo di ottenere la loro conversione in bioetanolo. La fermentazione completa di glucosio e fruttosio si ha dopo 12 ore utilizzando il substrato A, 24 ore utilizzando i substrati B e C, e 132 ore utilizzando il substrato D. Il ceppo di lievito CISPA 161 vive e si riproduce negli idrolizzati con Driselasi senza l'aggiunta di nessun altro fattore di crescita. Le rese di bioetanolo ottenute sono del 41% utilizzando il substrato A e maggiori del 56% utilizzando i substrati B, C e D. La resa più bassa nel substrato A potrebbe essere dovuta alla bassa concentrazione degli zuccheri fermentabili, con conseguente bassa concentrazione dei nutrienti necessari per la crescita delle cellule di lievito.

Nel caso dei substrati ottenuti dall'idrolisi con Driselasi della matrice esausta, le fermentazioni sono state condotte con concentrazioni pari a 16 g/L (substrato E), 28,0 g/L (substrato F) e 52,8 g/L (substrato G). Il consumo totale degli zuccheri fermentabili si è avuto solo nei substrati E ed F rispettivamente dopo 9 e 12 ore di fermentazione, con rese di bioetanolo pari a ~45%. Dal confronto del substrato G (52,8 g/L), ottenuto dalla matrice esausta, col substrato D (57,0 g/L), ottenuto dal *tomato pomace*, si è notato che, nonostante il contenuto totale di glucosio e fruttosio sia più o meno simile, si è avuto solo un leggero consumo degli zuccheri (~38%) nel substrato G per un tempo di fermentazione pari a ~100 ore. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la matrice presenta una maggiore concentrazione di inibitori metabolici (furfurale e idrossifurfurale), rilasciati dall'idrolisi dei polisaccaridi, che possono interferire con la fermentazione (WEIL *et al.*, 2002). Un altro motivo potrebbe essere l'assenza nella matrice esausta dei nutrienti necessari per la crescita delle cellule di lievito che potrebbero essere stati coestratti con il licopene.

I dati ottenuti evidenziano la potenzialità di utilizzo del *tomato pomace* e della matrice esausta per la produzione di bioetanolo. Tale tematica è di grande rilevanza e attualità in quanto potrebbe contribuire sia al soddisfacimento del fabbisogno energetico nazionale sia al razionale utilizzo delle biomasse.

#### LETTERATURA CITATA

- FRY S.C., 2000 – *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. The Blackburn Press, Caldwell, New Jersey.
- JEFFERSON M., 2006 – *Sustainable energy development: performance and prospects*. *Renew Energy*, 31: 571-582.
- LIN Y., TANAKA S., 2006 – *Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 627-642.
- POLLEDRI M., PIROVANO E., DIVINA S., GABANA A.,



- FRANCO P., GALLI D., LEONI G., STIFFONI P., DAVICO M., 2007 – <http://www.senato.it/japp/bgt/showdoc/showText?tipodoc=SinDisp&leg=15&id=253500>.
- WEIL J.R., DIEN B., BOTHAST R., HENDRICKSON R., MOSIER N.S., LADISCH M.R., 2002 – *Removal of fermentation inhibitors formed during pretreatment of biomass by polymeric adsorbents*. *Industr. Engin. Chem. Res.*, 41: 6132-6138.
- ZAYED G., 1997 – *Production of alcohol from sugar beet molasses without heat or filter sterilization*. *J. Industr. Biotechnol.*, 19: 39-42.

Questo lavoro è stato finanziato con fondi MIUR 7885/55 PAR 2001.

### Stabilità del licopene nel *processing* di bacche di pomodoro e nella conservazione di prodotti del pomodoro

A. CACCIOPPOLA, M. DURANTE, L. SERRONE, M. LENUCCI e G. DALESSANDRO. Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

Nel corso degli anni le finalità di produzione delle derrate alimentari sono profondamente cambiate, passando dalla necessità di ottimizzare la produzione in funzione dell'aspetto quantitativo, a quella di migliorare l'aspetto qualitativo degli alimenti. In questa ottica, la ricerca scientifica è stata rivolta ad analizzare le proprietà nutrizionali e salutari degli alimenti e dei prodotti che da essi derivano. In particolare, grande attenzione si sta rivolgendo a quegli alimenti ricchi in molecole bioattive in grado di prevenire patologie come tumori e malattie cardiovascolari (CANENE-ADAMS *et al.*, 2005). Il pomodoro e i suoi derivati sono un esempio di *Functional food* per il loro elevato contenuto di carotenoidi, potenti antiossidanti, tra i quali un ruolo rilevante è svolto dal licopene. Questa molecola presenta nella sua struttura numerosi doppi legami che conferiscono caratteristiche di sensibilità alla luce, alle alte temperature e all'ossigeno (NGUYEN, SCHWARTZ, 1999). In questo lavoro è stata monitorata la stabilità del licopene nel pomodoro durante il periodo di post-raccolta, nel *processing*, nei prodotti trasformati (passata, concentrato, succo e pelati) e in una matrice liofilizzata idonea per l'estrazione di licopene con CO<sub>2</sub> supercritica. L'ottica è stata quella di ottimizzare le condizioni di conservazione e *processing* del pomodoro con riferimento al contenuto di licopene. Le analisi sono state condotte su cv ad alto contenuto di licopene (Hly 12, Hly 15, Hly 18, Dracula e Brigade) e cv tradizionali (Perfectpeel e Incas). Il *time course* del contenuto di licopene effettuato nelle bacche di pomodoro durante un periodo di post-raccolta di 10 giorni (2-4-6-8-10 giorni) ha evidenziato che le cv a più alto contenuto di licopene subiscono una degradazione della molecola più rapida rispetto alle cv tradizionali. A 10 giorni dalla raccolta, nella cv Hly 12 vi è una degradazione di licopene pari al 55% (valore iniziale 178,6 mg/kg peso fresco); le bacche

mostrano, inoltre, una evidente perdita in pigmentazione. Nella cv da industria Incas il contenuto di licopene passa da un valore di 87,1 alla raccolta a quello di 59,6 mg/kg peso fresco a 10 giorni, con un decremento del 31%. Queste analisi dimostrano che, per preservare l'integrità del licopene, le bacche di pomodoro devono essere processate in tempi rapidi. Le prime fasi del *processing* del pomodoro prevedono quasi sempre che le bacche vengano sottoposte a trattamenti ad alte temperature. Sono state pertanto valutate le variazioni nel contenuto di licopene in seguito all'esposizione alla temperatura di 70°C per tempi diversi. Dopo 5 min di trattamento, la quantità di licopene diminuisce di circa il 10%, e del 25% e del 35%, dopo 10 e 20 minuti rispettivamente. Il contenuto rimane costante da 20 a 60 minuti. Pertanto, il passaggio che implica l'uso di alte temperature nella prima fase del *processing* del pomodoro deve essere ridotto a tempi molto brevi. Le analisi sui prodotti ottenuti dal pomodoro (succo, pelati, passata e concentrato) hanno evidenziato che il contenuto di licopene non varia anche dopo più di un anno di conservazione.

Negli ultimi anni è aumentata la tendenza a produrre matrici biologiche di pomodoro liofilizzate. Queste matrici trovano un loro utilizzo nella preparazione di condimenti per pizza, carni e verdure. Il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto una metodica di preparazione di una matrice liofilizzata di pomodoro idonea per l'estrazione del licopene con CO<sub>2</sub> supercritica. Test sulla stabilità del licopene hanno evidenziato che la conservazione della matrice al buio, in atmosfera di azoto e a -20°C assicura la possibilità di mantenere stabile il contenuto di licopene per oltre 6 mesi. La stabilità del licopene nella matrice liofilizzata di pomodoro rende possibile la realizzazione di un ciclo continuo di estrazione di licopene con CO<sub>2</sub> supercritica.

#### LETTERATURA CITATA

- CANENE-ADAMS K., CAMPBELL J.K., ZARIPHEH S., JEFFERY E.H., ERDMAN, 2005 – *The tomato as a functional food*. *J. Food Nutr.*, 135: 1226-1230.
- NGUYEN M.L., SCHWARTZ S.J., 1999 – *Lycopene: chemical and biological properties*. *Food Technol.*, 53: 38-53.

Questo lavoro è stato finanziato con fondi MIUR 7885/55 PAR 2001.

### Specie italiane del genere *Gracilaria* (*Rhodophyta*, *Gracilariales*) potenzialmente sfruttabili

A. BOTTALICO e C.I. DELLE FOGLIE. Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari.

Le specie del genere *Gracilaria* Greville sono state ampiamente studiate dal punto di vista tassonomico, ecologico e applicativo, a causa dell'estesa distribuzione geografica e dell'importanza economica che rivestono come agarofite (TSENG, 2001). Nell'ultimo decennio una serie di studi ha anche dimostrato i

potenziali effetti benefici di colture intensive di alcune specie di *Gracilaria* come biofiltri nel trattamento di effluenti di tipo domestico o di impianti di acquacoltura (SCHRAMM, 1999; MARINHO-SORIANO *et al.*, 2002; FEI, 2004; YANG *et al.*, 2006).

In questa sperimentazione, alcune specie di *Gracilaria* dei mari italiani sono state sottoposte a test preliminari di coltivabilità, che costituiscono la necessaria base di partenza per allestire colture intensive.

Per le prove di coltura *in vitro* in condizioni controllate sono state utilizzate specie ad ampia diffusione: *Gracilaria bursa-pastoris* (S.G. Gmelin) P.C. Silva, *G. armata* (C. Agardh) Greville e *G. longa* Gargiulo, De Masi & Tripodi. Talli di *G. bursa-pastoris* e *G. armata* sono stati raccolti da noi in località Grotta della Regina (Torre a Mare, Bari). *G. bursa-pastoris* e *G. longa* sono state raccolte nel Mar Piccolo di Taranto, nel quale formano popolazioni pleustofitiche, e inviateci dall'IAMC (C.N.R.); talli di *G. longa* sono stati raccolti nel Lago Faro e inviati dal Dipartimento di Scienze Botaniche dell'Università di Messina. Abbiamo coltivato espianti apicali e basali del tallo delle suddette specie, sulla cui crescita è stato valutato l'effetto di varie fonti di azoto e di diversi valori di irradianza. Per tutte le specie testate, il maggior tasso di crescita è stato rilevato in mezzo arricchito con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Per quanto riguarda l'irradianza, i risultati sono stati conformi al naturale adattamento fisiologico: i talli provenienti da habitat più superficiali hanno mostrato un tasso di crescita più elevato a più alta irradianza; quelli adattati a maggiore profondità presentavano un buon tasso di crescita anche a valori più bassi di irradianza, come nel caso di *G. bursa-pastoris* di Taranto. Questo ceppo pleustofitico meglio degli altri si è adattato alle condizioni imposte dalla coltura *in vitro*, che costringe comunque ad una crescita indipendente da un substrato. Con questo ceppo si è ottenuto il maggiore tasso di crescita, ed è stato pertanto utilizzato per l'allestimento di preliminari colture intensive in vasche da 50 L, dotate di un sistema di aerazione-agitazione, sistemate in condizioni naturali di temperatura, irradianza e fotoperiodo, nelle quali pH ed ossigeno disciolto sono stati monitorati periodicamente. L'inoculo, rappresentato da espianti apicali di tallo, è stato sottoposto a trattamenti preventivi per garantire la coltura unialgale. L'effetto combinato di fonti di azoto e di fosfato sulla crescita e sul contenuto di pigmenti è stato valutato in due differenti periodi dell'anno. Il più elevato incremento in biomassa ed il maggiore contenuto in pigmenti sono stati ottenuti con una fonte di azoto mista (in forma ridotta ed ossidata), senza differenze significative nei due periodi. La massima crescita specifica da noi rilevata risulta essere lievemente inferiore di quella riportata in letteratura per altre specie dello stesso genere coltivate in condizioni similari.

Le biomasse così prodotte, commercialmente sfruttabili, possono essere contemporaneamente utilizzate per la biodepurazione di acque eutrofiche e per l'abbattimento di  $\text{CO}_2$  (ARESTA *et al.*, 2003).

#### LETTERATURA CITATA

- ARESTA M., DIBENEDETTO A., TOMMASI I., CECERE E., NARRACCI M., PETROCELLI A., PERRONE C., 2003 – *The use of marine macroalgae as renewable energy source for reducing CO<sub>2</sub> emissions*. In: GALE J., KAYA E. (Eds.), *Greenhouse Gas Control Techn.*: 1497-1502.
- FEI X.G., 2004 – *Solving the coastal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation*. *Hydrobiologia*, 512: 145-151.
- MARINHO-SORIANO E., MORALES C., MOREIRA W.S.C., 2002 – *Cultivation of Gracilaria (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil*. *Aquacult. Res.*, 33: 1081-1086.
- SCHRAMM W., 1999 – *Factors influencing seaweed responses to eutrophication: some results from EU-project EUMAC*. *J. Appl. Phycol.*, 11: 69-78.
- TSENG C.K., 2001 – *Algal biotechnology industries and research activities in China*. *J. Appl. Phycol.*, 13: 375-380.
- YANG Y.F., FEI X.G., SONG J.M., HU H.Y., WANG G.C., CHUNG I.K., 2006 – *Growth of Gracilaria lemaneiformis under different cultivation conditions and its effects on nutrient removal in Chinese coastal waters*. *Aquaculture*, 254: 248-255.

#### Analisi floristica del territorio comunale di Palagianello (Taranto) compreso nel Parco naturale regionale "Terra delle gravine". Dati preliminari

F. CARRUGGIO<sup>1</sup>, F. MANTINO<sup>2</sup>, F.S. D'AMICO<sup>3</sup> e L. FORTE<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Dipartimento DACPA, Università di Catania. <sup>2</sup>Dipartimento DiSACD, Università di Foggia. <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali - Museo Orto Botanico, Università di Bari.

Si presentano qui i primi risultati di un'indagine floristica avviata in provincia di Taranto, nella porzione del territorio comunale di Palagianello inclusa nel Parco naturale regionale "Terra delle gravine".

Quest'area, estesa per 481 ha e compresa tra 60 e 240 m s.m., è interessata dalle estreme propaggini della Murgia tarantina e solcata dalle gravine di Palagianello e di Castellaneta. Il substrato geologico affiorante nel territorio in esame è caratterizzato principalmente da banchi di Calcarea di Altamura e in misura minore da Calcareniti di Gravina; quello pedologico è costituito da suoli rossi mediterranei e risulta generalmente di scarsa potenza e con un profilo decapitato. Il fitoclima è mediterraneo di tipo oceanico a piogge stagionali, ricadente nell'orizzonte inferiore della fascia mesomediterranea e nell'orizzonte superiore dell'ombrotipo secco. Le principali tipologie vegetazionali presenti sono costituite da praterie termo-xerofile terofitiche e steppiche perenni; gariga camefitica e nanofanerofitica; macchia mediterranea termofila; boschi a *Quercus ilex* L. o a *Pinus halepensis* Mill.; vegetazione casmofitica. A queste tipologie si affiancano quelle degli incolti, dei coltivi e dei margini stradali.

I campioni raccolti durante le erborizzazioni sono stati determinati mediante l'ausilio delle chiavi anali-

tiche di differenti Flore (FIORI, 1923-1929; TUTIN *et al.*, 1964-1980; PIGNATTI, 1982; TALAVERA *et al.*, 1999; CASTROVIEJO *et al.*, 2006) o, in alcuni casi, di lavori monografici tra cui PIGNATTI (1969), GRÜNANGER (2001) e BRULLO *et al.* (2001). Gli *exsiccata* sono stati depositati presso l'erbario del Museo Orto Botanico dell'Università di Bari (BI). Per la nomenclatura delle specie si è fatto riferimento a CONTI *et al.* (2005) mentre per le forme biologiche ed i corotipi principalmente a PIGNATTI (1982). L'analisi è stata completata con la realizzazione degli spettri biologico e corologico generali e di quelli relativi ai diversi ambienti riscontrati.

Le specie finora censite sono 376, appartenenti a 252 generi e 62 famiglie, con una densità di 78 specie/km<sup>2</sup>. Il contingente endemico è costituito da 9 *taxa*. Tra le entità rinvenute alcune meritano una menzione particolare: *Viola hymettia* Boiss. & Heldr., perché specie nuova per la Puglia; *Fumana scoparia* Pomel, per essere specie nuova per l'Arco Jonico, anticamente segnalata in Puglia solo per il Gargano (BALDINI, 1999) e non ritrovata da lungo tempo (CONTI *et al.*, 2005; SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005); *Helictotrichon convolutum* (C. Presl) Henrard, perché specie anfiadriatica di recente segnalazione in Puglia (CONTI, DI PIETRO, 2004), il cui ritrovamento costituisce un nuovo dato distributivo; *Convolvulus pentapetaloides* L., perché specie rara a livello regionale. Inoltre, l'elenco floristico comprende:

- specie incluse nelle *Red List* (CONTI *et al.*, 1997; SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005), tra cui *Arum apulum* (Carano) P.C. Boyce, *Ophrys tarentina* Gözl & H.R. Reinhard, *Triticum biunciale* (Vis.) K. Richter, *Allium moschatum* L. e *Campanula versicolor* Andrews;

- specie di importanza fitogeografica, come *Asyneuma limonifolium* (L.) Janch. subsp. *limonifolium*, *Phagnalon rupestre* (L.) DC. subsp. *illyricum* (H. Lindb.) Ginzb., *Crocus thomasi* Ten., *Iris pseudopumila* Tineo, *Phlomis fruticosa* L., *Scrophularia lucida* L., ed in particolare endemite quali *Thymus spinulosus* Ten., *Stipa austroitalica* Martinovsky subsp. *austroitalica*, *Crepis brulla* Greuter e *Leontodon apulus* (Fiori) Brullo.

#### LETTERATURA CITATA

- BALDINI R.M., 1999 – *Fumana scoparia* Pomel (Cistaceae): *considerations on a poorly known species for the Italian flora*. *Webbia*, 54(1): 73-84.
- BRULLO S., GUGLIELMO A., PAVONE P., SALMERI C., 2001 – *Osservazioni tassonomiche e cariologiche sulle specie del ciclo di Allium paniculatum L. in Italia*. *Inform. Bot. Ital.*, 33(2): 500-506.
- CASTROVIEJO S., AEDO C., CIRUJANO S., LAÍNZ M., MONTSERAT P., MORALES R., MUÑOZ GARMENDIA F., NAVARRO C., PAIVA J., SORIANO C. (Eds.), 2006 – *Flora iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. III. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C. (Eds.), 2005 – *An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora*. Palombi Editori, Roma. 420 pp.
- CONTI F., DI PIETRO R., 2004 – *Note floristiche per l'Italia meridionale*. *Inform. Bot. Ital.*, 36(1): 35-39.

- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1997 – *Liste Rosse regionali delle piante d'Italia*. W.W.F., Soc. Bot. Ital., Univ. Camerino.
- FIORI A., 1923-29 – *Nuova Flora Analitica d'Italia*. 1-2. Firenze.
- GRÜNANGER P., 2001 – *Orchidaceae d'Italia*. *Quad. Bot. Ambientale Appl.*, 11(2000): 3-80.
- PIGNATTI S., 1969 – *Phagnalon metlesicisii nova sp. aus Westsizilien, mit einem Überblick über die Gruppe von Phagnalon rupestre in Mittelmeerraum*. *Giorn. Bot. Ital.*, 103(4): 291-299.
- PIGNATTI S., 1982 – *Flora d'Italia*. 1-3. Edagricole, Bologna.
- SCOPPOLA A., SPAMPINATO G. (Eds.), 2005 – *Atlante delle specie a rischio di estinzione*. CD-ROM in: SCOPPOLA A., BLASI C. (a cura di), *Stato delle conoscenze sulla Flora vascolare d'Italia*. Palombi Editori, Roma, 253 pp.
- TALAVERA S., AEDO C., CASTROVIEJO S., ROMERO ZARCO C., SÁEZ L., SALGUEIRO F.J., VELAYOS M. (Eds.), 1999 – *Flora iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. VII(I). Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds.), 1964-80 – *Flora Europaea*. Voll. I-V. Cambridge University Press.

#### Caratteristiche ecologiche del sistema idrico del Torrente dell'Asso (Provincia di Lecce)

L. BECCARISI, P. ERNANDES e V. ZUCCARELLO.  
Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

Il presente studio si inserisce in una ricerca dedicata alle zone umide stagionali della Puglia che viene condotta allo scopo di fornire un quadro generale sulla localizzazione geografica di questi particolari e poco noti ecosistemi, e sulla loro caratterizzazione ecologica. In questa nota vengono sinteticamente riportati i risultati di uno studio condotto nel 2006, in collaborazione con l'Associazione Gruppo Speleologico Neretino ONLUS, sul Torrente dell'Asso, allo scopo di tracciarne le caratteristiche idrologiche ed ecologiche e le trasformazioni storiche. Il sistema idrico del Torrente dell'Asso è il più esteso della Provincia di Lecce, con una lunghezza complessiva di 60 km. Esso è di tipo endoreico, rivensando le sue acque nel sottosuolo in corrispondenza di un inghiottitoio carsico noto col nome di Voragine del Parlatano, ubicato in agro di Nardò. L'intero sistema è compreso nell'intervallo altimetrico 30-110 m s.l.m. ed ha un bacino imbrifero con una superficie di 126 km<sup>2</sup> (pari a circa il 5% dell'intera superficie della Provincia di Lecce). Il Torrente dell'Asso è da molto tempo oggetto d'interesse da parte dell'amministrazione pubblica che vede legata al canale una problematica complessa e ancora irrisolta: gli enti comunali utilizzano il canale come via per lo smaltimento delle acque reflue provenienti dai centri abitati o da depuratori; il canale, in occasione di eventi meteorici abbondanti, tende in alcuni punti ad esondare; inoltre le sue

acque risultano inquinate, come è stato appurato nel corso di rilevamenti ambientali, che hanno mostrato come gli indicatori microbiologici in molti casi superano i limiti previsti dalla normativa sulle acque. L'amministrazione pubblica ha quindi operato nel corso degli anni una serie di interventi che ha modificato l'aspetto naturalistico originario del sistema idrico in questione.

La porzione terminale del canale è interamente artificiale: nei primi anni del XX secolo infatti sono stati eseguiti alcuni interventi di bonifica allo scopo di collegare il canale con alcuni inghiottitoi naturali presenti intorno al centro abitato di Nardò (il più importante dei quali è la Voragine del Parlatano). Negli ultimi decenni sono state annessi al sistema, ubicati in vari punti, cinque collettori che riversano acque reflue più o meno ininterrottamente nel sistema. Per questo, alcuni tratti del canale oggi si presentano permanentemente inondati; altri, invece, conservano le caratteristiche originarie di stagionalità, naturalmente inondati in inverno ed asciutti in estate.

In sintesi, i tipi di trasformazioni subite dal sistema idrico del Torrente dell'Asso, nel corso dell'ultimo secolo, sono: l'ampliamento del reticolo idrografico; la modificazione del regime idrologico; la modificazione delle qualità chimico-fisiche delle acque; la modificazione delle caratteristiche strutturali delle comunità biologiche.

Il criterio di classificazione adottato per definire gli habitat presenti nel sistema di canali si basa su tre variabili: idrologia, tipo di substrato e morfologia dell'alveo. Sono quattro i tipi di habitat riscontrabile all'interno del sistema:

**Tipo 1** - Acque stagionali, substrato naturale terroso, alveo a morfologia variabile. La flora è rappresentata da specie come *Agrostis stolonifera* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh., in gran parte inquadrabile nel *Paspalo-agrostidion*, Br.-Bl. et al. 1952. A volte la vegetazione riparia è caratterizzata da canneti ad *Arundo donax* L., che costituiscono delle gallerie ad andamento meandriiforme. Nei tratti sottoposti a sfalcio o diserbo chimico la vegetazione perde notevolmente naturalità e si arricchisce di elementi ruderali annuali. Lungo le sponde sono a volte presenti filari di alberi (*Quercus virgiliana* (Ten.) Ten., *Quercus dalechampii* Ten., *Ulmus minor* Mill.) a testimonianza di boschi un tempo qui presenti, come l'antico Bosco di Cutrofiano. Oggi, si riscontrano quattro piccoli boschi a contatto con il reticolo idrografico, uno dei quali (Bosco La Chiusa) è stato censito come S.I.R. (Sito d'Interesse Regionale) nell'ambito del censimento Natura 2000.

**Tipo 2** - Acque stagionali, substrato naturale roccioso, alveo ampio e poco profondo. Accoglie la vegetazione più interessante del sistema, inquadrabile nella classe *Isoeto-Nanojuncetea*, Br.-Bl. & Tx. ex Westhoff, Dijk & Passchier 1946, che rimanda all'habitat naturale prioritario "Stagni temporanei mediterranei" della Direttiva 92/43/CEE. Si citano le seguenti specie: *Teucrium campanulatum* L., specie della Lista rossa delle piante d'Italia (CONTI et al., 1992), di cui

sono note solo due stazioni in Puglia, questa dell'Asso e l'altra presso i Laghi di Conversano (D'AMICO, SIGNORILE, 2001); *Eryngium barrelieri* Boss., inserita nella Lista rossa regionale (CONTI et al., 1997); ed ancora, *Pulicaria vulgaris* Gaertner, *Mentha pulegium* L. e *Coronopus squamatus* (Forssk.) Asch. Lungo alcuni tratti si riscontra la presenza di *Quercus calliprinos* Webb lungo le sponde.

**Tipo 3** - Acque perenni, substrato naturale, alveo a morfologia variabile. Le comunità riparie si inquadrano generalmente nel *Paspalo-Agristidion*; quelle idrofittiche appartengono alla classe *Lemnetea*, W. Koch & R. Tx. 1995, a *Lemna minor* L. e *Lemna gibba* L.

**Tipo 4** - Acque perenni, substrato artificiale, morfologia dell'alveo a geometria regolare. Si riscontrano, normalmente, comunità idrofittiche della *Lemnetea* e riparie della *Parietarietea* Rivas-Martinez in Rivas Goday 1964.

La perdita di naturalità, nell'ultimo secolo, si può riassumere in tre punti:

- perdita della copertura boschiva;
- a causa dei cambiamenti idrologici, si registra la riduzione dell'habitat prioritario "Stagni temporanei mediterranei" (il tipo 2 secondo la classificazione proposta), attualmente relegato ad un tratto di canale lungo circa 2 km, mentre sino all'anno 2001 l'habitat si riscontrava in un tratto lungo almeno 5 km;
- esiste un reperto di *Isoetes velata* A. Braun conservato presso l'erbario dell'Università di Roma (RO) e raccolto a Galatone nel 1891, verosimilmente all'interno del Torrente dell'Asso. Non si hanno notizie recenti di questa specie in Puglia e non è stata rinvenuta nel sistema idrico in oggetto nel corso della presente ricerca.

#### LETTERATURA CITATA

- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1992 - *Libro Rosso delle piante d'Italia*. W.W.F., Soc. Bot. Ital., Camerino.
- , 1997 - *Liste Rosse regionali delle piante d'Italia*. W.W.F., Soc. Bot. Ital., Camerino.
- D'AMICO F.S., SIGNORILE G., 2001 - *Osservazioni sulle comunità vegetali igrofile nei "laghi" in agro di Conversano (Ba)*. In: MACCHIA F. (a cura di), *Territorio e Società nelle aree meridionali*: 137-146. Mario Adda Editore.

#### Analisi morfometriche sul genere *Isoetes* in Puglia e osservazioni sulla germinazione

P. ERNANDES, L. BECCARISI e V. ZUCCARELLO.  
Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

Il genere *Isoetes* è incluso nella famiglia delle *Isoëtaceae* della classe *Lycopsidea*, divisione *Pteridophyta* (TUTIN et al., 1993); si tratta di un genere poco diffuso sul territorio nazionale presente solo in Sardegna, Sicilia, Calabria, Puglia, Campania, Lazio, Umbria, Liguria, Veneto, Lombardia e Piemonte (CONTI et al., 2005). E' una pianta la cui

rarietà è legata alla limitata diffusione degli ambienti in cui si sviluppa che, secondo la Direttiva Habitat (EUROPEAN COMMISSION DG ENVIRONMENT, 2003) fanno riferimento ai seguenti habitat di acqua dolce d'interesse comunitario: 3110 *Oligotrophic waters containing very few minerals of sandy plains (Littorelletalia uniflorae)*, 3120 *Oligotrophic waters containing very few minerals generally on sandy soils of the West Mediterranean with Isoetes spp.*, 3130 *Oligotrophic to mesotrophic standing waters with vegetation of the Littorelletea uniflorae and/or Isoet-Nanojuncetea*, 3170 *Mediterranean temporary ponds*, quest'ultimo considerato habitat prioritario.

Per la Puglia sono note le segnalazioni di *Isoetes subinermis* (Durieu) Cesca & Peruzzi (sub *Isoetes histrix* Dur. var. *subinermis* Dur.; VACCARI, 1920), *Isoetes histrix* Bory (MARCHIORI *et al.*, 1993; ERNANDES *et al.*, 2007) ed *Isoetes duriei* Bory (CONTI *et al.*, 2005), ma la segnalazione di quest'ultima è da ritenersi erronea. Gli studi condotti sino ad ora nel territorio pugliese (ERNANDES *et al.*, 2006; ERNANDES, ZUCCARELLO, 2006, 2007) hanno portato all'identificazione di tre diversi tipi morfologici sulla base di alcune caratteristiche osservate in campo ed in laboratorio: grandezza delle foglie, spore, fillopodii, cormo, portamento. Sulla base di tali osservazioni è stata formulata l'ipotesi di lavoro, quella di verificare se i tre tipi morfologici corrispondevano a tre specie differenti.

Convenzionalmente, sono state attribuite delle lettere che corrispondono a tre specie di *Isoetes* cui i tipi sono verosimilmente riconducibili: (H) *Isoetes histrix*, (O) *Isoetes olympica* A. Br. (non segnalata in Italia, ma presente in Turchia, Spagna, Siria, Libano) e (S) *Isoetes subinermis* (CESCA, PERUZZI, 2001).

Sono state effettuate minuziose ricerche bibliografiche relative al genere *Isoetes* e miranti alla discriminazione tra specie; tra i lavori svolti lo studio sulla morfologia delle macrospore al fine di discriminare le specie, sembrerebbe quello più frequente (KEELEY, 1984; HICHEY, 1986; ROMERO, REAL, 2005); in Italia relativamente alle ricerche condotte sino ad ora, l'unico studio di riferimento è quello di CESCA, PERUZZI (2001).

Per la prima fase della ricerca è stata seguita la metodologia proposta da ROMERO, REAL (2005); per la descrizione delle caratteristiche di macro- e microspore sono stati utilizzati due glossari palinologici (FERRARINI *et al.*, 1968; HICHEY, 1986).

Sono state prelevate macro- e microspore da reperti afferenti alle tre tipologie e provenienti da 5 stazioni pugliesi: Bosco del Compare (Brindisi), Bosco Preti (Brindisi), Bosco Difesa Grande (Gravina di Puglia), Gravina di Massafra (Massafra), Macchie Don Cesare (Salve). Le spore estratte e selezionate hanno subito una serie di fasi obbligatorie di preparazione, posizionamento e metallizzazione prima dell'osservazione al SEM (Scanning Electron Microscope) presso il Dipartimento di Astrofisica dell'Università del Salento; le misurazioni sono state effettuate attraverso un software di analisi immagine (Image J). Le caratteristiche rilevate sono le seguenti: colore (dal vivo), rugosità, commissura, cingoli, cresta lesurale, equato-

re, cresta equatoriale, faccia prossimale, diametro. Sono state inoltre effettuate delle prove di germinazione di macro- e microspore su terreno campione prelevato *in situ*. La semina è avvenuta nell'estate 2007, le spore sono state poste sul terreno in vaschette di polistirolo forate con un ago ed annaffiate una volta alla settimana; sono state lasciate esposte a temperature e luce esterne.

Le considerazioni sulle caratteristiche rilevate sono le seguenti: le macrospore del tipo H e del tipo S differiscono per commissura e rugosità: tubercolate con commissura spessa le prime, tubercolato-rugulate con commissura sottile le seconde; il tipo O ha macrospore differenti sia da S che da H: pustulate con commissura assente e cresta laesurale alta; per quanto riguarda le microspore H ed S sono uguali: echinulate e con commissura sottile, il tipo O differisce per rugosità e commissura: coniculate e commissura assente. Le misurazioni relative al diametro delle macrospore sono di seguito riassunte: i tipi H ed S hanno dimensioni simili con una media di 500 µm, le macrospore del tipo O sono nettamente più piccole intorno ai 450 µm (le differenze sono statisticamente significative). Le microspore hanno dimensioni simili per tutti e tre i tipi: 29 µm in media.

Le prove di germinazione hanno portato alla formazione delle plantule: è stato possibile osservare lo sviluppo del gametofito interno e la successiva fuoriuscita dello sporofito nel mese di Ottobre 2007. Le fotografie realizzate mostrano lo sporofito che fuoriesce dalla fenditura della parete della spora preformata, al momento della sua germinazione.

Le osservazioni effettuate in questa prima fase della ricerca hanno fornito risultati inediti che tuttavia necessitano di ulteriori approfondimenti; nella seconda fase è prevista la raccolta di materiale fresco su cui rilevare altre caratteristiche tra cui la determinazione del cariotipo, da associare ai risultati ottenuti sin'ora. Tuttavia, le analisi fatte nell'ambito della presente ricerca concordano con la specificità di habitat dei tre tipi di *Isoetes*: i tipi H e S si rinvenivano all'interno di boschi, su suoli argillosi a bassa conducibilità idraulica (*waterlogged soils*) (ERNANDES *et al.*, 2007), mentre il tipo O lo si rinviene esclusivamente nelle vaschette di dissoluzione su substrato calcareo (*cupular pools*) (ERNANDES *et al.*, 2007). Attualmente la ricerca è orientata verso il confronto di questi tipi con quelli presenti in altri paesi del Mediterraneo al fine di discriminare meglio le specie e analizzarne le differenze dal punto di vista biogeografico.

#### LETTERATURA CITATA

- CESCA G., PERUZZI L., 2001 – *Isoetes (Lycophytina, Isoetaceae) with terrestrial habitat in Calabria (Italy). New cariological and taxonomical data*. *Flora Medit.*, 11: 303-309.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C. (Eds.), 2005 – *An annotated checklist of the Italian vascular flora*. Palombi Editori, Roma.
- ERNANDES P., BECCARISI L., MEDAGLI P., ZUCCARELLO V., 2006 – *Note sulle conoscenze floristiche degli "stagni temporanei mediterranei" della Puglia centro-meridionale*. *Inform. Bot. Ital.*, 38(Suppl. 1): 185-186.

- ERNANDES P., BECCARISI L., ZUCCARELLO V., 2007 – *L'habitat prioritario "stagni temporanei mediterranei" in Puglia: nuovi dati distributivi e segnalazioni di specie interessanti*. Inform. Bot. Ital., 39(2): 271-279.
- ERNANDES P., ZUCCARELLO V., 2006 – *Note sulla presenza di "stagni temporanei mediterranei" al Bosco Preti e al Bosco del Compare (Brindisi)*. Atti 101° Congr. Società Botanica Italiana. Caserta, 27-29 Settembre 2006: 315.
- , 2007 – *Conservation of Mediterranean temporary pools in Apulia (southern Italy): definition, principles and problems*. Atti 5° Symp. European Freshwater Science. Palermo, 8-13 July 2007.
- EUROPEAN COMMISSION DG ENVIRONMENT, 2003 – *Manual of European Union Habitats, EUR25*.
- FERRARINI E., CIAMPOLINI F., PICHI SERMOLLI R.G., MARCHETTI D., 1968 – *Iconographia Palynologica Pteridophytorum Italiae*. Webbia, 40(1): 1-202.
- HICKEY R. J. – 1986 *Isoetes Megaspore Surface Morphology: Nomenclature, Variation, and Systematic Importance*. Am. Fern J., 76: 1-16.
- KEELEY J. E., 1984 – *Search theory and convergent spore morphology*. Am. Natur., 124(2): 307-308.
- 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.
- ROMERO M.I., REAL C., 2005 – *A morphometric study of three closely related taxa in the European Isoetes velata complex*. Bot. J. Linnean Soc., 148: 459-464.
- TUTIN T.G., BURGESS N.A., CHATER A.O., EDMONDSON J.R., HEYWOOD V.H., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds.), 1993 – *Flora Europaea, I, Second Edition*. Cambridge University Press.
- VACCARI A., 1920 – *Piante dell'agro Brindisino*. In: FIORI A., *Addenda ad Floram Italicam*. Boll. Soc. Bot. Ital., 1920: 8-10.

### Reperimento e raccolta di materiale generativo per la Banca dei Semi dell'Orto Botanico di Lecce

R. ACCOGLI, L. CARONE, T. RIFUGGIO e S. MARCHIORI. Orto Botanico del Di.S.Te.B.A., Università del Salento.

La raccolta di materiale propagativo è stata una fase fondamentale e preliminare nelle attività di conservazione *ex situ* ed *in situ* operate dall'Orto Botanico dell'Università del Salento. Per la realizzazione delle collezioni vive, sono state prelevate sia parti vegetative (polloni, talee, propaguli, gemme) che frutti maturi (bacche, drupe, capsule, pomi, infruttescenze etc.) dai quali estrarre i semi (ACCOGLI *et al.*, 2000). Come vuole l'antica tradizione degli Orti Botanici, la raccolta e la catalogazione dei semi è stata finalizzata anche alla compilazione dell'*Index Seminum*, da divulgare tra le istituzioni del settore, per incrementare gli scambi di materiale vegetale necessario agli studi sistematici.

Il patrimonio floristico della Puglia, conta ben 2075 *taxa* subgenerici, dei quali il 38,07% è rappresentato soprattutto da terofite (ALBANO *et al.*, 2005), perciò

una *Collecta semina* della flora pugliese ha fornito una notevole quantità di materiale generativo da schedare e conservare con le dovute attenzioni, anche perché, nel frattempo, si sviluppava sempre più l'idea della realizzazione di una Banca Semi, magari a medio/breve termine, grazie alla quale mantenere gli scambi con altri Orti e con la stessa RIBES (Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea italiana).

Per la Puglia, numerose sono le entità vegetali floristicamente degne di nota: endemiche, incluse a vario status nelle Liste Rosse, di interesse sistematico e fitogeografico. A queste, in scala di priorità, seguono: quelle di importanza ecologica, quelle officinali e di interesse economico; le cultivar locali alimentari (ACCOGLI, MARCHIORI, 2006 a).

La banca semi è uno tra i più validi metodi di conservazione *ex situ*. Essa permette di attuare la conservazione delle specie vegetali a livello genetico (MEDA, 1996). Sempre più spesso, l'attività propagativa destinata alle pratiche di recupero ambientale si avvale di materiale generativo proveniente da quegli stessi ambienti oggetto di intervento; infatti, gli ecotipi locali serbano nel proprio genoma caratteristiche peculiari, che sono il risultato della selezione naturale vissuta localmente, differenziandosi, anche per poco, dagli individui della stessa specie che vivono nel medesimo areale (DAMIANI *et al.*, 2001).

Perciò le campagne di raccolta di materiale generativo hanno interessato tutto il territorio salentino ed hanno permesso di individuare gli ecotipi autoctoni, i popolamenti, o le riserve biogenetiche in grado di fornire materiale propagativo idoneo agli interventi di riqualificazione ambientale che l'Orto Botanico concorda con le Amministrazioni Comunali locali. Dal 1997 ad oggi sono state registrate 2744 accessioni di semi provenienti da piante spontaneamente diffuse in natura o coltivate in Orto Botanico, corrispondenti a 911 specie, 483 generi e 103 Famiglie. A questi, vanno ad aggiungersi 59 generi e 140 specie non catalogati, per mancanza di caratteri morfologici (nella pianta in natura) al momento della raccolta. Parallelamente, il reperimento di germoplasma di varietà orticole erbacee ha portato a 670 accessioni, corrispondenti a 13 Famiglie, 43 Generi e 58 specie con un numero provvisorio di oltre 400 varietà colturali. Tra queste, solo 74 sono varietà stabilizzate, botanicamente classificate e commercializzate (ACCOGLI, MARCHIORI, 2006 b).

La periodicità annuale delle campagne di raccolta permette di attuare un monitoraggio degli ambienti, della flora locale e della sua capacità riproduttiva. La collezione delle specie sotto forma di semi non è, quindi una semplice riserva, ma un settore che permette di attivare studi sulla capacità germinativa, sul numero di cromosomi, sulla dormienza o sui meccanismi che attivano e disattivano la germinazione.

Possiamo affermare che la Banca dei Semi dell'Orto Botanico di Lecce, oltre che rispecchiare lo stato della biodiversità vegetale del Salento, rispecchia anche le sue condizioni ecologiche, indirizzando verso le più corrette e idonee soluzioni di conservazione.

## LETTERATURA CITATA

- ACCOGLI R., MARCHIORI S., 2006a – Ex situ *conservation and rare plants propagation in the Lecce Botanical Garden: reproductive biology problems*. *Caryologia*, 59 (4): 349-353
- , 2006b – *Germoplasma di specie coltivate: reperimento e conservazione nell'Orto Botanico di Lecce*. 3° Convegno Piante Mediterranee. Bari, 27 settembre-1 ottobre 2006.
- ACCOGLI R., MARCHIORI S., MEDAGLI P., IPPOLITO F., 2000 – *Conservazione ex situ di piante delle Liste Rosse della Puglia. Primi risultati*. Cahier Options Méditerranéennes ser.A: Mediterranean Seminars N. 47 “La Cooperazione Italo-Albanese per la valorizzazione della biodiversità” CIHEAM, Bari, Ed. Ricciardi L., Myrta A., De Castro F.
- ALBANO A., ACCOGLI R., MARCHIORI S., MEDAGLI P., MELE C., 2005 – *Stato delle conoscenze floristiche in Puglia*. In: SCOPPOLA A., BLASI C. (Eds.), *Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia*: 185-189. Palombi & Partners S.r.l., Roma.
- DAMIANI G., 2001 – In: B. PIOTTO, A. DI NOI, *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. Manuale ANPA, Dip. Prev. e Risanam. Ambientale, Roma
- MEDA P., 1996 – *Guida agli Orti e Giardini Botanici*. Editoriale Giorgio Mondadori.