

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA ONLUS

SEZIONI REGIONALI

E

GRUPPI DI INTERESSE SCIENTIFICO

E TECNICO OPERATIVO

Contributi scientifici

SEZIONE PUGLIESE

Riunione Scientifica Annuale

Bari, 25 Gennaio 2013

Antiossidanti in varietà di cicoria e in “paparine” del Salento

A. MONTEFUSCO, G. SEMITAI, G. PIRO, M.S. LENUCCI

ABSTRACT - *Antioxidants in varieties of chicory and “paparine” of Salento* - In this work we evaluated the hydrophilic and lipophilic antioxidant activities, as well as the total phenol, flavonoid, tocochromanol (tocopherol and tocotrienol) and carotenoid contents in the edible portion of wild and cultivated varieties of chicory and in the basal rosette leaves of the wild species of *Papaver rhoeas*, known by natives, as “paparina”, collected in the countryside of Salento (South Apulia, Italy). Were analyzed: (1) two cultivars of chicory, the “catalogna” harvested in the area between S. Pietro Vernotico and Tutturano (BR) and the “otrantina” harvested in Otranto (LE); (2) two wild chicory ecotypes, harvested in S. Pietro Vernotico (BR) and Statte (TA), respectively; (3) the “paparina” leaves harvested in Sternatia (LE). Our results showed that the hydrophilic antioxidant activity is, generally, higher than the lipophilic. The “paparina” leaves exhibited both the highest antioxidant activities and the highest concentration of total phenols and flavonoids. Among the extracted carotenoids, lutein and β -carotene were the most abundant in all analyzed samples. Total carotenoid content was greater in wild than in cultivated plants.

Key words: antioxidant activity, carotenoids, chicory, “paparine”, tocochromanols, total phenols

INTRODUZIONE

L'alimentazione è uno dei fattori esogeni che incidono maggiormente su accrescimento, sviluppo fisico e mentale, rendimento e produttività degli individui. Studi epidemiologici hanno dimostrato che diete ricche di alimenti di origine vegetale, quali frutta, verdura, legumi e cereali non raffinati, sono di fondamentale importanza nella prevenzione di numerose patologie, come malattie cardiovascolari, metaboliche, neuro-degenerative, cronico-degenerative e infiammatorie (MCKLOWN, 1999; RONCO *et al.*, 1999; AGARWAL, RAO, 2000; SLATTERY *et al.*, 2000). Il mondo vegetale, infatti, oltre a carboidrati, proteine, lipidi e micronutrienti essenziali, fornisce anche numerosi composti fitochimici o “*phytochemicals*”. Si tratta di molecole appartenenti a svariate classi chimiche, che non sono sintetizzate dall'uomo ma che, se introdotte quotidianamente con l'alimentazione in dosi sufficienti, esercitano potenti attività biologiche (CARRATÙ, SANZINI, 2005), tra cui quella antiossidante (GIAMMARIOLI *et al.*, 1998; SLATTERY *et al.*, 2000; ARUOMA *et al.*, 2001). Gli antiossidanti sono indispensabili per proteggere le molecole e i sistemi biologici dall'azione deleteria dei radicali liberi e, soprattutto, delle ROS (*Reactive Oxygen Species*). L'organismo umano è capace di contrastare l'attività di tali molecole grazie a sistemi di difesa endogeni o antiossidanti “enzimatici”, come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutazione

perossidasi (GPX) (MATÉS *et al.*, 1999). Quando, però, il livello delle ROS supera le capacità antiossidanti della cellula è necessario un apporto esterno di antiossidanti, definiti esogeni o “non enzimatici”, derivati soprattutto da alimenti di origine vegetale. Gli antiossidanti “non enzimatici” comprendono fenoli, flavonoidi, carotenoidi, vitamine (C ed E) e il glutatione ridotto (GSH). Una corretta alimentazione è, quindi, di fondamentale importanza in quanto garantisce un efficace sistema di difesa antiossidante (PRENESTI *et al.* 2007; JIMENÉZ *et al.*, 2008). La dieta mediterranea è caratterizzata da un'abbondante assunzione di alimenti di origine vegetale. Studi recenti hanno, tuttavia, evidenziato sostanziali differenze nella composizione della dieta nei diversi paesi del Mediterraneo (TRICHOPOULOU *et al.*, 2000; TRICHOPOULOU, 2001). È comune, infatti, per alcune popolazioni del Mediterraneo, come ad esempio per quelle dell'Italia meridionale e della Grecia, arricchire la propria dieta quotidiana con piante spontanee raccolte in determinati periodi dell'anno (TRICHOPOULOU *et al.*, 2000). Tra queste piante occupano un ruolo importante la cicoria e il papavero (Fig. 1).

La cicoria comune (*Cichorium intybus* L.) è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle *Asteraceae*. È diffusa in tutto il mondo, in particolare nelle zone temperate dell'Euroasia e dell'America del Nord. In

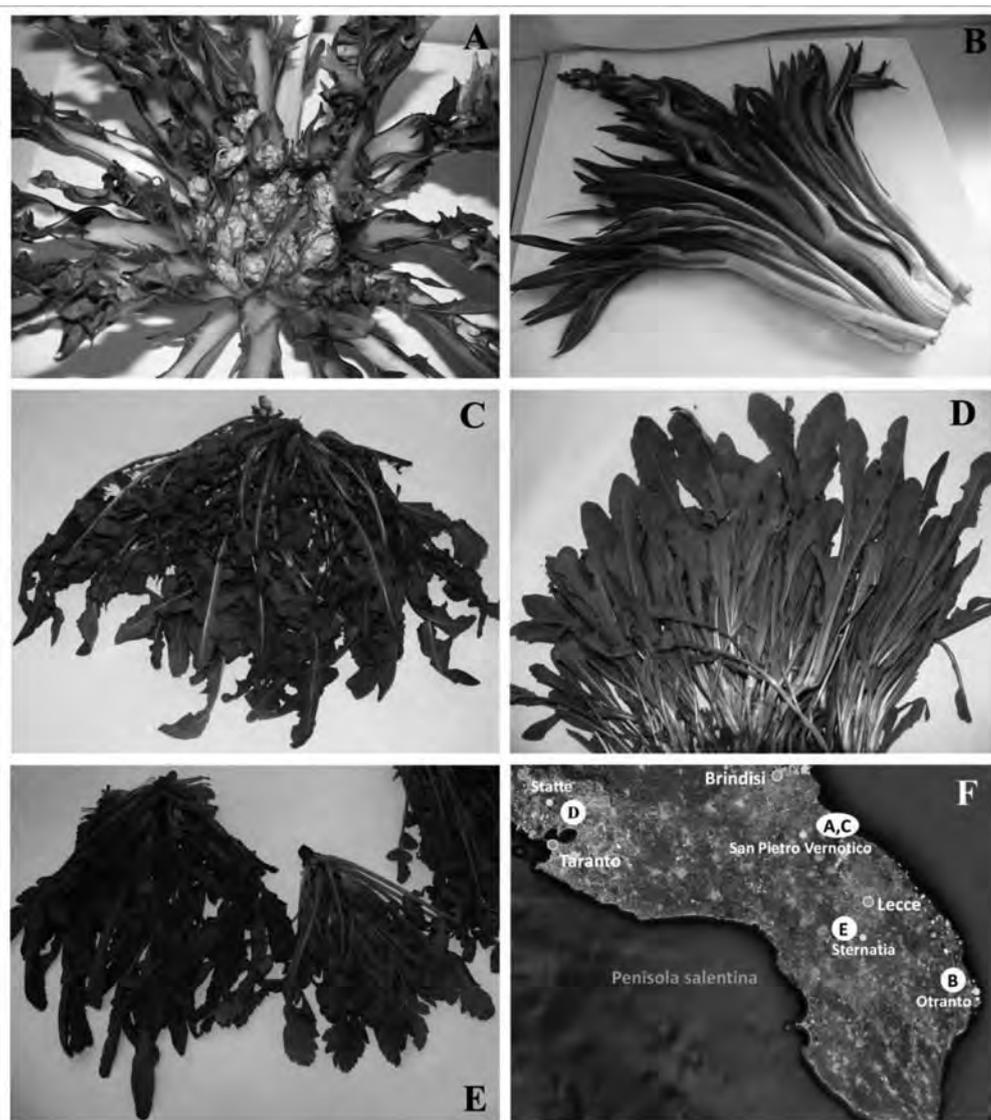


Fig. 1

Fotografie di alcuni degli esemplari analizzati: cicoria catalogna (A), cicoria otrantina (B), cicoria spontanea di San Pietro Vernotico (C), cicoria spontanea di Statte (D) e "paparina" (E); siti di raccolta nella penisola salentina (F).
 Photos of the analyzed plants: Catalogna chicory (A), Otrantina chicory (B), wild chicory from San Pietro Vernotico (C), wild chicory from Statte (D) and "paparina" (E); sampling sites in the Salento peninsula (F).

Italia è presente in tutte le regioni, isole comprese, fino alla media montagna. È una specie estremamente polimorfa e non è stata ancora studiata a fondo. La cicoria è una pianta usata in medicina fin dall'antichità. Era, infatti, conosciuta ed apprezzata per le sue virtù terapeutiche anche da Greci e Romani. Molti usi tradizionali hanno recentemente trovato conferma scientifica. Diversi studi effettuati sulla cicoria hanno portato, infatti, all'isolamento e all'identificazione di una grande varietà di composti fitochimici tra cui antociani (NORBAECK *et al.*, 2002), lattoni sesquiterpenici (SHAH *et al.*, 2012), fruttani (TIMMERMANS *et al.*, 2001), flavonoidi (INNOCENTI *et al.*, 2005) e cumarine (DEM'YANENKO, DRANIK, 1971). Nell'alimentazione umana vengono utilizzate

sia la porzione aerea che le radici, ma l'utilizzo più frequente è quello delle foglie e dei grossi germogli (turioni) tipici di alcune specie coltivate, organi che vengono consumati sia freschi che cotti.

Il papavero selvatico (*Papaver rhoeas* L.) o rosolaccio è una pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle *Papaveraceae*. Originario delle regioni medio-orientali, è comparso in Europa con l'introduzione delle colture dei cereali. Si osserva, infatti, frequentemente come infestante sia dei cereali sia delle colture in genere, negli incolti secchi e negli ambienti ruderali (TUTIN *et al.*, 1964). Nell'ambito alimentare i semi del papavero sono impiegati per aromatizzare dolci, biscotti e pane, mentre le foglie, ed in particolare le giovani rosette basali, si usano per

lo più cotte e vengono ampiamente utilizzate nella cucina tradizionale di molte regioni italiane (nel Salento sono note con il termine “*paparine*”).

MATERIALI E METODI

Sono state analizzate le porzioni eduli di: (1) due varietà coltivate di cicoria, la catalogna (Fig. 1A,F) raccolta nella zona tra S. Pietro Vernotico e Tutturano (BR) e la otrantina (Fig. 1B,F) raccolta, invece, nella zona di Otranto (LE); (2) due ecotipi spontanei di cicoria, uno (Fig. 1C,F) raccolto nella zona di S. Pietro Vernotico (BR) e un altro (Fig. 1D,F) nella zona di Statte (TA); (3) la specie selvatica di *Papaver rhoeas* nota nel Salento come “*paparina*” (Fig. 1E,F), raccolta nella zona di Sternatia (LE).

Il materiale vegetale appena raccolto è stato ripulito da eventuali residui di terra ed immediatamente omogenato con un blender da laboratorio (Waring Laboratory Science, Torrington, CT, USA) previo congelamento in azoto liquido. Aliquote di omogenato sono state utilizzate per il dosaggio dell'attività antiossidante idrosolubile e liposolubile, e di fenoli totali, flavonoidi, tococromanoli (tocoferoli e tocotrienoli) e carotenoidi.

Le attività antiossidanti, idrofilica e lipofila, sono state valutate mediante il metodo TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), come descritto da RE *et al.* (1999). Dalla somma delle attività antiossidanti idrofilica e lipofila è stata calcolata l'attività antiossidante totale.

L'estrazione di fenoli e flavonoidi è stata effettuata seguendo il metodo di CANTIN *et al.* (2009), leggermente modificato per adattarlo al materiale di partenza. La determinazione dei composti fenolici estratti è stata effettuata utilizzando il metodo riportato da XU *et al.* (2008), per i flavonoidi si è utilizzato il metodo di ZHISHEN *et al.* (1999).

L'estrazione dei tococromanoli (tocoferoli e tocotrienoli) e dei carotenoidi è stata effettuata seguendo il metodo di FRASER *et al.* (2000). Gli estratti sono stati analizzati mediante HPLC, a temperatura ambiente, usando una colonna Waters YMC™ Carotenoid 3 μm (4,6x250 mm) ed una fase mobile costituita da metanolo (A), ammonio acetato 0,2% in acqua/metanolo (20/80, v/v) (B) e tert- metil-butil etere (C). Il flusso dell'eluente è stato mantenuto costante a 1 ml/min. Il gradiente di eluizione usato è stato il seguente: A=95% e B=5%, in maniera isocratica per 12 minuti (0-12 min); A=80%, B=5% e C=15%, a 12 minuti; un gradiente lineare fino a A=30%, B=5% e C=65%, per 33 minuti (12-45 min); un gradiente lineare fino alle concentrazioni iniziali (A=95% e B=5%), per 10 minuti (45-55 min); una fase di condizionamento di 10 minuti (55-65 min) alle stesse concentrazioni (A=95% e B=5%). Gli analiti sono stati rivelati spettrofotometricamente a $\lambda=290$ nm per i tocoferoli e i tocotrienoli e a $\lambda=450$ nm per i carotenoidi. I campioni, prima di essere sottoposti ad analisi HPLC, sono stati filtrati attraverso filtri di 0,2 μm (Gelman Supor Acrodisc, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA).

Tutti i dati ottenuti sono stati riferiti sia al peso fresco (f.w.), sia al peso secco (d.w.) dei vari campioni e rappresentano la media di tre determinazioni indipendenti \pm deviazione standard (D.S.). Avendo un andamento simile a quelli su base fresca, i dati riferiti al peso secco non sono stati riportati in questo lavoro.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati relativi all'attività antiossidante idrosolubile, liposolubile e totale delle diverse piante prese in considerazione in questo studio sono riportate in Fig. 2. Dai dati è emerso che i valori relativi all'attività antiossidante dei composti idrosolubili (Fig. 2A) sono sempre più elevati rispetto a quelli relativi all'attività antiossidante dei composti liposolubili (Fig. 2B). Nelle “*paparine*” salentine è stata riscontrata la più elevata attività antiossidante totale (1326 \pm 23 μmol T.E./100g f.w.) (Fig. 2C).

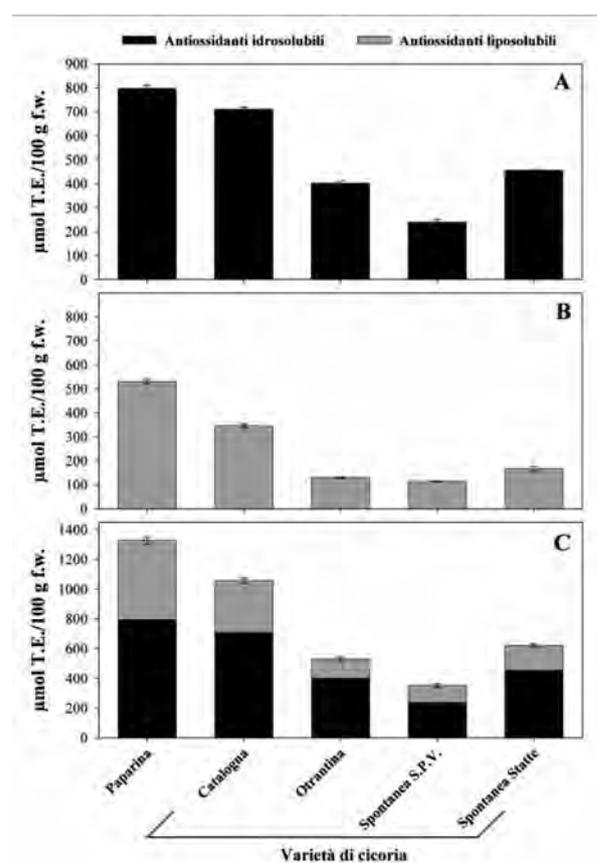


Fig. 2

Attività antiossidante idrosolubile (A), liposolubile (B) e totale (C) valutate mediante il metodo TEAC nelle cicorie e nelle “*paparine*” del Salento. I valori sono espressi in μmol di Trolox Equivalenti (T.E.)/100 g f.w. Hydrophilic (A), lipophilic (B) and total (C) antioxidant activity evaluated by the TEAC assay in chicory and “*paparine*” plants collected in Salento. Values are expressed as μmol Trolox Equivalent (T.E.)/100 g f.w.

Per quanto riguarda le diverse tipologie di cicoria analizzate, la maggiore attività è stata riscontrata nella cultivar catalogna ($1056 \pm 18 \mu\text{moli T.E./100g f.w.}$), mentre la più bassa nell'ecotipo spontaneo raccolto nella zona di San Pietro Vernotico (BR) ($352 \pm 13 \mu\text{moli T.E./100g f.w.}$). Le differenze osservate sui diversi campioni possono essere legate verosimilmente al fatto che l'attività antiossidante è influenzata sia da fattori varietali, sia da fattori ambientali, questi ultimi correlati alle condizioni culturali e pedo-climatiche (LATTANZIO, RUGGIERO, 2003; CARRATÙ, SANZINI, 2005).

Anche la scelta del metodo di valutazione dell'attività antiossidante ha la sua importanza. In letteratura sono riportati diversi metodi che permettono di misurare la capacità antiossidante di frutta e verdura; i risultati che si ottengono dipendono, sia dal tipo di prodotto preso in esame e sia dal metodo utilizzato (PEREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2010). Un'attenzione particolare va rivolta all'apprezzabile attività antiossidante rilevata nell'ecotipo spontaneo di Statte che è stato raccolto in una zona ad alto inquinamento ambientale (ILVA di Taranto). In letteratura è riportato che concentrazioni tossiche di metalli pesanti come il cadmio e lo zinco sono capaci di alterare differenti processi metabolici e di generare uno stress ossidativo. Lo stress ossidativo è a sua volta in grado di influenzare l'attività di alcuni enzimi ad azione antiossidante, quali catalasi, perossidasi e superossido dismutasi, la cui induzione è considerata un'importante strategia di autodifesa rispetto a una condizione di stress (CHAOUÏ *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2003).

Dalla valutazione quantitativa dei composti fenolici (Fig. 3A) risulta che, per quanto riguarda le cicorie, la maggiore quantità di composti fenolici è stata trovata nella cultivar catalogna ($101,7 \pm 2,9 \text{ mg G.A.E./100g f.w.}$). È riportato, tra l'altro, che la frazione fenolica di questa varietà ha un'estrema stabilità chimica anche dopo la cottura (INNOCENTI *et al.*, 2005). Tra i campioni analizzati, la quantità di fenoli estratti dalle "paparine" salentine, è risultata essere in assoluto la più elevata ($134,8 \pm 0,6 \text{ mg G.A.E./100g f.w.}$). Questi valori sono superiori del 24,6% a quelli riscontrati nella catalogna.

La quantità di flavonoidi (Fig. 3B) più elevata è stata riscontrata nella cultivar catalogna ($66,2 \pm 4,2 \text{ mg C.E./100g f.w.}$), mentre la quantità più bassa nell'ecotipo spontaneo raccolto nella zona di Statte

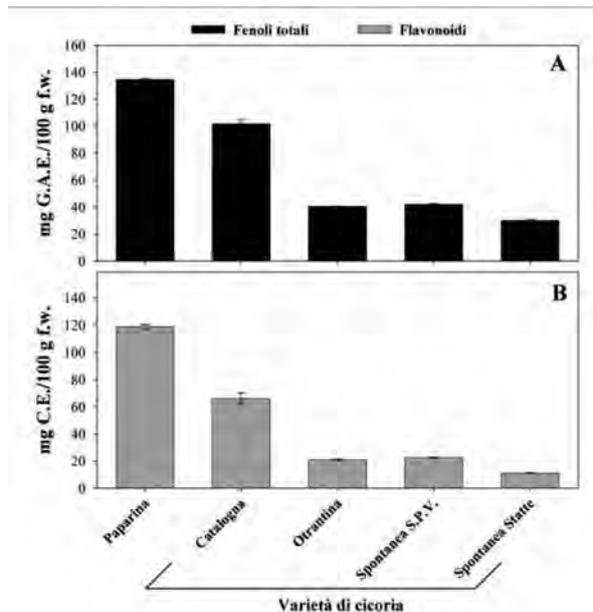


Fig. 3

Fenoli totali (A) e flavonoidi (B) nelle cicorie e nelle "paparine" del Salento. I valori dei fenoli totali sono espressi in mg di Acido Gallico Equivalenti (G.A.E.)/100g f.w.; quelli dei flavonoidi in mg di Catechina Equivalenti (C.E.)/100g f.w.

Total phenols (A) and flavonoids (B) in chicory and "paparine" plants collected in Salento. Total phenol values are expressed as mg Gallic Acid Equivalent (G.A.E.)/100g f.w.; flavonoid values as mg Catechin Equivalent (C.E.)/100g f.w.

($11,1 \pm 0,3 \text{ mg C.E./100g f.w.}$). La quantità di flavonoidi nelle "paparine" ($119,0 \pm 1,4 \text{ mg C.E./100g f.w.}$) è la più elevata tra quelle riscontrate nei campioni analizzati.

Vista l'importanza dei tococromanoli (tocoferoli e tocotrienoli) e dei carotenoidi nella dieta umana, in questo lavoro è stato effettuato anche un dosaggio del loro contenuto sui diversi campioni presi in esame. Negli estratti analizzati sono state riscontrate quantità non significative di tocoferoli e tocotrienoli; al contrario, in tutti i campioni erano presenti quantità apprezzabili di carotenoidi (Tab. 1). La β -criptoxantina è presente in basse quantità in tutti i campioni presi in esame, mentre più alto è il conte-

TABELLA 1

Quantità di carotenoidi nelle cicorie e nelle "paparine" del Salento. I valori sono espressi in $\mu\text{g/g f.w.}$
Carotenoid amounts in chicory and "paparine" plants collected in Salento. Values are expressed as $\mu\text{g/g f.w.}$

Carotenoidi	Paparine	Varietà di cicoria			
		Catalogna	Otrantina	Spontanea S.P.V.	Spontanea Statte
Luteina	18,43±2,45	8,02±0,94	8,86±0,93	14,70±3,25	30,14±4,49
β -Criptoxantina	0,29±0,02	0,14±0,03	0,13±0,03	0,28±0,01	0,41±0,05
β -Carotene	8,90±0,54	3,31±0,61	4,60±0,67	6,73±1,39	14,06±2,29
Totale	27,62±3,01	11,47±1,58	13,59±1,63	21,71±4,65	44,61±6,83

nuto di luteina e di β -carotene. I dati ottenuti sono in accordo con quanto riportato in letteratura ovvero che luteina e β -carotene sono i due carotenoidi predominanti nei vegetali a foglia verde (CALVO, 2005; LAKSHMINARAYANA *et al.*, 2005; ŽNIDARČIČ *et al.*, 2011). Nelle cicorie i valori più alti di luteina sono stati riscontrati nei due ecotipi spontanei. Anche la specie selvatica di papavero mostra un alto contenuto di luteina.

Per quanto riguarda il contenuto di β -carotene, i valori oscillano tra $14,06 \pm 2,29$ $\mu\text{g/g}$ f.w. (ecotipo selvatico raccolto nella zona di Statte) e $3,31 \pm 0,61$ $\mu\text{g/g}$ f.w. (cultivar catalogna). I livelli di carotenoidi dei vegetali a foglia verde dipendono dalla specie, dalla varietà, dalle pratiche di coltivazione, dallo stadio di maturazione, ma anche dall'irradiazione solare, dalla temperatura e dalle caratteristiche del suolo (VAN DEN BERG *et al.*, 2000; ŽNIDARČIČ *et al.*, 2011). I risultati riportati in questo lavoro evidenziano che le piante spontanee analizzate (cicoria di Statte, cicoria di San Pietro Vernotico e "paparine") sono quelle che hanno mostrato un più alto contenuto di carotenoidi totali rispetto a quelle coltivate ed in particolare la cicoria spontanea di Statte ($44,61 \pm 6,83$ $\mu\text{g/g}$ f.w.). In un recente lavoro (SANITÀ DI TOPPI *et al.*, 2012) è stato riportato che l'accumulo di cadmio a livello cellulare sembra indurre alterazioni nei cromoplasti in cui si sintetizzano e si accumulano i carotenoidi.

CONCLUSIONI

In questo lavoro si è evidenziato che:

- i valori relativi all'attività antiossidante dei composti idrosolubili estratti dai campioni analizzati risultano sempre più elevati rispetto a quelli relativi all'attività antiossidante dei composti liposolubili;
- le "paparine" salentine mostrano la più elevata attività antiossidante e il più elevato contenuto in fenoli totali e flavonoidi;
- tra le cicorie analizzate, la cultivar catalogna presenta la più alta attività antiossidante e il più alto contenuto di fenoli totali e di flavonoidi;
- tra i carotenoidi estratti la luteina e il β -carotene sono presenti in quantità più elevata in tutti i campioni analizzati;
- il contenuto di carotenoidi risulta maggiore nelle specie spontanee rispetto a quelle coltivate;
- la varietà e i fattori ambientali contribuiscono a influenzare sia la capacità antiossidante sia il contenuto di alcune molecole bioattive.

LETTERATURA CITATA

- AGARWAL S., RAO A.V., 2000 – *Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases*. Can. Med. Assoc. J., 163(6): 739-744.
- ARUOMA O.I., PFANNHAUSER W., FENWICK G.R., KHOKHAR S., 2001 – *In vitro and in vivo methods for the assessment of antioxidant activity in biologically active phytochemicals in food*. Royal Soc. Chem., Special publ., n. 269, Cambridge (UK).
- CALVO M.M., 2005 – *Lutein: A valuable ingredient of fruit and vegetables*. CRIT. Rev. Food Sci. Nutr., 54: 671-696.
- CANTIN C.M., MORENO M.A., GOGORCENA Y., 2009 – *Evaluation of the antioxidant capacity, phenolic compounds, and vitamin C content of different peach and nectarine (Prunus persica (L.) Batsch) breeding progenies*. J. Agric. Food Chem., 57: 4586-4592.
- CARRATÙ B., SANZINI E., 2005 – *Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale*. Ann. Ist. Super. Sanità, 41(1): 7-16.
- CHAOUI A., MAZHOUZI S., GHORBAL M.H., EL FERJANI E., 1997 – *Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Plant Sci., 127: 139-147.
- CHEN Y.X., HE Y.F., LUO Y.M., YU Y.L., LIN Q., WONG M.H., 2003 – *Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium*. Chemosphere, 50: 789-793.
- DEM'YANENKO V.G., DRANIK L.I., 1971 – *Coumarins of racemes of Cichorium intybus*. Chem. Nat. Compd, 7(1): 104.
- FRASER P.D., PINTO M.E.S., HOLLOWAY D.E., BRAMLEY P.M., 2000 – *Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids*. Plant J., 24(4): 551-558.
- GIAMMARIOLI S., FILESI C., SANZINI E., 1998 – *Danno ossidativo e antiossidanti della dieta*. Riv. Sci. Alim., 1: 63-76.
- INNOCENTI M., GALLORI S., GIACCHERINI C., IERI F., VINCIERI F.F., MULINACCI N., 2005 – *Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of Cichorium intybus L.* J. Agric. Food Chem., 53(16): 6497-6502.
- JIMENÉZ A.M., MARTÍNEZ-TOMÉ M., EGEA I., ROMOJARO E., MURCIA M.A., 2008 – *Effect of industrial processing and storage on antioxidant activity of apricot (Prunus armeniaca v. bulida)*. Eur. Food Res. Technol., 277: 125-134.
- LAKSHMINARAYANA R., RAJU M., KRISHNAKANTHA T.P., BASKARAN V., 2005 – *Determination of major carotenoids in a few Indian leafy vegetables by High-Performance Liquid Chromatography*. J. Agric. Food Chem., 53(8): 2838-2842.
- LATTANZIO V., RUGGIERO P., 2003 – *I composti fenolici di interesse biologico*. In "Biochimica Agraria": 631-692. Patron Editore, Bologna.
- MCKLOWN N., 1999 – *Antioxidants and breast cancer*. Nutr. Rev., 57(10): 321-324.
- MATÉS J.M., PÉREZ-GÓMEZ C., NÚÑEZ DE CASTRO I., 1999 – *Antioxidant enzymes and human disease*. Clin. Biochem., 32(8): 595-603.
- MÜLLER L., GNOYKE S., POPKEN A.M., BÖHM V., 2010 – *Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulation*. LWT Food Sci. Technol., 43: 992-999.
- NORBAECK R., NIELSEN K., KONDO T., 2002 – *Anthocyanins from flowers of Cichorium intybus*. Phytochemistry, 60(4): 357-359.
- PÉREZ-JIMÉNEZ J., ARRANZ S., TABERNERO M., DÍAZ-RUBIO M.E., SERRANO J., GOÑI I., SAURA-CALIXTO F., 2008 – *Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results*. Food Res. Int., 41: 274-285.
- PRENESTI E., BERTO S., DANIELE P.G., TOSO S., 2007 – *Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of Hibiscus sabdariffa flowers*. Food Chem., 100(2): 433-438.
- RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C., 1999 – *Antioxidant activity*

- applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 26: 1231-1237.
- RONCO A., DE STEFANI E., BOFFETTA P., DENEOPELLEGRINI H., MENDILAHARSU M., LEBORGNE F., 1999 – *Vegetables, fruits, and related nutrients and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay*. *Nutr. Cancer*, 35(2): 111-119.
- SANITÀ DI TOPPI L., VURRO E., DE BENEDICTIS M., FALASCA G., ZANELLA L., MUSETTI R., LENUCCI M.S., DALESSANDRO G., ALTAMURA M.M., 2012 – *A bifasic response to cadmium stress in carrot: early acclimatory mechanisms give way to root collapse further to prolonged metal exposure*. *Plant Physiol. Bioch.*, 58: 269-279.
- SHAH S., MAHMOOD A., SAIED S., MALIK A., 2012 – *Analysis and phytotoxicity of oily fraction of aerial parts of Cichorium intybus*. *J. Chem. Soc. Pakistan*, 66: 729.
- SLATTERY M.L., BENSON J., CURTIN K., MA K-N., SHAEFFER D., POTTER J.D., 2000 – *Carotenoids and colon cancer*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71(2): 575-582.
- TIMMERMANS J.W., SLAGHEK T.M., ILZUKA M., VAN DEN ENDE W., DE ROOVER J., VAN LAERE A., 2001 – *Isolation and structural analysis of new fructans produced by chicory*. *J. Carbohydr. Chem.*, 20(5): 375-395.
- TRICHOPOULOU A., 2001 – *Mediterranean diet: the past and the present*. *Nutr. Metab. Cardiovas.*, 11(4): 1-4.
- TRICHOPOULOU A., VASILOPOULOU E., HOLLMAN P., HOLLMAN P., CHAMALIDES CH., FOUFA E., KALOUDIS TR., KROMHOUT D., MISKAKI PH., PETROCHILOU I., POULIMA E., STAFILAKIS K., THEOPHILOU D., 2000 – *Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet*. *Food Chem.*, 70(3): 319-323.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.A., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A., 1964 – *Flora Europaea 1*: 297-299. Cambridge University Press.
- VAN DEN BERG H., FAULKS R., FERNANDO GRANADO H., HIRSCHBERG J., OLMEDILLA B., SANDMANN G., SOUTHON S., STAHL W., 2000 – *The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects*. *J. Sci. Food Agr.*, 80(7): 880-912.
- XU G., LIU D., CHEN J., YE X., MA Y., SHI J., 2008 – *Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China*. *Food Chem.*, 106: 545-551.
- ZHISHEN J., MENGCHENG T., JIANMING W., 1999 – *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. *Food Chem.*, 64: 555-559.
- ŽNIDARČIĆ D., BAN D., ŠIRCELJ H., 2011 – *Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries*. *Food Chem.*, 129: 1164-1168.

RIASSUNTO - In questo lavoro è stata valutata l'attività antiossidante e il contenuto di fenoli, flavonoidi, tocoferoli (tocoferoli e tocotrienoli) e carotenoidi in alcune varietà di cicoria e nelle "paparine" salentine. Sono state analizzate: (1) due varietà coltivate di cicoria, la catalogna raccolta nella zona tra S. Pietro Vernotico e Tutturano (BR) e la otrantina raccolta nella zona di Otranto (LE); (2) due ecotipi spontanei di cicoria, uno raccolto nella zona di S. Pietro Vernotico (BR) e un altro nella zona di Statte (TA); (3) la specie selvatica di *Papaver rhoeas* nota anche nel Salento come "paparina", raccolta nella zona di Sternatia (LE). È stato dimostrato che l'attività antiossidante idrosolubile è più elevata di quella liposolubile. Le "paparine" salentine presentano la più elevata attività antiossidante e il più elevato contenuto in fenoli totali e in flavonoidi. Tra i carotenoidi estratti, la luteina e il β -carotene sono risultati essere quelli maggiormente presenti in tutti i campioni analizzati. Il contenuto di carotenoidi è maggiore nelle specie spontanee rispetto a quelle coltivate.

AUTORI

Anna Montefusco (anna.montefusco@unisalento.it), Giuliana Semitaio (giulysemitaio@libero.it), Gabriella Piro (gabriella.piro@unisalento.it), Marcello Salvatore Lenucci (marcello.lenucci@unisalento.it), Di.S.Te.B.A., Università del Salento, Via Provinciale Lecce-Monteroni, 73100 Lecce

Analisi di alcuni parametri nutrizionali in turioni di asparagi verdi (*Asparagus officinalis*)

P. TANZARELLA, C. PACIOLLA, L. MASTROPASQUA

ABSTRACT - *Analysis of some nutritional parameters in green asparagus spears (Asparagus officinalis)* - Lack of chemical and physical treatments post-harvest in green asparagus causes physiological and morphological changes after packaging and during storage. Our aim was to monitor some nutritional parameters in the apical and basal portions of spear of the edible part (corresponding to 15 cm). After 9 days in the dark at 4 °C, there is an huge and slight decrease in ascorbate total content and soluble sugars, respectively. Total chlorophyll and carotenoid levels decrease but the anthocyanins content not changes. Higher lignin level is mostly present in apical than basal portion.

Key words: *Asparagus officinalis*, storage

INTRODUZIONE

Il maggior apporto di fibre nell'alimentazione si realizza con l'introduzione, nella dieta, di vegetali freschi con basso contenuto calorico e alte qualità nutraceutiche. L'asparago verde (*Asparagus officinalis* L.) è uno degli ortaggi più apprezzati non solo dal punto di vista culinario ma anche per le sue proprietà dietetiche. L'asparago è coltivato in oltre 60 Paesi nel Mondo caratterizzati da clima variabile da temperato freddo a tropicale. In Europa la sua coltivazione è realizzata su circa 61.000 ettari di cui però il 75 % destinati alla coltivazione dell'asparago bianco e il 25 % destinato alla produzione di turioni verdi. Secondo le stime della FAO, l'Italia occupa il terzo posto nella classifica dei produttori europei di asparagi, dopo la Germania e la Spagna, con 41.100 tonnellate di asparagi coltivati su circa 6.400 ettari distribuiti principalmente tra le regioni della Campania, Veneto ed Emilia Romagna (Dati FAO 2011). In risposta anche alle esigenze dei consumatori che richiedono un prodotto il più possibile genuino, gli asparagi sono sottoposti a una manipolazione minima dopo la raccolta: lavaggio, taglio e confezionamento in film plastico. L'assenza di un qualsiasi trattamento chimico o fisico fa sì che questi tessuti vegetali MPV (*minimally processed vegetables*) siano ancora metabolicamente e fisiologicamente attivi durante la conservazione e la vendita. Ciò comporta una rapida deperibilità del prodotto e conseguentemente un breve periodo di commercializzazione (*shelf-life*). Diversi studi sono stati condotti per verificare l'idoneità della metodica di lavorazione e le cause di una

così breve *shelf-life*, sia per gli asparagi bianchi che per quelli verdi (SIOMOS *et al.*, 2000, 2001; SCHEER *et al.*, 2003; ALBANESE *et al.*, 2007). I cambiamenti che si verificano durante lo stoccaggio post-raccolta riguardano diversi aspetti. La perdita di acqua favorisce la comparsa di striature lungo i giovani fusti, si verifica la perdita del colore verde brillante, la perdita di zuccheri, vitamine, sapore e aroma (KING *et al.*, 1987). Un altro evento che interessa questi ortaggi durante il periodo di conservazione e ne diminuisce il valore di mercato è il progressivo indurimento dei turioni, associato al processo di lignificazione (SHARMA, WOLFE, 1975). Considerando l'anatomia dei giovani fusti di asparago, il processo di lignificazione interessa sia i fasci cribro-vascolari, che la fascia sclerenchimatosa che circonda il cilindro centrale. Il processo d'indurimento delle punte è una conseguenza del naturale sviluppo della parete secondaria e della sua lignificazione (WALDRON *et al.*, 2003), prerogativa di elementi istologici come i vasi e le fibre. Per tutelare il consumatore durante l'acquisto, sono state varate dalla CE norme di qualità che classificano i turioni di asparago bianco e verde in base al colore, alla lunghezza e diametro; ad esempio, nelle così dette 'punte di asparago' la lunghezza dei turioni non deve superare i dodici centimetri. L'obiettivo di questo lavoro è stato, pertanto, quello di determinare alcuni parametri nutrizionali nell'apice e nella base del turione di asparagi verdi e controllarne, durante la conservazione al buio, le eventuali variazioni.

MATERIALI E METODI

Turioni di *Asparagus officinalis* L., categoria I, di calibro 10/16, acquistati presso il locale mercato, sono stati omogeneamente scelti in base allo spessore, lunghezza e colore e sono stati utilizzati per le varie analisi. Considerando la parte edule dell'asparago, corrispondente ai primi 15 cm circa del giovane germoglio, sono state prelevate due porzioni: parte apicale (3.5 cm) e parte basale (3 cm). Al tempo zero, per ogni porzione, sono stati determinati: peso fresco e secco, contenuto di amido e zuccheri solubili, contenuto di acido ascorbico e lignina, contenuto in pigmenti quali clorofille, carotenoidi e antociani. Lotti di turioni sono poi stati conservati al buio a 4 °C e processati dopo 3, 6 e 9 giorni, ripetendo sulla parte apicale e basale le stesse analisi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli asparagi freschi cominciano a deteriorarsi dopo poche ore dalla raccolta. I cambiamenti fisiologici e della componente nutritiva riducono le qualità organolettiche dei turioni. I segmenti di asparago, sia la parte apicale che la parte basale, hanno un elevato contenuto di H₂O e a parità di peso fresco la porzione basale ha un peso secco di quasi il 50% inferiore a quello della parte apicale (Tab.1). Il contenuto di acido ascorbico (AsA) è notevolmente più alto nella parte apicale rispetto a quella basale, la stessa cosa si verifica per la lignina e gli antociani. Gli zuccheri solubili D-glucosio, D-fruttosio e saccarosio sono maggiormente concentrati nella parte basale del turione, in accordo con uno studio di BENKEBLIA *et al.* (2008) dove, in asparagi verdi, dopo la raccolta, è stato riscontrato un gradiente di distribuzione lungo

TABELLA 1

Dati nutrizionali al tempo zero di segmenti apicali e basali di turioni di asparagi verdi (*Asparagus officinalis* L.).
Nutritional data of apical and basal segments of green asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.) at time zero.

	Segmento apicale	Segmento basale
Peso secco (mg · g ⁻¹ PF)	110 ± 3.3	58 ± 2,35
Amido (mg · g ⁻¹ PF)	0,13 ± 0,02	0,64 ± 0,08
Zuccheri solubili (mg · g ⁻¹ PF)	2,81 ± 0,50	16,98 ± 0,70
AsA totale (µg · g ⁻¹ PF)	300 ± 24,00	16 ± 0,96
Chl totale (µg · g ⁻¹ PF)	120 ± 12,02	48 ± 2,05
Carotenoidi (µg · g ⁻¹ PF)	50 ± 3,50	30 ± 1,00
Antociani (Abs · g ⁻¹ PF)	0,38 ± 0,05	0,04 ± 0,08
Lignina (mg · g ⁻¹ PS)	2,17 ± 0,05	1,25 ± 0,08

il turione dal basso verso l'alto, insieme ad un'attività dell'enzima invertasi maggiore verso l'apice e minore alla base. Questi dati sono stati correlati ad un intenso metabolismo della parte apicale che è anche sede di crescita per distensione. Al buio, dopo 9 giorni, si osserva una diminuzione del contenuto dei tre zuccheri nella parte basale ed un incremento nell'apice, in accordo con una mobilitazione degli esosi verso l'apice in virtù di una richiesta metabolica. Come mostrato in Tab. 2 il contenuto di amido aumenta significativamente nel segmento basale e in quello apicale. L'aumento di amido anche al buio è suffragato da quanto riportato per le foglie di cavolo cinese in cui, dopo 10 giorni, si continua ad osservare un incremento nel contenuto di questo polisaccaride in concomitanza con un costante valore del contenuto di glucosio, fruttosio e saccarosio (NOICHINDA *et al.*, 2007). Il contenuto di AsA, nei tessuti vegetali, risulta essere correlato, oltre che a numerose attività metaboliche, alla presenza di luce. Quantità e qualità della luce possono influenzare la sua sintesi (MASTROPASQUA *et al.*, 2012) e negli asparagi verdi mantenuti al buio l'AsA subisce un forte decremento. Uno degli aspetti sensoriali che viene maggiormente compromesso dalla breve *shelf-life* degli asparagi è la perdita del colore verde brillante dovuto alla diminuzione della clorofilla. Dopo 9 giorni al buio, mentre carotenoidi e soprattutto clorofilla diminuiscono, il contenuto di antociani risulta invariato. Un altro fattore importante nel determinare la qualità degli asparagi, poiché ne diminuisce il valore di mer-

TABELLA 2

Dati nutrizionali di segmenti apicali e basali di turioni di asparagi verdi (*Asparagus officinalis* L.) dopo 9 giorni di conservazione al buio.

Nutritional data of apical and basal segments of green asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.) after 9 days of storage in the dark.

	Segmento apicale dopo 9 giorni	Segmento basale dopo 9 giorni
Peso secco (mg · g ⁻¹ di PF)	114 ± 9,15	48 ± 1,23
Amido (mg · g ⁻¹ di PF)	0,72 ± 0,04	1,87 ± 0,15
Zuccheri solubili (mg · g ⁻¹ di PF)	7,44 ± 0,40	9,67 ± 0,30
AsA totale (µg · g ⁻¹ di PF)	54,3 ± 6,00	2,57 ± 0,60
Chl totale (µg · g ⁻¹ di PF)	38,9 ± 0,80	14,32 ± 1,00
Carotenoidi (µg · g ⁻¹ di PF)	26,7 ± 0,60	11,0 ± 1,00
Antociani (Abs · g ⁻¹ di PF)	0,29 ± 0,05	0,04 ± 0,01
Lignina (mg · g ⁻¹ di PS)	3,78 ± 0,45	1,08 ± 0,12

cato, è il grado di lignificazione.

La consistenza (*texture*) legnosa nei turioni è determinata da una serie di proprietà meccaniche che sono dovute ai componenti della parete cellulare (RODRIGUEZ *et al.*, 2006) e i dati ottenuti mettono in evidenza come l'aumento nel contenuto di lignina al buio si verifichi principalmente nella parte apicale dove sono presenti brattee fogliari molto vascolarizzate. In asparagi verdi, quindi, l'analisi di alcuni parametri nutrizionali ha messo in evidenza differenze significative tra porzione apicale e porzione basale; la condizione di stoccaggio al buio, pur preservando l'aspetto del prodotto, non è sufficiente a mantenere invariate alcune componenti organolettiche importanti dal punto di vista nutrizionale.

LETTERATURA CITATA

- ALBANESE D., RUSSO L., CINQUANTA L., BRASIELLO A., DI MATTEO M., 2007 – *Physical and chemical changes in minimally processed green asparagus during cold-storage*. Food Chemistry, 101: 274-280.
- BENKEBLIA N., YOSHIDA N., OOI Y., NAGAMINE T., ONODERA S., SHIOMI N., 2008 – *Variations of carbohydrate content and invertase activity in green and white asparagus spears. Effects of spears length and portion*. Acta Hort. (ISHS), 776: 459-464.
- KING G.A., HENDERSON K.G., LILL R.E., 1987 – *Sensory analysis of stored asparagus*. Scientia Horticulture, 31(1-2): 11-16.
- MASTROPASQUA L., BORRACCINO G., BIANCO L., PACIOLLA C., 2012 – *Light qualities and dose influence ascorbate pool size in detached oat leaves*. Plant Science, 183: 57-64.
- NOICHINDA S., BODHIPADMA K., MAHAMONTRI C., NARONGRUK T., KETSA S., 2007 – *Light during storage prevents loss of ascorbic acid, and increases glucose and fructose levels in Chinese kale (Brassica oleracea var. alboglabra)*. Postharvest Biol. Technol., 44: 312-315.
- RODRÍGUEZ R., JIMÉNEZ A., FERNANDEZ-BOLAÑOS J., GUILLÉN R., HEREDIA A., 2006 – *Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients*. Trends Food Sci. Technol., 17: 3-15.
- SCHEER CH., SCHONHOF I., BRUCKNER B., SCHREINER M., 2003 – *Influence of a short-term storage on quality determining product characteristics of white prepared asparagus*. Acta Hort., 604: 437-441.
- SHARMA S.C., WOLFE R.R., 1975 – *Evaluation of methods for measuring asparagus texture*. J. Food Sci., 5: 1021-1024.
- SIOMOS A.S., DOGRAS C., SFAKIOTAKIS E., 2000 – *Modified atmosphere packaging of white asparagus spears: composition, colour and textural quality response to temperature and light*. Sci. Hortic., 84: 1-13.
- , 2001 – *Color development in harvest white asparagus spears in relation to carbon dioxide and oxygen concentration*. Postharvest Biol. Technol., 23: 209-14.
- WALDRON K.W., PARKER M.L., SMITH A.C., 2003 – *Plant cell walls and food quality*. Comprehensive Rev. Food Sci. Safety, 4(2): 101-119.

RIASSUNTO - In asparagi verdi, l'assenza di trattamenti chimici e/o fisici post-raccolta fa sì che cambiamenti fisiologici e morfologici si verifichino anche dopo l'impacchettamento e durante la loro conservazione. Scopo dello studio è stato quello di monitorare le variazioni di alcune sostanze nutritive e mettere in rilievo le differenze esistenti fra la parte apicale e quella basale dei primi 15 cm del turione corrispondenti alla parte commestibile. Dopo 9 giorni di conservazione al buio a 4 °C ciò che cala bruscamente è il contenuto di acido ascorbico totale, mentre il contenuto in zuccheri solubili subisce un minor decremento. Il livello di clorofilla totale e dei carotenoidi diminuisce, mentre il contenuto di antociani rimane costante. Un aumento del contenuto di lignina si riscontra soprattutto nella parte apicale del turione.

AUTORI

Paola Tanzarella, Costantino Paciolla, Linda Mastropasqua, Dipartimento di Biologia, Università di Bari Aldo Moro, Via E. Orabona 4, 70125 Bari

Studio fitochimico di specie della tradizione mediterranea

M.P. ARGENTIERI, P. AVATO

ABSTRACT - Phytochemical study of Mediterranean traditional species - Plants of *Capparales* (or *Brassicales*) are widespread in the Mediterranean region where they are widely consumed cooked or as salad vegetables (cabbage, Brussels sprouts, cauliflower, broccoli) or as condiments (horseradish, mustard, capers). These plants are a good source of bioactive compounds such as glucosinolates, vitamins, flavonoids, minerals. Glucosinolates are responsible for pungent and bitter taste of *Brassicaceae* and are the most extensively studied bioactive compounds for their potential as anticarcinogens due to their hydrolysis products, the isothiocyanates. This study describes the chemical profile of a poorly studied variety of *Brassica oleracea*, traditionally cultivated in Southern Italy and locally called "mugnolo", and of *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*. It was found that "mugnolo" inflorescences are characterized by aliphatic, aromatic and indole glucosinolates. Among them the indole glucosinolates (7.68 $\mu\text{mol/g}$) are predominant, while aliphatic and aromatic glucosinolates are found in low quantities, 2.63 $\mu\text{mol/g}$ and 0.83 $\mu\text{mol/g}$ respectively. Chemical composition of seeds and aerial parts of *C. spinosa* subsp. *rupestris* was also determined. It was found that the principal glucosinolate of the seeds is the glucocapparin, moreover the seeds oil is rich in unsaturated and rare lipids such as *cis*-vaccenic acid. The aerial parts are characterized by rutin as predominant flavonoid.

Key words: caper, glucosinolates, mugnolo, metabolic profile

INTRODUZIONE

In questo lavoro vengono presentati i risultati ottenuti dallo studio fitochimico di due specie della tradizione mediterranea, *Brassica oleracea* var. *italica* (mugnolo) e *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* (cappero), mai studiate prima dal punto di vista del profilo metabolico, al fine di individuare molecole bioattive caratterizzanti le specie.

Il capero ed il mugnolo appartengono alla famiglia delle *Capparaceae* e delle *Brassicaceae* rispettivamente, ovvero alle due più grandi famiglie dell'ordine delle *Brassicales* (o *Capparales*) con circa 45 generi ed 800 specie le *Capparaceae* e 338 generi e 3700 specie le *Brassicaceae*. Specie appartenenti a queste famiglie ricoprono un ruolo importante nella dieta Mediterranea, infatti spesso vengono consumate cotte o come insalata (cavolo, cavolfiore, ravanello, rucola) o come condimento (mostarde e capperi) (FENWICK *et al.*, 1992).

Le *Brassicaceae* e le *Capparaceae*, diverse da un punto di vista morfologico, sono invece simili da un punto di vista fitochimico. Alcune specie appartenenti a queste famiglie, infatti, sintetizzano glucosinolati (GLS) che rappresentano i metaboliti secondari più

studiati delle *Brassicales*, e sono i responsabili del caratteristico odore e sapore pungente.

I GLS sono composti solforati di natura aminoacidica. Sono noti più di 120 GLS e tutti possiedono una struttura chimica comune in cui si riconosce un residuo glucosidico legato mediante ad un atomo di zolfo ad un estere idrossimmino solfato. La catena laterale (R) di natura aminoacidica permette di classificare i GLS in aromatici, alifatici ed indolici (FAHEY *et al.*, 2001) (Fig. 1).

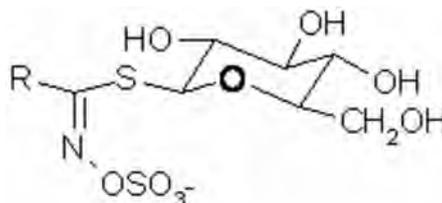


Fig. 1
Struttura dei GLS.
GLS chemical structure.

Questi metaboliti sono presenti in tutti gli organi della pianta e coesistono con un enzima endogeno, la mirosinasi, responsabile della loro idrolisi. In seguito a danneggiamento tissutale, l'enzima compartimentalizzato nel citoplasma entra in contatto con i GLS contenuti nel vacuolo con conseguente produzione di numerosi prodotti di idrolisi (quali per esempio nitrili, tiocianati ed isotiocianati) la cui formazione dipende da diversi fattori (pH, presenza di cofattori, proteine o ioni). Tra i prodotti di idrolisi, gli isotiocianati sono quelli che hanno attratto maggiormente l'attenzione del mondo scientifico in quanto presentano numerose proprietà biologiche (antitumorale, nematocida, antibatterica) (CARTEA *et al.*, 2008; JEFFERY *et al.*, 2009). Data l'importanza dei GLS e/o dei loro prodotti di idrolisi, sono tante le specie di *Brassicaceae* e *Capparaceae* studiate, ma non risultano lavori relativi al profilo metabolico del mugnolo e della *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*, due specie della tradizione mediterranea ed oggetto del nostro studio. In particolare il mugnolo è una varietà di *Brassica oleracea* da sempre coltivata nel Salento solo per uso domestico, pertanto è del tutto sconosciuto nel resto della Puglia così come in tutta Italia. Il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali ha inserito il mugnolo tra i prodotti agroalimentari della tradizione pugliese. La Regione Puglia, invece, all'interno del suo P.S.R. (Piano di Sviluppo Rurale) 2007-2013, ha inserito il mugnolo nell'allegato 8 della Misura 214-Azione 3 "Tutela della Biodiversità" come specie a rischio di estinzione genetica.

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale

Il mugnolo utilizzato per le analisi è stato fornito dall'Orto Botanico del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università del Salento. Un campione (NoBO1) è conservato presso il laboratorio di Fitochimica del Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Università di Bari "Aldo Moro". Le piante di *C. spinosa* subsp. *rupestris* sono state ottenute dal Museo Orto Botanico dell'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro".

Estrazione e purificazione dei GLS

L'estrazione dei GLS dalle infiorescenze del mugnolo e dai semi e parti aeree del cappero è stata condotta secondo la procedura riportata dal protocollo ISO (ISO Method 9167-1, 1992). In particolare il materiale vegetale è stato estratto per 4 minuti con un volume di MeOH_{aq} al 70% pari a tre volte il peso del campione. L'estratto ottenuto è stato poi purificato mediante colonnine cromatografiche (0.8 x 4 cm) impaccate con una resina a scambio anionico (DEAE-Sephadex A-25), e trattato per circa 12 h con l'enzima solfatasi. Trascorso questo periodo di incubazione i GLS sono stati fatti eluire nella loro forma desolfatata (DGLS).

Estrazione dell'olio

I semi di cappero sono stati estratti in Soxhlet per 3 ore (circa 20 cicli) con etere di petrolio. L'olio è stato

poi sottoposto a reazione di tert-butilazione e successivamente analizzato in gas cromatografia (ARGENTIERI *et al.*, 2012).

Analisi dei GLS

I GLS sono stati caratterizzati mediante analisi cromatografiche HPLC utilizzando uno strumento WATERS HPLC System munito di un Photodiode Array Detector (Waters 2998). I risultati sono stati processati mediante il software Empower2. La colonna utilizzata è la Supelcosil LC-ABZ (C18; 250 x 4 mm, 5 µm). La fase mobile è costituita da acqua e metanolo; al flusso di 1 ml/min, in gradiente si è passati dal 1.5% al 100% di metanolo in 57 min.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati HPLC (Fig. 2), dimostrano che le infiorescenze del mugnolo sono caratterizzate da una miscela complessa di GLS costituita da GLS alifatici (glucorafanina, glucoiberina e sinigrina), aromatici (glucobarberina e gluconasturtina) ed indolici (glucobrassicina, neoglucobrassicina, idrossiglucobrassicina e metossiglucobrassicina). In particolare è stato osservato che i GLS predominanti nelle infiorescenze sono gli indolici (7.68 µmol/g) seguiti dagli alifatici (2.63 µmol/g) e dagli aromatici (0.83 µmol/g).

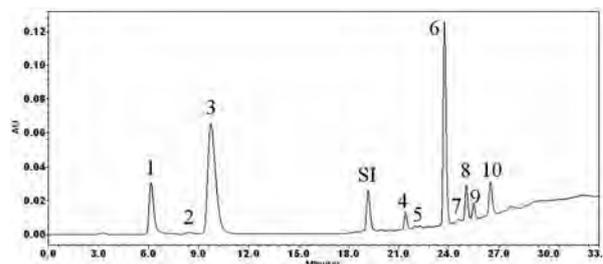


Fig. 2

Cromatogramma HPLC delle infiorescenze del mugnolo. 1 Glucoiberina; 2 Sinigrina; 3 Glucorafanina; 4 Idrossiglucobrassicina; 5 Glucoerucina; 6 Glucobrassicina; 7 Metossiglucobrassicina; 8 Neoglucobrassicina; 9 Glucunasturtina; 10 Glucobarberina.

HPLC chromatogram of mugnolo inflorescences. 1 Glucoiberin; 2 Sinigrin; 3 Glucoraphanin; 4 Hydroxyglucobrassicin; 5 Glucoerucin; 6 Glucobrassicin; 7 Methoxyglucobrassicin; 8 Neoglucobrassicin; 9 Glucunasturtin; 10 Glucobarberin.

Molta della letteratura relativa al contenuto di GLS, fa riferimento al materiale fresco (crudo) e questo ha una limitata rilevanza dato che la maggior parte delle *Brassicaceae*, compreso il mugnolo, vengono consumate cotte. Quindi, data l'importanza biologica dei GLS e dei loro prodotti di idrolisi, in questo lavoro è stato studiato anche l'effetto della cottura sul contenuto in GLS del mugnolo. I risultati dimostrano che la cottura riduce il contenuto in GLS di circa il 50% in accordo con quanto riportato in letteratura per i broccoli che invece subiscono una riduzione del 18-

59% a secondo del metodo di cottura (DEKKER *et al.*, 2000; VALLEJO *et al.*, 2002). Per quanto riguarda il mugnolo, inoltre, i GLS indolici sono quelli che risentono maggiormente della cottura subendo una riduzione di circa il 61.5%; in particolare la glucobrassicina si riduce dell'82.7%. Nonostante la cottura, nelle infiorescenze gli indolici continuano ad essere i GLS predominanti (2.96 $\mu\text{mol/g}$) seguiti dagli alifatici (2.12 $\mu\text{mol/g}$) e dagli aromatici (0.59 $\mu\text{mol/g}$).

Se si considera il profilo metabolico delle infiorescenze dopo la cottura, si può osservare che la glucorafanina rappresenta il 75% del contenuto totale dei GLS alifatici, mentre la glucobrassicina rappresenta il 66% del totale degli indolici (ARGENTIERI *et al.*, 2011). Questi dati sono di notevole interesse se si pensa all'importanza che hanno i rispettivi prodotti di idrolisi. Infatti il sulforafano (prodotto di idrolisi della glucorafanina) provoca l'induzione degli enzimi di detossificazione della fase 2 del processo di carcinogenesi, mentre l'indolo-3-carbinolo è un induttore degli enzimi di fase 1 e 2 (Tab. 1).

TABELLA 1

GLS nelle infiorescenze crude e cotte del mugnolo.
GLS in raw and cooked inflorescences of mugnolo.

	GLS	Crude ($\mu\text{mol/g}$)	Cotte ($\mu\text{mol/g}$)
Alifatici	Glucorafanina	1.79	1.59
	Glucoerucina	0.03	0.04
	Glucobrassicina	0.77	0.46
	Sinigrina	0.04	0.03
Aromatici	Glucobarberina	0.56	0.07
	Gluconasturtina	0.27	0.03
Indolici	Glucobrassicina	3.51	1.95
	Neoglucobrassicina	3.13	0.54
	Metossiglucobrassicina	0.07	0.05
	Idrossiglucobrassicina	0.97	0.42
TOT		11.14	5.67

L'altra specie della tradizione mediterranea oggetto di studio è stata *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*. Essendoci una relazione botanica con la famiglia delle *Brassicaceae*, anche in questo caso sono stati studiati i GLS. L'analisi HPLC-DAD ha messo in evidenza che i semi e le foglie sono caratterizzati da un solo GLS identificato come glucocapparina molto più abbondante nei semi rispetto alle foglie.

Lo studio della subsp. *rupestris* è stato completato anche con le analisi dell'estratto metanolico delle foglie il quale è risultato essere caratterizzato dalla presenza di due flavonoidi, la rutina ed il kaempferolo.

È stato analizzato anche l'olio estratto dai semi che si è mostrato essere ricco dell'acido grasso raro *cis*-vaccenico oltre al più comune acido oleico ed altri acidi grassi quali l'acido laurico, miristico, palmitico, stearico e linoleico (ARGENTIERI *et al.*, 2012) (Tab. 2).

TABELLA 2

Composizione in acidi grassi dell'olio di semi di cappero.
Composition in fatty acids of the seeds oil of caper.

Ac. grassi	%
Laurico	0.36
Miristico	0.68
Palmitico	14.46
Palmitoleico	4.23
Stearico	9.31
Oleico	26.11
<i>Cis</i> -Vaccenico	12.28
Linoleico	28.02
Linolenico	0.84
Resa %	96.29

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti consentono di dire che sia il mugnolo che *C. spinosa* subsp. *rupestris* sono una ricca fonte di composti attivi di interesse salutistico come appunto gli acidi grassi essenziali o la rutina che ha una rilevante e comprovata attività antiossidante. Numerosi sono anche i prodotti a valenza salutistica a base di sulforafano ed altri GLS ad attività preventiva anticarcinogenica.

LETTERATURA CITATA

- ARGENTIERI M.P., ACCOGLI R., FANIZZI F.P., AVATO P., 2011 – *Glucosinolates profile of "mugnolo", a variety of Brassica oleracea L. native to Southern Italy (Salento)*. *Planta Med.*, 77(3): 287-292.
- ARGENTIERI M.P., MACCHIA F., PAPADIA P., FANIZZI F.P., AVATO P., 2012 – *Bioactive compounds from Capparis spinosa subsp rupestris*. *Ind. Crop Prod.*, 36: 65-69.
- CARTEA M.E., VELASCO P., 2008 – *Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health*. *Phytochem. Rev.*, 7: 213-229.
- DEKKER M., VERKERK R., JONGEN M.F., 2000 – *Predictive modelling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates in cabbage*. *Trends Food Sci. Technol.*, 11: 174-181.
- FAHEY J.W., ZALCMANN A.T., TALALAY P., 2001 – *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*. *Phytochemistry*, 56: 5-51.
- FENWICK G.R., HEANEY R.K., MULLIN W.J., 1992 – *Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants*. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18: 123-201.
- ISO METHOD, 1992 – *Rapeseed-determination of glucosinolates content. Part 1. Method using high performance liquid chromatography*. Reference number ISO 9167-1.
- JEFFERY E.H., ARAYA M., 2009 – *Physiological effects of broccoli consumption*. *Phytochem. Rev.*, 8: 283-298.
- VALLEJO F., TOMÁS-BARBERÀ F.A., GARCÍA-VIGUERA C., 2002 – *Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking*. *Eur. Food Res. Technol.*, 215: 310-316.

RIASSUNTO – Piante dell'ordine delle *Capparales* (o *Brassicales*) sono ampiamente diffuse nelle regioni Mediterranee dove sono abbondantemente consumate cotte o nelle insalate (cavolfiori, broccoli, ravanelli, rucola, cavoletti di Brussell) o come condimento (mostarde, capperi). Esse sono una fonte molto ricca di sostanze

bioattive come flavonoidi, vitamine, minerali e glucosinolati i quali sono responsabili del caratteristico odore e sapore pungente. I glucosinolati sono i metaboliti più studiati delle *Brassicaceae* per le proprietà anticarcinogeniche manifestate soprattutto dagli isotiocianati ovvero i loro prodotti di idrolisi. In questo lavoro ci siamo occupati dello studio fitochimico del mugnolo, una varietà di *Brassica oleracea* coltivata solo per uso domestico. L'altra specie oggetto di studio è stata la *Capparis spinosa* subsp *rupestris* (cappero) molto diffusa nel bacino del Mediterraneo. Entrambe queste specie, mai state studiate prima dal punto di vista fitochimico, sono state oggetto del nostro lavoro al fine di individuare composti bioattivi

caratterizzanti le specie. In particolare è stato osservato che le infiorescenze del "mugnolo" sono caratterizzate da GLS alifatici, aromatici ed indolici. Questi ultimi risultano essere i più abbondanti (7.68 $\mu\text{mol/g}$) seguiti dagli alifatici (2.63 $\mu\text{mol/g}$) e dagli aromatici (0.83 $\mu\text{mol/g}$). In questo lavoro è stata determinata anche la composizione chimica dei semi e delle parti aeree della *C. spinosa* subsp *rupestris* ed è stato osservato che i semi così come le parti aeree sono caratterizzati da un solo GLS, la glucocapparina. Inoltre l'olio estratto dai semi è ricco di acidi grassi insaturi rari come il *cis*-vaccenico. Nelle parti aeree la rutina rappresenta il flavonoide predominante.

AUTORI

Maria Pia Argentieri, Pinarosa Avato, Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Università di Bari "Aldo Moro", Via Orabona 4, 70125 Bari

Note preliminari sull'effetto della somministrazione di Cerio in *Lemna minor*

M.A. ZICARI, A. PARADISO, F. TOMMASI

ABSTRACT - Preliminary note on effect of Cerium administration in *Lemna minor* - This study aimed at investigating the effects of Ce^{3+} on the growth of duckweed (*Lemna minor* L.) plants as a test system (ISO 20079). *L. minor* plants were treated with 0,0025, 0,005, 0,010, 0,020, 1 mM $Ce(NO_3)_3$ or $Ca(NO_3)_2$ 1 mM over a 15 day period. The influence of Ce^{3+} was evaluated according to the ISO 20079 test protocol on the basis of growth parameters as relative growth rate (RGR) expressed as frond number and relative frond number (RFN). Compared with the control, concentrations of Ce^{3+} lower than 1 mM did not affect significantly the growth parameters. On the contrary, 1 mM $Ce(NO_3)_3$ negatively affected the growth from 7 days to 15 days, whereas 1 mM $Ca(NO_3)_2$ stimulated duckweed leaf growth. Data here reported showed toxic effect of Ce^{3+} at millimolar concentrations and suggested that *L. minor* could be a species useful for Ce^{3+} presence biomonitoring in aquatic environment.

Key words: antiossidanti, risposte di crescita, terre rare, test di tossicità

INTRODUZIONE

Con il termine “terre rare” o lantanidi si indicano gli elementi chimici compresi nella Tavola Periodica fra il Lantanio ed il Lutezio inclusi l'Ittrio e lo Scandio, i quali manifestano comuni proprietà chimiche connesse ad una simile configurazione elettronica esterna. Negli ultimi anni, i lantanidi sono stati largamente impiegati in campo industriale, agricolo e zootecnico. In Cina, a partire dagli anni '80, vengono usati in agricoltura fertilizzanti costituiti da miscele di vari elementi, ma soprattutto Lantanio (La) e Cerio (Ce). L'uso intensivo e su larga scala di tali composti suscita crescenti preoccupazioni per la possibile contaminazione di suoli, ecosistemi acquatici e derrate alimentari dal momento che gli effetti di tali elementi sulla salute non sono ben chiari. La maggior parte dei dati presenti in letteratura riguarda la somministrazione di miscele di terre rare e di composti contenenti La a varie specie di vegetali. In alcune piante sono stati osservati effetti positivi tra i quali la promozione della germinazione dei semi, lo sviluppo di radici e germogli, la resistenza contro gli stress (IPPOLITO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2012), la fioritura, la produttività in campo (HU *et al.*, 2004). Altri studi, al contrario, evidenziano effetti nulli o addirittura inibitori di tali sostanze su colture di interesse agrario (NARDI *et al.*, 2005; D'AQUINO *et al.*, 2009). Una sintesi dei dati disponibili sugli effetti di La, Ce e miscele di terre rare in vari sistemi animali e vegetali è stata recentemente pubblicata (PAGANO *et al.*, 2012). I dati riportati riguardano crescita, sviluppo e indicazioni di tossicità in alcuni sistemi animali e vegetali. Numerosi dati, anche contrastanti, riguar-

dano gli effetti del Ce sia come pro-ossidante che come antiossidante. Dalla letteratura emerge l'esigenza di studi che determinino gli effetti dei singoli lantanidi sugli organismi animali e vegetali per valutarne la potenziale tossicità.

Scopo di questo lavoro è stato lo studio della somministrazione di Ce trivalente (Ce^{3+}) ad una specie modello, *Lemna minor* L., pianta acquatica già utilizzata per studi su lantanio e miscele di terre rare (IPPOLITO *et al.*, 2010) al fine di avere informazioni circa le soglie di tolleranza/tossicità di *L. minor* verso il Ce^{3+} . Tale specie, oltre che per il fitorimedio, è anche utilizzata, secondo la ISO 20079 (2004), nei test di biotossicità per l'ecosistema acquatico per alcune sue caratteristiche quali elevata velocità di crescita, propagazione vegetativa e ridotte dimensioni che la rendono adatta a studi eco- tossicologici.

MATERIALI E METODI

Piante di *L. minor* sono state coltivate in una soluzione di mantenimento (KNOP, 1865) a pH 4,4 per 15 giorni, in camera di crescita alla temperatura di 24 ± 2 °C con illuminazione a fluorescenza bianca con una intensità luminosa di $90 \mu E m^{-2} s^{-1}$ e fotoperiodo luce/buio di 14/10 h. In ogni cella di una piastra a pozzetti multipli sono state poste 10 fronde di *L. minor* in un volume di 2 ml di mezzo di crescita (testimone), a cui sono stati aggiunti nei trattati nitrato di cerio esaidrato ($CeN_3O_9 \cdot 6H_2O$) in concentrazioni finali di 2,5 - 5 - 10 - 20 μM e 1 mM oppure nitrato di calcio $Ca(NO_3)_2$ alla concentrazio-

ne finale di 1 mM. Per il testimone e per ogni trattamento sono stati allestiti 4 pozzetti. Le analisi sono state eseguite in cinque repliche. Le piastre sono state collocate in camera termostata e sono stati analizzati i seguenti parametri di crescita: tasso di crescita relativo (RGR), numero di fronde relativo (RFN), crescita di fronde in percentuale (FN). Le misurazioni sono state fatte ad intervalli di 24 ore nelle prove preliminari e in seguito si è stabilito di effettuare le analisi ogni 3, 5, 7, 12, 15 giorni, utilizzando uno stereoscopio per poter contare tutte le fronde visibili. Seguendo la ISO 20079, RGR è stato calcolato contando il numero di fronde per ogni concentrazione e applicando la seguente formula: $(\ln N_n - \ln N_0) / t_n$, dove N_0 è il numero iniziale di fronde, N_n è il numero finale di fronde, t_n è il tempo di durata dell'esperimento. RFN è stato calcolato usando la formula: $N_n - N_0 / N_0$. FN è stato calcolato come variazione percentuale del numero delle foglie rispetto al numero delle stesse all'inizio dell'esperimento, valore considerato pari al 100%. È stato periodicamente osservato l'aspetto delle fronde al fine di analizzare eventuali segni di clorosi e necrosi, utilizzando un microscopio ottico.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nei saggi eco-tossicologici RGR è considerato il più attendibile tra i parametri di crescita, in quanto, essendo basato sul conteggio delle fronde, è indipendente dalle dimensioni delle fronde stesse e dalla biomassa (RADIC *et al.*, 2010) e in condizioni di tossicità piccole gemme possono protrudere ed essere contate come singole fronde (MOHAN, HOSETTI 1999; NAUMANN *et al.*, 2007). RGR è inoltre considerato il parametro più sensibile per valutare la tossicità cronica (MACKENZIE *et al.*, 2003). I dati ottenuti dimostrano che in presenza di basse concentrazioni di Ce^{3+} (2,5-20 μM) si verifica una crescita maggiore rispetto al testimone di 12-15 giorni, anche se le variazioni di RGR, RFN (dati non mostrati) e FN (Fig. 1) non sono risultate statisticamente significative.

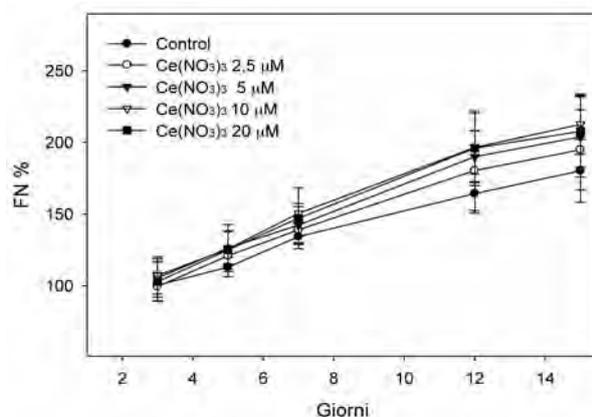


Fig. 1

Crescita di fronde in percentuale (FN) di *L. minor* in CeN_3O_9 da 2,5 μM a 20 μM in 15 giorni. FN in *L. minor* on CeN_3O_9 from 2,5 μM to 20 μM for 15 days.

Quindi i trattamenti a concentrazioni micromolari di Ce non interferiscono con la normale crescita della pianta che, inoltre, non presenta alterazioni morfologiche evidenti.

Per verificare la soglia di tossicità del Ce, le piante di *L. minor* sono state coltivate per 15 giorni in soluzione nutritiva arricchita di nitrato di cerio esaidrato a concentrazione finale 1 mM. Per escludere i possibili effetti del nitrato alcuni campioni sono stati coltivati con nitrato di calcio, alla stessa concentrazione finale di 1 mM, in sostituzione del nitrato di cerio.

Dopo 7 giorni di trattamento con Ce^{3+} si osserva una significativa diminuzione dei parametri di crescita analizzati rispetto al testimone. RGR, in particolare, diminuisce del 60% e dell'80% rispettivamente dopo 7 e 15 giorni (Fig. 2 A).

Un andamento simile si ha per FN, dalla cui analisi si osserva l'inibizione di crescita delle foglie del 19% al settimo giorno e del 50% al quindicesimo giorno rispetto al testimone (Fig. 2 B). Inoltre, le foglie cresciute a concentrazione di Ce^{3+} 1 mM appaiono bru-

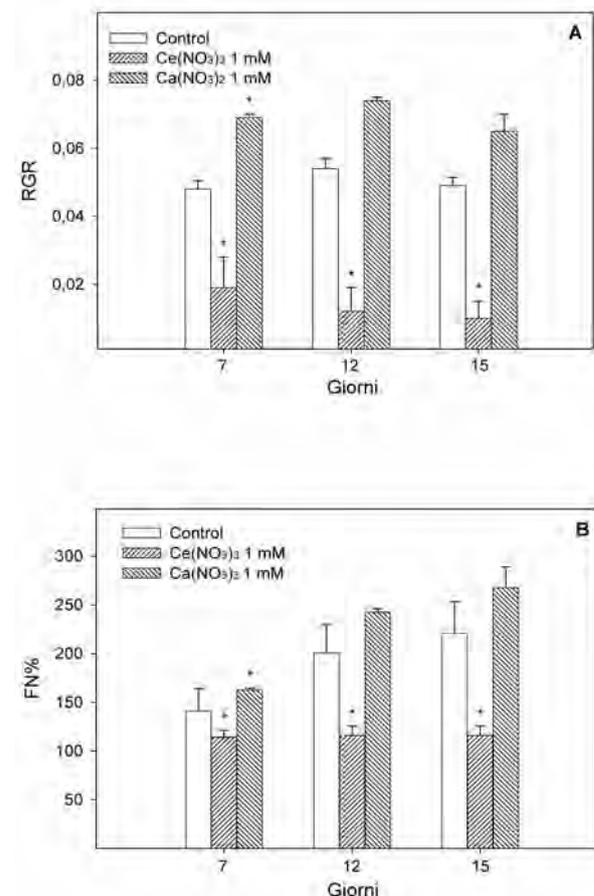


Fig. 2

A) RGR. B) FN in *Lemna minor* L. esposta per 15 giorni a trattamenti 1 mM di Ce^{3+} e Ca^{2+} .

* $P < 0,05$ secondo il t-student.

A) Relative growth rate based on frond number. B) growth of leaves % in *Lemna minor* L. exposed for 15 days to treatments 1 mM Ce^{3+} and Ca^{2+} .

* $P < 0,05$ for significant differences between treatments and control, according to t-student.

nastre con aree necrotiche e clorotiche. Un analogo andamento si osserva per RFN (dato non mostrato). Pertanto il Ce^{3+} 1 mM influenza negativamente la crescita e mostra effetti tossici. Al contrario le fronde di *L. minor* fatte crescere in presenza di $Ca(NO_3)_2$ alla concentrazione finale di 1 mM mostrano un aumento della crescita, rispetto al testimone, per tutti i tempi di analisi, ma con una differenza significativa a partire dal settimo giorno (Fig. 2 A, 2 B). Il trattamento con nitrato di Ce, quindi, a differenza di quello con nitrato di calcio, mostra un effetto negativo sulla crescita di piante di lenticchia d'acqua. L'inibizione della crescita può essere dovuta all'accumulo di Ce^{3+} analogamente a quanto descritto per i metalli che, a concentrazioni tossiche, inibiscono l'allungamento e l'espansione cellulare (POSCHENRIEDER, BARCELÒ, 2004; SRIVASTAVA *et al.*, 2006) oppure all'interferenza con l'assunzione di altri elementi nutritivi. Infatti è stato riportato che in piantine di riso il Ce^{3+} interferisce con l'accumulo di ferro, potassio, magnesio, calcio, sodio e di altri elementi minerali nutritivi (LIU *et al.*, 2012). Ulteriori studi sono necessari per valutare se e in quali tessuti il Ce^{3+} venga accumulato e l'effetto dello stesso su altri parametri quali i sistemi antiossidanti, i livelli di specie reattive dell'ossigeno ed il danno ossidativo. In conclusione *L. minor* si mostra tollerante all'esposizione a concentrazioni micromolari di Ce^{3+} , ma non a concentrazioni più elevate e pertanto potrebbe essere una specie utile per il biomonitoraggio della presenza di Ce^{3+} in ambienti acquatici.

LETTERATURA CITATA

- D'AQUINO L., DE PINTO M.C., NARDI L., MORGANA M., TOMMASI F., 2009 – *Effect of some light rare earth elements on seed germination, seedling growth and antioxidant metabolism in Triticum durum*. Chemosphere, 75: 900-905.
- HU Z., RICHTER H., SPAROVEK G., SCHNUG E., 2004 – *Physiological and biochemical effect of rare earth elements on plants and their agricultural significance: a review*. J. Plant Nutr., 27: 183-220.
- IPPOLITO M.P., FASCIANO C., D'AQUINO L., MORGANA M., TOMMASI F., 2010 – *Responses of antioxidant systems after exposition to rare earths and their role in chilling stress in common duckweed (Lemna minor L.): a defensive weapon or a boomerang?* Arch. Environ. Contam. Toxicol., 58: 42-52.
- IPPOLITO M.P., PACIOLLA C., D'AQUINO L., MORGANA M., TOMMASI F., 2007 – *Effect of rare earth elements on growth and antioxidant metabolism in Lemna minor L.* Caryologia, 60: 125-128.
- ISO/DIS 20079, 2004 – *Water quality—determination of the toxic effect of water constituents and wastewater on duckweed (Lemna minor)—Duckweed growth inhibition test*. ISO TC 147/SC 5/WG 5.
- KNOP W., 1865 – *Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen*. Landwirtsch. Vers. Stn., 7: 93-107.
- LIU D., WANG X., LIN Y., 2012 – *The effect of cerium on the growth and some antioxidant metabolism in rice seedlings*. Environ. Sci. Pollut. Res., 19: 3282-3291.
- MACKENZIE S.M., WAITE S., METCALFED J., JOYCE C.B., 2003 – *Landfill leachate ecotoxicity experiment using Lemna minor L.* Water Air Soil Poll. Focus, 3: 171-179.
- MOHAN B.S., HOSETTI B.B., 1999 – *Aquatic plants for toxicity assessment*. Environ. Res, 81: 259-274.
- NARDI L., CARBONI M.A., MORGANA M., BARBESTI S., ERRICO S., ZOINA A., D'AQUINO L., 2005 – *Effect of rare earth elements on the growth of Agrobacterium spp. and Rhizobium leguminosarum Frank*. Cytometry Part A, 69a: 443-444.
- NAUMANN B., EBERIUS M., APPENROTH K.J., 2007 – *Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with Lemna minor L. clone*. Plant Physiol, 164: 1656-1664.
- PAGANO G., TOMMASI F., GUIDA M., 2012 – *Comparative toxicity of cerium and of the other rare earth elements (REEs) in plant and invertebrate test systems*. In: IZYUMOV A. PLAKSIN G. (Eds), *Cerium: Molecular Structure, Technological Applications and Health Effects: 107-124*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA.
- POSCHENRIEDER C., BARCELÒ J., 2004 – *Water relations in heavy metal stressed plants*. In: PRASAD MNV (Ed.), *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems: 249-270*. Springer, Berlin.
- RADIC S., STIPANICEV D., CVJETKO P., MIKELIC I.L., RAJIC M.M., SIRAC S., PEVALEK-KOZLINA B., PAVLICA M., 2010 – *Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (Lemna minor L.) as a test organism*. Ecotoxicology, 19: 216-222.
- SRIVASTAVA S., MISHRA S., TRIPATHI RD., 2006 – *Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in Hydrilla verticillata Royle*. Aquat Toxicol, 80: 405-415.

RIASSUNTO - In questo studio sono riportati i dati preliminari concernenti le risposte alla somministrazione di Ce^{3+} di una specie acquatica *Lemna minor L.* usata come biomarker (ISO 20079). Piantine di *L. minor* sono state trattate per 15 giorni con $CeN_3O_9 \cdot 6H_2O$ a concentrazioni tra 2,5 μM e 1 mM oppure con $Ca(NO_3)_2$ a concentrazione 1 mM. Sono stati analizzati parametri di crescita quali il tasso di crescita relativo basato sul numero di fronde (RGR), il numero relativo di fronde (RFN), e la crescita di fronde in percentuale (FN). Il trattamento con Ce^{3+} 1 mM ha inibito significativamente la crescita a partire da sette giorni di incubazione, mentre le minori concentrazioni non hanno mostrato variazioni statisticamente significative. La somministrazione di $Ca(NO_3)_2$ 1 mM al contrario ha stimolato la crescita in modo significativo già dal settimo giorno suggerendo un effetto tossico del Ce^{3+} a partire da concentrazioni millimolari.

AUTORI

Maria Alessandra Zicari, Annalisa Paradiso, Franca Tommasi (franca.tommasi@uniba.it), Dipartimento di Biologia, Università di Bari "Aldo Moro", Via Orabona 4, 70126 Bari

La *Xylotomotheca Italica* del Museo Orto Botanico dell'Università di Bari

V. CAVALLARO, G. SIGNORILE, F. CARRUGGIO, F. MANTINO, L. FORTE

ABSTRACT - *The Xylotomotheca Italica of the Botanical Garden Museum of Bari University* - The *Xylotomotheca Italica*, which was realized by Adriano Fiori at the beginning of the 20th century, is a really interesting and peculiar historical collection. It is composed of thin sections of wooden species. While most of the species belong to Italian Flora only a few of them are exotic ones, which are cultivated in Italy. Fiori had the specific aim of enriching *Flora Italica Exsiccata* (FIE) and of supplying botanists with invaluable comparative material. Moreover, he designed the microtome which was used to cut the sections. The collection consists of 215 samples. The sections are enclosed in bended cards which are contained in small labelled envelopes. A different version of the *Xylotomotheca Italica*, which was produced with didactic purposes, is still conserved at the Botanical Garden Museum of Bari University. It was probably acquired, together with some FIE *exsiccata*, by the *Herbarium Horti Botanici Barensis* (BI), which is now part of the Botanical Garden Museum. In this version, sections and labels are put between two rectangular pieces of glass which are sealed with a grey tape. This collection is composed of 154 samples which include 135 subgeneric *taxa* belonging to 93 genera. It is generally fairly well conserved, and some actions, whose aim is restoring the collection, have been started.

Key words: Adriano Fiori, *exsiccata*, *Xylotomotheca Italica*

INTRODUZIONE

Le collezioni xilologiche (*xylaria*) hanno da sempre assunto una notevole importanza, sia per il ruolo svolto in campo didattico sia per quello svolto in ambito scientifico, nei settori della botanica, archeologia, etnologia, tecnologia del legno ed in particolare dove è richiesto il confronto tra campioni (URBINATI, GIOVE, 2012).

Attualmente collezioni xilologiche sono presenti in quasi tutti gli stati anche se le principali, per numero di campioni, sono negli USA. Per quanto concerne l'Italia, solo quattro collezioni sono state inserite nella quarta edizione dell'*Index Xylariorum* (LYNCH, GASSON, 2010). Il patrimonio nazionale, tuttavia, è sicuramente molto più ampio ma risulta difficile stimarlo, sia sul piano qualitativo che quantitativo, in quanto sino ad oggi non è stato effettuato un censimento completo.

Una delle collezioni italiane più interessanti, per una serie di peculiarità che la contraddistinguono, è la *Xylotomotheca Italica* di Adriano Fiori. Essa fu realizzata nei primi anni del Novecento col preciso obiettivo di completare ed arricchire la *Flora Italica Exsiccata* (FIE), la più grande raccolta italiana di *exsiccata* fanerogamici, realizzata da Fiori, Pampanini e Bèguinot. In particolare lo scopo degli Autori fu quello di corredare gli *exsiccata* con le sezioni microtomiche del legno. Le schede relative alla

Xylotomotheca Italica furono pubblicate a partire dal 1905 come appendice delle *Schedae ad Floram Italica Exsiccata* (FIORI *et al.*, 1905).

La collezione è costituita da sezioni trasversali e longitudinali dello spessore di circa 0,1 mm e con le altre dimensioni variabili (≤ 8 cm) (DI PASQUALE, ALLEVATO, 2007). Il microtomo, utilizzato per la realizzazione delle sezioni, fu ideato e progettato dallo stesso Fiori e da lui denominato "nuovo microtomo automatico a doppia rotazione" (FIORI, 1900). Nella versione originaria della collezione le sezioni sono confezionate in pieghi di cartoncino, contenenti una o due coppie delle sezioni trasversali e longitudinali. I pieghi in cartoncino sono a loro volta inseriti in bustine di carta. Esse sono corredate da una etichetta sulla quale sono riportati il numero d'ordine del campione, il binomio linneano, la porzione anatomica rappresentata dalla sezione, il luogo e la data di raccolta, in molti casi il riferimento al campione della FIE ed, infine, il nome del Curatore. Al progetto collaborarono numerosi botanici: Traverso, Pampanini, Gortani, Ferro, Cerica, Goiran, Vaccari, Mezzana, Bicknell, Cecconi, Nicoli, Bardi, Andrea Fiori e Trotter.

La collezione è costituita da 215 campioni corrispondenti a 184 *taxa* specifici appartenenti a 113 generi. Si tratta soprattutto di entità della Flora Italiana

mentre solo una piccola percentuale è rappresentata da esotiche (CUCCUINI, 2002). Si ritiene che la collezione completa e nella sua veste originaria sia presente solo presso l'Erbario di Padova (PAD) e l'*Herbarium Centrale Italicum* (FI) (CUCCUINI, 2002); viceversa, parti di essa o versioni diverse da quella originaria sono presenti presso numerosi erbari italiani ed anche presso istituzioni estere come i *Kew Royal Botanic Gardens* (<http://www.kew.org>).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Presso il Museo Orto Botanico dell'Università di Bari è presente la *Xylotomotheca Italica* non nella sua veste originaria, bensì in una versione realizzata per scopi didattici. Molto probabilmente essa fu acquisita, congiuntamente agli *exsiccata* della *FIE*, dalla Prof.ssa Francini, negli anni della sua permanenza presso l'Ateneo barese (1940-1961). Le sezioni sono montate, con l'etichetta, tra due vetri rettangolari di 10x15 cm oppure di 13x18 cm e sigillati con un nastro in tela grigia (Fig. 1).

Sia i preparati che le etichette sono del tutto uguali a quelli presenti nella versione originaria. La collezione



Fig. 1

Un campione della *Xylotomotheca Italica* presente presso il Museo Orto Botanico dell'Università di Bari.
A sample of the *Xylotomotheca Italica* at the Botanical Garden Museum of Bari University.

è composta da 154 campioni corrispondenti a 135 *taxa* specifici appartenenti a 93 generi. La maggior parte dei preparati proviene dalla provincia di Firenze ed il Curatore è, tranne poche eccezioni, Adriano Fiori. I campioni sono, a loro volta, conservati in 16 cofanetti di cartone rigido di colore grigio, chiusi mediante un nastro di cotone dello stesso colore.

Presso l'Erbario del Laboratorio di Botanica agraria (FIAB) dell'Università di Firenze è conservata la medesima versione realizzata a scopi didattici che è costituita da 178 campioni collocati in 18 cofanetti (CUCCUINI, 2002).

Attualmente, in relazione ad un rinnovato interesse verso le collezioni xilologiche dovuto ai più recenti utilizzi in campo sperimentale (MANIATIS *et al.*, 2011), didattico, divulgativo ed alla consapevolezza che la *Xylotomotheca Italica* possiede tutte le caratteristiche di un bene culturale (D. Lgs. n. 42/2004, art. 11), sono state avviate alcune azioni tese al recupero conservativo della collezione presente presso il Museo Orto Botanico. In primo luogo è stato valutato lo stato di conservazione dei singoli campioni al fine di evidenziare gli eventuali interventi da effettuare. È risultato che solo 3 campioni presentano i vetri rotti, tuttavia le sezioni non sono danneggiate. Viceversa, in quasi tutti i campioni il nastro che sigilla i vetri è logoro e consunto. Pertanto è possibile affermare che la collezione è, complessivamente, in un discreto stato conservativo.

La collezione è stata inoltre informatizzata, mediante apposito *software* (FileMaker PRO 12, Claris Corporation), riportando nei vari campi le informazioni presenti sui cartellini. Questo intervento ha permesso di fruire facilmente delle informazioni in essa contenute. Prossimamente si completerà il lavoro realizzando alcuni interventi di restauro sui campioni ed effettuando l'acquisizione in formato elettronico della loro immagine con uno scanner per documenti di pregio, anche al fine di implementare un archivio elettronico consultabile via Internet.

LETTERATURA CITATA

- CUCCUINI P., 2002 – *La Xylotomotheca Italica: un caso insolito di serie di exsiccata. Catalogo e spigolature storiche*. *Museol. Sci.*, 19(1): 97-119.
- DI PASQUALE G., ALLEVATO E., 2007 – *Collezioni di legni e carboni*. In: MAZZOLENI S., PIGNATELLI S. (a cura di), *I Musei delle Scienze Agrarie e l'evoluzione delle Wunderkammern*: 79-81. Ed. Università di Napoli Federico II.
- FIORI A., 1900 – *Nuovo microtomo automatico a doppia rotazione*. *Malpighia*, 14: 411-424.
- FIORI A., BÉGUINOT A., PAMPANINI R., 1905 – *Schedae ad Floram Italicam Exsiccata*. *N. Giorn. Bot. Ital. n.s.*, 12(2): 143-144.
- LYNCH A.H., GASSON P.E., 2010 – *Index Xylariorum. Edition 4*. Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the internet.
- MANIATIS D., SAINT ANDRÉ L., TEMMERMAN M., MALHI Y., BEECKMAN H., 2011 – *The potential of using xylarium wood samples for wood density calculations: a comparison of approaches for volume measurement*. *Forest*, 4: 150-159.
- URBINATI C., GIOVE M., 2012 – *Collezioni xilologiche*. In:

TAFFETANI F. (a cura di), *Herbaria*. Nardini Editore, Firenze.

RIASSUNTO - La *Xylotomotheca Italica* di Adriano Fiori, realizzata nei primi anni del Novecento, rappresenta una delle collezioni storiche più interessanti e peculiari nel suo genere. Si tratta di sezioni sottili di numerose specie legnose tra le più rappresentative della Flora italiana e di alcune specie esotiche coltivate in Italia. L'Autore realizzò la collezione col preciso obiettivo di arricchire la *Flora Italica Exsiccata (FIE)* e pertanto di fornire un prezioso materiale di confronto per quanti svolgevano lavori botanici. Inoltre progettò il microtomo utilizzato per effettuare le sezioni. Nella versione originaria della collezione, costituita da 215

campioni, le sezioni sono confezionate in pieghi di cartoncino a loro volta riposti in bustine corredate da un'etichetta. La *Xylotomotheca Italica*, presente presso il Museo Orto Botanico dell'Università di Bari, fu acquisita probabilmente insieme ai campioni della *FIE* presenti presso l'*Herbarium Horti Botanici Barensis* (BI). Essa non si presenta nella sua veste originaria bensì in una versione realizzata per scopi didattici. Le sezioni, con la relativa etichetta, sono montate tra due vetri rettangolari, sigillati da un nastro di tela grigia. La collezione è composta da 154 campioni comprendenti 135 *taxa* sub-generici appartenenti a 93 generi. Sono stati avviati alcuni interventi tesi al recupero della collezione che si presenta complessivamente in un discreto stato di conservazione.

AUTORI

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

Risorse per insegnare l'evoluzione dei vegetali: il progetto E-MoVe!

A. GRANO, M.C. DE TULLIO

ABSTRACT - *Resources for teaching plant evolution: the E-MoVe! project* - The E-MoVe! (Evolution of the Plant World) project tackles the problem of the scarcity of effective educational tools for teaching evolution, in spite of the undoubted importance of the topic. Within the Botanical Garden Museum of the University of Bari, methodologies for teaching evolution will be developed in collaboration with school teachers and other stakeholders. Novel teaching tools, including interactive videogames, will be made available to national and international institutions for testing and validation. The project, funded by the Italian Ministry of Education, also aims at providing training to school teachers and scientific museum operators.

Key words: plant evolution, scientific museum, teaching

INTRODUZIONE

Malgrado siano trascorsi ben 40 anni, il noto aforisma di Dobzhansky secondo cui “niente in biologia ha senso se non alla luce dell'evoluzione” (DOBZHANSKY, 1973) non solo nulla ha perso della sua straordinaria forza concettuale, ma di fatto ha oggi un significato ancor più profondo in relazione ai più recenti studi nel campo della biologia evolutiva dello sviluppo (*evo-devo*), disciplina che estende ulteriormente la visione unificante che negli anni '30 e '40 del secolo scorso condusse alla sintesi evoluzionistica coniugando la genetica con le “classiche” scienze naturali (MÜLLER, 2007).

Svolgere adeguata divulgazione scientifica sulla teoria dell'evoluzione appare però un compito estremamente difficile. Di evoluzione si parla nei contesti più disparati, ma non di rado i concetti basilari della teoria Darwiniana e delle sue successive elaborazioni vengono travisati, al punto da attribuire a Darwin stesso affermazioni mai da lui pronunciate o scritte, a cominciare dal famigerato “l'uomo discende dalla scimmia”, frase che manifesta la totale ignoranza di chi la pronuncia sulle tematiche in questione. E' anche spiacevolmente frequente una volgarizzazione erronea del concetto di evoluzione che viene interpretato come un “cammino verso la perfezione”, con l'introduzione di elementi di teleologia del tutto inappropriati. All'indirizzo <http://evolution.berkeley.edu> è disponibile un utile elenco di tipici errori concettuali sulla tematica dell'evoluzione, con relative argomentazioni e note esplicative.

Se sono ben chiari i motivi della opportunità e necessità di insegnare i principi ed i meccanismi dell'evoluzione a tutti i livelli dell'istruzione scolastica ed universitaria, non sono a tutt'oggi disponibili ade-

guati strumenti didattici, né vi è stato, se non episodicamente, un confronto con i potenziali fruitori degli interventi formativi per sperimentare le modalità più efficaci con cui trasmettere i complessi ed articolati concetti della teoria dell'evoluzione superando le fin troppo diffuse inesattezze e gli errori concettuali precedentemente menzionati.

Il ruolo delle risorse museali per una efficace didattica dell'evoluzione è stato messo in rilievo da alcuni studi (SPIEGEL *et al.*, 2012) compiuti prevalentemente negli Stati Uniti, dove è più avvertibile il problema delle resistenze di tipo ideologico/religioso in particolare nelle aree in cui sono particolarmente diffusi il creazionismo e l'ipotesi dell'*Intelligent Design*, che ne rappresenta una versione “aggiornata”.

Dall'esigenza di colmare questa grave lacuna, nasce presso il Museo Orto Botanico, struttura dell'Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, il progetto denominato E-MoVe! (Evoluzione del Mondo Vegetale). Il progetto nasce dall'idea che la biodiversità vegetale vista in chiave diacronica possa costituire uno strumento molto efficace per la divulgazione scientifica su questo tema così importante. Il progetto annuale, che ha ricevuto un finanziamento dal MIUR nell'ambito della legge 6/2000 per la diffusione della cultura scientifica, presenta alcuni elementi di novità che verranno discussi in questo breve contributo.

ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO

Il progetto si articola su 3 linee: **(A)** Allestimento nel Museo Orto Botanico di spazi espositivi sperimentali per elaborazione e validazione di strategie didattico-divulgative; **(B)** Realizzazione di giochi interattivi;

(C) Formazione di docenti ed operatori museali

(A) Lo spazio espositivo consentirà di sperimentare strategie di comunicazione e divulgazione valorizzando strutture, attrezzature e competenze già presenti e si articola in 3 parti (a: Phylowall; b: Darwin e le piante; c: Iconografia botanica) con aula didattica per la formazione.

a. PhyloWall: La parete della filogenesi delle piante Il “giardino verticale” nasce a scopo decorativo-artistico su idea del botanico e designer P. Blanc. Il PhyloWall avrà una funzione scientifico-didattica. Attraverso la disposizione degli organismi secondo uno schema filogenetico, si visualizzerà in maniera immediata il concetto di evoluzione. Una legenda con datazione e localizzazione geografica dei reperti fossili verrà collocata accanto al Phylowall per una immediata fruibilità.

b. Darwin e le piante

Verrà allestita l'ipotetica ricostruzione dello studio di Darwin con alcune delle immagini più significative legate all'elaborazione del concetto di evoluzione. Verrà collocato uno schermo *touch-screen* per i giochi interattivi.

c. Iconografia botanica locale

Verranno allestite teche per l'esposizione di volumi, tra cui la Flora del Regno di Napoli di Michele Tenore, allo scopo di evidenziare il legame tra il passato ed il futuro della ricerca botanica.

(B) La realizzazione di materiale didattico innovativo costituisce un obiettivo fondamentale del progetto. Un comitato di redazione tecnico-scientifico, in collaborazione con uno studio professionale specializzato nella comunicazione multimediale, si occuperà di ideare e realizzare materiale didattico che verrà poi distribuito per la validazione nell'ambito di una rete di collaborazione nazionale ed internazionale.

(C) La Formazione si articolerà in (a) visite guidate per alunni, (b) corsi per insegnanti e operatori museali. Con la collaborazione dell'Associazione Nazionale Insegnanti di Scienze Naturali (ANISN), si prevede la formazione di insegnanti sulle tematiche dell'evoluzione biologica, utilizzando sia un approccio storico-didattico con l'uso dell'erbario e della banca del germoplasma, sia lo sviluppo di strumenti interattivi informatici.

I moduli di formazione affronteranno temi che spaziano dall'inquadramento storico della teoria dell'evoluzione, all'uso delle moderne tecniche di sistematica molecolare, sviluppando specifici percorsi didattici per i diversi livelli di approfondimento. Un ruolo fondamentale verrà attribuito all'uso delle risorse museali.

PROSPETTIVE FUTURE

Il progetto ha elevate potenzialità di fornire ricadute per la diffusione della cultura scientifica sia a livello locale, sia come esperienza pilota da esportare in altre realtà territoriali nazionali. In particolare, la collaborazione con l'ANISN consente l'implementazione del progetto nelle “scuole presidio” ed una più ampia utilizzabilità del materiale didattico sull'evoluzione delle piante che verrà messo a disposizione.

La collaborazione con altre Università, Orti Botanici e Musei della Scienza costituirà una rete aperta ad un bacino di utenza più ampio, e permetterà di esportare sul piano nazionale l'esperienza maturata nell'ambito del progetto.

Le azioni connesse alla realizzazione di E-MoVe! promuoveranno su scala nazionale la costituzione di nodi in una rete di comunicazione e diffusione della cultura scientifica nel campo specifico dell'evoluzione delle piante con l'obiettivo generale di elevare il livello di competenze degli studenti, dei docenti, degli operatori museali e del pubblico di non addetti ai lavori in ambito scientifico, sostenendo la formazione continua. La formazione di operatori museali, guide naturalistiche ed altre figure professionali per ampliare le conoscenze naturalistiche territoriali è un obiettivo di particolare rilevanza sia per la valorizzazione delle risorse umane, sia per la tutela dei beni ambientali e dell'ingente patrimonio costituito dalla biodiversità vegetale nel nostro Paese, con l'obiettivo di salvaguardare specie a rischio di estinzione, nella fattispecie piante che hanno rivestito un particolare significato nel corso dell'evoluzione.

LETTERATURA CITATA

- DOBZHANSKY T., 1973 – *Nothing in biology makes sense except in the light of evolution*. Amer. Biol. Teacher, 35: 127-129.
- MÜLLER G., 2007 – *Evo-devo: extending the evolutionary synthesis*. Nat Rev. Genet., 8: 943-949.
- SPIEGEL A.N., EVANS E.M., FRAZIER B., HAZEL A., TARE M., GRAM W., DIAMOND J., 2012 – *Changing museum visitor's concept of evolution*. Evo. Edu. Outreach, 5: 43-61.

RIASSUNTO – Viene brevemente presentato il progetto E-MoVe! (Evoluzione del Mondo Vegetale), attualmente in corso di realizzazione presso il Museo Orto Botanico dell'Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”. Il progetto, che ha ricevuto un finanziamento MIUR nell'ambito della legge 6/2000 per la diffusione della cultura scientifica, si propone di allestire uno spazio espositivo che si pone anche come centro permanente per la ideazione, realizzazione e diffusione di efficaci strategie didattiche sui temi dell'evoluzione biologica attraverso la costituzione di una rete di validazione nazionale ed internazionale, nonché la realizzazione di incontri di formazione per docenti di scuole di ogni ordine e grado ed operatori museali.

AUTORI

Antonella Grano, Museo Orto Botanico, Università di Bari “Aldo Moro”, Via Orabona 4, 70126 Bari
 Mario C. De Tullio (mario.detullio@uniba.it), Dipartimento di Biologia, Università di Bari “Aldo Moro”, Via Orabona 4, 70126 Bari

Indagini cariomorfometriche in tre *taxa* poliploidi del genere *Arum*

A. TURCO, P. MEDAGLI, A. ALBANO, S. D'EMERICO

ABSTRACT - *Karyomorphometry on three polyploid taxa of Arum* - Somatic chromosomes of three polyploid *taxa* of *Arum* have been investigated. *A. italicum* showed $2n = 84$ chromosomes and the karyotype is composed by numerous asymmetric chromosomes. *A. maculatum* and *A. apulum* have shown $2n = 56$ chromosomes. The karyotype morphology of *A. italicum* is similar to that of *A. maculatum*, but the most asymmetrical karyotype and the presence of numerous weakly Feulgen-stained segments of the former suggest a more recent origin respect to latter. Differently *A. apulum* has showed a symmetrical karyotype and few weakly Feulgen-stained segments.

Keywords: allocyclic segments, *Arum*, karyotype asymmetry

INTRODUZIONE

Il genere *Arum* L. (*Araceae*) comprende in Italia tre specie poliploidi: *A. apulum* (Carano) P. C. Boyce, *A. maculatum* L. e *A. italicum* Mill.. In questo genere, i *taxa* poliploidi tendono ad occupare areali geografici molto ampi rispetto alle specie diploidi (BEDALOV, 1981). Infatti, *A. italicum* è principalmente diffuso dal Caucaso, attraverso la regione del Mediterraneo, fino alla costa Atlantica (BONNIER, 1931; MEUSEL *et al.*, 1965; DIHORU, 1970; BEDALOV, 1975). *A. maculatum* secondo MEUSEL *et al.* (1965), TERPÒ, (1973) e BEDALOV, (1981) è distribuito in Europa centrale e occidentale. *A. maculatum* e *A. italicum* presentano tuberi rizomatosi al contrario del poliploide *A. apulum* che ha il tubero a forma discoide (BEDALOV, KUPFER, 2005). In riferimento all'origine delle specie del genere *Arum*, BEDALOV, KUPFER (2005) suggeriscono che la forma discoide del tubero sia da considerare ancestrale rispetto alla forma rizomatosa. Successivamente questi dati sono stati confermati da indagini molecolari (ESPINDOLA *et al.*, 2010).

In precedenti lavori, al fine di chiarire la tassonomia del genere *Arum*, sono stati riportati alcuni aspetti citologici e citotassonomici (GORI, 1958; MARCHI *et al.*, 1964; BEURET, 1971, 1972; MARCHI, 1971; BEDALOV, 1975, 1981; BEDALOV *et al.*, 1998). La maggior parte delle specie di *Arum* è diploide con numero cromosomico $2n=28$, mentre sono pochi i *taxa* poliploidi conosciuti. *A. maculatum* e *A. apulum* sono tetraploidi con $2n=56$, mentre *A. italicum* è esaploide con $2n=84$. Le analisi carilogiche hanno mostrato in dettaglio i cariotipi di quattro specie diploidi e due poliploidi. I *taxa* analizzati, inoltre, hanno evidenziato un "cariotipo di base" caratteriz-

zato dalla presenza di alcuni cromosomi marker (D'EMERICO *et al.*, 1993; BIANCO *et al.* 1994).

Il presente contributo fornisce, pertanto, informazioni sulla cariomorfometria delle suddette specie poliploidi.

MATERIALI E METODI

Le analisi carilogiche sono state effettuate su apici radicali pretrattati con colchicina 0,3% per 2h e quindi fissati per 5 min. con 5:1:1:1 (v/v) (alcol etilico assoluto/ cloroformio/ acido acetico glaciale/ formaldeide); successivamente sono stati idrolizzati per 20 min. con HCl 5.5N e colorati con reattivo di Feulgen. La nomenclatura utilizzata per descrivere il cariotipo segue LEVAN *et al.* (1964).

Per valutare il livello di simmetria del cariotipo sono stati utilizzati gli indici di asimmetria A1 (indice intracromosomale) e A2 (indice intercromosomale) (ROMERO ZARCO, 1986).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Arum maculatum e *A. italicum* sono caratterizzati da un cariotipo asimmetrico, comprendente numerosi cromosomi submetacentrici, con *A. italicum* che mostra un indice intracromosomale ($A1=0,43$) più elevato rispetto ad *A. maculatum* ($A1=0,39$).

Dal punto di vista citologico è interessante notare che nelle specie esaminate sono state osservate coppie di cromosomi caratterizzate dalla presenza di segmenti telomerici, debolmente colorati dal Feulgen, precedentemente descritti come costrizioni secondarie (D'EMERICO *et al.*, 1993). DYER (1963) e VOSA, COLASANTE (1995) descrivono simili segmenti,

denominati “allocyclic segments”, in diversi gruppi di piante (*Gasteria* Duval, *Iris* L., *Aloe* L.). VOSA, BENNETT (1990) e BENNETT, GRIMSHAW (1991) inoltre, suggeriscono l'utilità di questi segmenti come indicatori dell'evoluzione del cariotipo e quindi determinanti nell'identificazione dei cariotipi delle varie entità. Al riguardo, *Arum italicum* ha mostrato il maggior numero di cromosomi contenenti i suddetti segmenti, in comparazione a quelli osservati nei complementi di *A. maculatum*, *A. apulum* e nei diploidi *A. orientale* M. Bieb. subsp. *orientale* e *A. cylindraceum* Gasp. (D'EMERICO *et al.* 1993).

Differentemente, *A. apulum* è una specie tetraploide con una distribuzione limitata al Sud Italia (Puglia) (CARANO, 1934; GORI, 1958; BIANCO *et al.*, 1994). Quest'ultima specie mostra un cariotipo più simmetrico ($A1=0,32$), considerato ancestrale rispetto alle specie con cariotipi asimmetrici (STEBBINS, 1971), costituito da cromosomi prevalentemente metacentrici e dalla presenza di pochi segmenti allociclici. D'altra parte, l'isolamento geografico, accompagnato da variazioni ecologiche, sembra supportare l'attuale struttura del cariotipo di *A. apulum*.

LETTERATURA CITATA

- BEDALOV M., 1975 – *Cytotaxonomical and phytogeographical investigation of the species Arum italicum Mill. in Yugoslavia*. Acta Bot. Croat., 34: 143-150.
- , 1981 – *Cytotaxonomy of the genus Arum (Araceae) in the Balkans and the Aegean area*. Bot. Jahrb. Syst., 102: 183-200.
- BEDALOV M., FAVARGER C., KUPFER P., 1998 – *Natural hybrids and basic chromosome number in the genus Arum*. Acta Botanica Yunnanica, Suppl. X: 71-75.
- BEDALOV M., KUPFER P., 2005 – *Studies on the genus Arum (Araceae)*. Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat., 128: 43-70.
- BENNETT S.T., GRIMSHAW J.M., 1991 – *Cytological studies in Cyclamen (Primulaceae)*. Pl. Syst. Evol., 176: 135-143.
- BEURET E., 1971 – *Répartition géographique de quelques Arum des groupes maculatum L. et italicum Mill.* Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat., 94: 29-36.
- , 1972 – *Présence d'un Arum diploide en Italie*. Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat., 95: 35-41.
- BIANCO P., D'EMERICO S., MEDAGLI P., BEDALOV M., 1994 – *Indagini sistematiche su Arum apulum (Carano) Bedalov (Araceae), entità endemica delle Murge Pugliesi*. Webbia, 49 (1): 43-49.
- BONNIER G., 1931 – *Flore complète illustrée en couleurs de France*. Suisse et Belgique, 11. Paris.
- CARANO E., 1934 – *Un nuovo elemento della Flora meridionale d'Italia*. Ann. Bot., 20: 579-585.
- D'EMERICO S., BIANCO P., MEDAGLI P., 1993 – *Chromosome numbers and karyotypes in Arum (Araceae)*. Caryologia, 46: 161-170.
- DIHORU G., 1970 – *Morpho-taxonomische aspekte einiger Arum-Arten*. Rev. Roumaine Biol., Sér. Bot., 15: 71-85.
- DYER A.F., 1963 – *Allocyclic segments of chromosomes and structural heterozygosity that they reveal*. Chromosoma, 13: 545-576.
- ESPINDOLA A., BUERKI S., BEDALOV M., KUPFER P., ALVAREZ N., 2010 – *New insights into the phylogenetics and biogeography of Arum (Araceae): unravelling its evolutionary history*. Bot. J. Linn. Soc., 163: 14-32.
- GORI C., 1958 – *Il numero dei cromosomi dell'Arum nigrum Schott. var. apulum Carano*. Caryologia, 10 (3): 454-456.
- LEVAN A., FREDGA K., SANDBERG A.A., 1964 – *Nomenclature for centromeric position on chromosomes*. Hereditas, 52: 201-220.
- MARCHI P., 1971 – *Numeri cromosomici per la flora italiana: 57-66*. Inform. Bot. Ital., 3: 124-138.
- MARCHI P., CAPINERI R., D'AMATO G., 1964 – *Numeri cromosomici per la flora italiana: 182-189*. Inform. Bot. Ital., 6 (3): 303-312.
- MEUSEL H., JAEGER E., WEINERT E., 1965 – *Vergleichende Chorologie der zentra-europäischen*. Flora 1. Jena.
- ROMERO ZARCO C., 1986 – *A new method for estimating karyotype asymmetry*. Taxon, 35: 526-530.
- STEBBINS G.L., 1971 – *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold Ltd. London.
- TERPÓ A., 1973 – *Kritische Revision der Arum-Arten des Karpatenbeckens*. Acta Bot. Acad. Sci. Hung., 18: 216-255.
- VOSA C.G., BENNETT S.T., 1990 – *Chromosome studies in the Southern African flora: 58-94. Chromosome evolution in the genus Gasteria Duval*. Caryologia, 43: 235-247.
- VOSA C.G., COLASANTE M., 1995 – *I segmenti allociclici nelle Liliiflorae*. Inform. Bot. Ital., 27: 307-308.

RIASSUNTO Gli autori riportano alcuni risultati cario-morfometrici ottenuti su tre specie poliploidi del genere *Arum*: *Arum apulum* ($2n=56$), *A. maculatum* ($2n=56$) e *A. italicum* ($2n=84$). In particolare, la specie *A. italicum* con $2n=84$ cromosomi ha mostrato un cariotipo con un elevato indice di asimmetria. Nel cariotipo di questa specie sono stati riscontrati numerosi “segmenti allociclici” in comparazione ad *A. maculatum* e *A. apulum*.

AUTORI

Alessio Turco, Piero Medagli, Antonella Albano, Laboratorio di Botanica sistematica ed Ecologia vegetale, Di.S.Tè.B.A. Università del Salento, Campus Ecotekne, 73100 Lecce
Saverio D'Emérico, Dipartimento di Biologia, Università di Bari “Aldo Moro”, Via Orabona 4, 70126 Bari

Reintroduzione di *Cistus clusii* a “Bosco Isola” (Lesina, Puglia)

L. FORTE, S. ANIFANTIS, F. CARRUGGIO, V. CAVALLARO, F. MANTINO, G. MELCHIORRE

ABSTRACT - *Reintroduction of Cistus clusii to “Bosco Isola” (Lesina, Apulia) - Cistus clusii* Dunal is very rare in Italy, where its historical sites of occurrence are in Sicily and Apulia (“Bosco Isola” – Lesina, FG). After the extinction in the wild of the small Apulian population, the Botanical Garden Museum of Bari University and the Centro Studi Naturalistici (ONLUS) made a special agreement, in order to implement a reintroduction project into the site of Lesina. The reintroduced plants, 520 in all, were obtained from the offspring of Lesina *C. clusii* spontaneous population which is conserved *ex situ* at the Botanical Garden Museum of Bari. To increase the chances of a successful reintroduction, the plants were placed in three different areas and, in each of them, the individuals were planted in microsites suitable for the eco-physiological characteristics of the Lesina population, already known from literature. In fact, only a thorough knowledge of the bio-ecological behaviour of the selected species may allow to establish self-maintaining populations in the wild and so to realize an effective conservation action.

Key words: Apulia, *Cistus clusii* Dunal, reintroduction

INTRODUZIONE

Cistus clusii Dunal, piccolo arbusto appartenente alla famiglia *Cistaceae*, è una specie xerofila con distribuzione mediterraneo-occidentale; in Italia storicamente presente in Sicilia (GIARDINA, 1988) e in Puglia nell'unica stazione di “Bosco Isola” (Lesina, Fg) (FORTE *et al.*, 2002a). In quest'ultima il contesto vegetazionale è quello della gariga nanofanerofitica, su suolo sabbioso, in associazione con *Rosmarinus officinalis* L., *Erica multiflora* L. e *Cistus* sp. pl. (CHIESURA LORENZONI *et al.*, 1976).

A partire dall'anno 2000, nell'ambito di progetti di ricerca condotti dal Museo Orto Botanico dell'Università degli Studi di Bari, sono stati indagati alcuni aspetti della biologia ed ecologia di *C. clusii* (MACCHIA, 2005). Tali studi furono finalizzati alla realizzazione di azioni di conservazione *in situ*, attraverso il rafforzamento della popolazione residuale pugliese, già all'epoca gravemente esposta a pericolo di estinzione (CONTI *et al.*, 1997). A tale scopo furono infatti reintrodotti, in aree ecologicamente idonee di “Bosco Isola”, circa cento individui ottenuti per via sessuale attraverso fecondazione incrociata controllata, a partire dai pochi individui della popolazione originaria (FORTE *et al.*, 2002b). Successivi rilievi in campo hanno registrato la progressiva diminuzione del numero di individui presenti *in situ*, fino alla loro completa scomparsa, soprattutto a causa dei ripetuti incendi verificatisi tra il 2007 e il 2010 (FORTE *et al.*, 2009, 2012). Tuttavia, la specie in

Puglia era da ritenersi estinta solo in natura (*EW*) in quanto presso il Museo Orto Botanico di Bari erano presenti sia individui ottenuti da fecondazione incrociata e derivanti dalla popolazione spontanea originaria, sia semi conservati presso la Banca del Germoplasma (BG-MOBB).

Quest'ultima evenienza ha costituito la premessa indispensabile per la realizzazione di nuove azioni di conservazione di *C. clusii* nel territorio di “Bosco Isola”. Tali azioni si sono concretizzate grazie ad una convenzione stipulata tra il Museo Orto Botanico di Bari e il Centro Studi Naturalistici ONLUS, nell'ambito del Progetto “Interventi per la protezione e conservazione del patrimonio ambientale”- Fondi FAS – Premialità Regionale Delibera CIPE 20/2004.

In questo lavoro vengono presentate le attività svolte ai fini della propagazione gamica di *C. clusii* e quelle per la successiva reintroduzione degli individui prodotti.

MATERIALI E METODI

Il materiale di propagazione gamica utilizzato per le azioni di conservazione *in situ* è stato ottenuto da impollinazione incrociata controllata, eseguita su due individui conservati *ex situ*, siglati come C1 e C2, per i quali era stata già testata la compatibilità all'incrocio (FORTE *et al.*, 2012).

Nel mese di aprile 2010, 495 fiori (437 dell'individuo C1 e 58 dell'individuo C2), privati degli stami,

sono stati impollinati manualmente e coperti con sacchetti di tessuto non tessuto (TNT). In maggio, in concomitanza con l'inizio dell'ingrossamento degli ovari, i cappucci sono stati rimossi e nel mese successivo è stata effettuata la raccolta delle capsule mature. Nella primavera del 2011, i semi sono stati sottoposti a pre-trattamenti di scarificazione meccanica manuale e di *dry-heating* (80 °C x 5 min), in quanto risultati i più efficaci nel promuoverne la germinazione (FORTE *et al.*, 2012). Per ciascuno dei due pre-trattamenti sono stati utilizzati circa 1500 semi derivanti dall'incrocio C1 x C2 e circa 400 semi prodotti dall'incrocio C2 x C1. I semi pre-trattati sono stati posti direttamente in *plateaux* di polistirolo espanso, riempiti con sabbia sterilizzata a grana medio-fine (50%) e torba (50%). Dopo una prima fase di accrescimento, le plantule sono state trapiantate in fitosacchi in film plastico, contenenti terreno non sterile (sabbia di fiume 40%, terreno comune 30%, torba 30%). Durante tutte le fasi di crescita, le plantule sono state irrigate e sottoposte a trattamenti fitosanitari e fertilizzanti mirati.

Per l'intervento di reintroduzione, oltre agli individui così ottenuti nel 2011, sono stati utilizzati anche individui derivanti da semi pre-germinati nell'ambito di prove sperimentali condotte, tra il 2009 e il 2010, su C1 e C2.

La scelta delle aree di reintroduzione è stata fatta sulla base dei dati storici di presenza di *C. clusii* a Lesina (CHIESURA LORENZONI *et al.*, 1976; FORTE *et al.*, 2002b), delle caratteristiche eco-fisiologiche della popolazione originaria (FORTE *et al.*, 2005; FORTE, PASTORE, 2005), di quelle ecologiche dei siti di reintroduzione e dell'analisi delle minacce.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli individui oggetto dell'azione di reintroduzione, avvenuta a fine gennaio 2013, sono stati distribuiti in tre aree principali (Fig. 1). Queste sono situate nel tratto di cordone dunale immediatamente ad est di Marina di Lesina, insediamento sorto in località Pietramaura dove, negli anni '70, era ancora presente il più esteso nucleo di individui di *C. clusii* della stazione di Lesina (CHIESURA LORENZONI *et al.*, 1976). Due delle aree di reintroduzione, poste tra le località di Acquarotta e Pennacchio, sono relativamente vicine tra loro e separate da una fascia occupata da un rimboschimento a *Pinus pinea* L.; mentre, la terza, in località Chiusa, dista dalle altre circa 2 km. All'interno di ciascuna area sono stati individuati più siti di reintroduzione, georiferiti mediante strumentazione GPS, in ognuno dei quali è stato inserito un numero di individui compreso tra 20 e 25.

La scelta di ripartire gli individui in tre aree di reintroduzione differenti e, all'interno di queste, in più siti distinti è stata effettuata con lo scopo di ridurre il rischio che un eventuale incendio possa interessarle contemporaneamente, compromettendo la sopravvivenza dell'intera popolazione reintrodotta. Il numero complessivo di siti di intervento è risultato pari a 27. Inoltre, per garantire buone probabilità di successo,



Fig. 1

Mappa delle aree di reintroduzione (base cartografica: "Carta della vegetazione reale del "Bosco Isola" di Lesina - Foglio 1", FORTE, 2001).

Map of reintroduction areas (cartographic base: "Carta della vegetazione reale del "Bosco Isola" di Lesina - Foglio 1", FORTE, 2001).

anche riproduttivo, in ciascun sito sono stati reintrodotti almeno 20 individui, al fine di aumentare la probabilità di incrocio tra individui con alleli di incompatibilità differenti, indispensabile in una specie allogama come *C. clusii* (RIZZOTTO, 1979).

In ogni sito, inoltre, i singoli individui sono stati piantati in micro-siti individuati sulla base della micro-morfologia stazionale. Le tre aree di intervento ricadono in un contesto vegetazionale caratterizzato da un complesso e molto frammentato mosaico costituito principalmente dalla gariga a *R. officinalis*, *E. multiflora* e *Cistus* sp. pl. e dalla macchia a sclerofille sempreverdi con presenza di *Erica arborea* L. Questo mosaico, spesso, è il diretto risultato delle differenti condizioni ecologiche determinate dalla micro-morfologia stazionale (FORTE *et al.*, 2002a) e, altre volte, della dinamica della vegetazione in atto a causa degli incendi. Pertanto, sono stati individuati come idonei quei micro-siti rispondenti alle caratteristiche bio-ecologiche della popolazione da introdurre (eliofilia, relativa sensibilità allo stress idrico, ecc.; FORTE *et al.*, 2005) e, comunque, sempre sufficientemente distanti da nuclei di macchia in stato di avanzamento o da singoli cespugli in fase di *resprouting*.

L'azione di conservazione *in situ* così condotta non ha richiesto, pertanto, ulteriori interventi, quali dir-

damento della vegetazione preesistente, rimozione del secco, ecc..

Complessivamente, nella stazione di "Bosco Isola" sono stati reintrodotti 520 individui di *C. clusii* prodotti mediante coltivazione *ex situ*, 200 dei quali derivanti da semina diretta di semi pre-trattati e 320 ottenuti da impianto di semi pre-germinati.

Attualmente, ulteriori 155 individui prodotti nell'ambito di questo Progetto sono conservati presso il Museo Orto Botanico dell'Università di Bari, in modo da garantire sia la conservazione *ex situ* del patrimonio genetico della popolazione di Lesina e sia la possibilità di disporre di materiale di propagazione per studi successivi.

Ringraziamenti - Gli Autori ringraziano gli "speciali collaboratori" che si sono prodigati durante il lavoro in campo di reintroduzione *in situ*; in ordine alfabetico: Elena Blotti, Nicola Cillo, Saverio D'Amico, Mario De Tullio, Antonella Grano, Marcello Macchia, Saverio Regina e Gianni Signorile.

LETTERATURA CITATA

- CHIESURA LORENZONI F., CURTI L., LORENZONI G.G., MARCHIORI S., 1976 - *Cistus clusii Dunal. Note di nomenclatura e di distribuzione con particolare riguardo alla stazione di Lesina (Foggia)*. Giorn. Bot. Ital., 110: 259-267.
- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1997 - *Liste rosse regionali delle piante d'Italia*. WWF, Società Botanica Italiana, Università di Camerino.
- FORTE L., ANIFANTIS S., MANTINO F., CARRUGGIO F., CAVALLARO V., 2009 - *Conservation of Cistus clusii Dunal from "Bosco Isola" (Lesina - Apulia): current status and new experimental evidence*. In: BACCHETTA G. (Ed.) *Book of Abstracts: Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Area*, 45th Intern. Congr. SISV & FIP - Cagliari 22-24 / 25-29 June 2009: 280.
- FORTE L., CAVALLARO V., MACCHIA F., 2002b - *Conservazione in situ di Cistus clusii Dunal (Cistaceae, Magnoliophyta) nella duna di Lesina*. Quad. Bot. Amb. Appl., 13: 3-9.

AUTORI

Luigi Forte (luigi.forte@uniba.it), Viviana Cavallaro, Dipartimento di Biologia e Museo Orto Botanico, Università di Bari "Aldo Moro", Via E. Orabona 4, 70126 Bari
 Stamatia Anifantis, Francesca Carruggio, Francesca Mantino, Giulia Melchiorre, Museo Orto Botanico, Università di Bari "Aldo Moro", Via E. Orabona 4, 70126 Bari

- FORTE L., CAVALLARO V., PANTALEO F., D'AMICO F.S., MACCHIA F., 2002a - *The vascular Flora of the "Bosco Isola" at Lesina (Foggia - Apulia)*. Fl. Medit., 12: 33-92.
- FORTE L., MELCHIORRE G., ANIFANTIS S., CARRUGGIO F., MANTINO F., 2012 - *Alcuni aspetti della biologia della conservazione di Cistus clusii Dunal di "Bosco Isola" (Lesina, Puglia)*. Inform. Bot. Ital., 44(Suppl. 2): 36-38.
- FORTE L., PASTORE D., 2005 - *Relazioni acqua-pianta*. In: MACCHIA F. (Ed.), *Biologia ed ecologia di Cistus clusii Dunal*: 31-38. Ed. Adda, Bari.
- FORTE L., PASTORE D., MARVULLI M., SCATIGNA A.M.E., MACCHIA F., 2005 - *Analisi comparata tra eventi fenologici e andamento dei parametri ambientali*. In: MACCHIA F. (Ed.), *Biologia ed ecologia di Cistus clusii Dunal*: 5-13. Ed. Adda, Bari.
- GIARDINA, 1988 - *Segnalazioni Floristiche Italiane: 574-576*. Inform. Bot. Ital., 20(2-3): 678-679.
- MACCHIA F. (a cura di), 2005 - *Biologia ed ecologia di Cistus clusii Dunal*. Ed. Adda, Bari.
- RIZZOTTO M., 1979 - *Ricerche tassonomiche e corologiche sulle Cistaceae. I. Il genere Cistus L. in Italia*. Webbia, 33(2): 343-378.

RIASSUNTO - *Cistus clusii* Dunal è una specie molto rara in Italia; storicamente presente in Sicilia e in Puglia nell'unica stazione di "Bosco Isola" (Lesina, FG). In seguito all'estinzione della piccola popolazione residuale pugliese, il Museo Orto Botanico dell'Università di Bari e il Centro Studi Naturalistici ONLUS hanno stipulato una apposita convenzione al fine di attuare un'azione di reintroduzione nel sito di Lesina. Le piante reintrodotte *in situ*, 520 in tutto, sono state ottenute a partire da individui di *C. clusii*, progenie della popolazione spontanea originaria, conservati *ex situ* presso il Museo Orto Botanico. Per aumentare le probabilità di successo dell'intervento, gli individui sono stati distribuiti in tre aree distinte e, all'interno di queste, piantati in micro-siti rispondenti alle caratteristiche eco-fisiologiche della popolazione di *C. clusii* di Lesina, già note dalla letteratura. Infatti, solo una conoscenza approfondita del comportamento bio-ecologico delle entità oggetto di interventi di conservazione *in situ* permette di programmare una concreta azione di tutela, attraverso l'insediamento di popolazioni in grado di persistere nel tempo.

Conservazione *ex situ* ed interventi di reintroduzione di *Limoniastrum monopetalum* in Puglia

R. ACCOGLI, M.P. BIANCHI, P. MEDAGLI, S. MARCHIORI

ABSTRACT - *Ex situ conservation and reintroduction of Limoniastrum monopetalum in Apulia region* - In this paper are presented the main actions taken by the Botanic Garden of DiSTeBA for the protection of *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss., species of high vulnerability, included in the National Red List of Plants of Italy. The specie is cultivated *ex situ*, in the Botanic Garden, and it was decided to implement its reintroduction in the locality Palude la Vela (TA), in an area once had been reported, but no longer found. Propagation of *L. monopetalum* was carried out by vegetative and generative individuals obtained were reintroduced in two sites of the Palude, to different environmental conditions.

Key words: conservation, multiplication, reintroduction

INTRODUZIONE

Limoniastrum monopetalum (L.) Boiss. è presente in Puglia, sulle rupi marittime di Tricase Porto (Le), nell'ambito di una cenosi ascrivibile alla classe *Crithmo-Limonietea*, Br.-Bl 1947, in condizioni analoghe a quanto descritto per la Sicilia meridionale da BARTOLO *et al.* (1982). Secondo la Direttiva 92/43/CEE si tratta di un habitat di interesse comunitario denominato "Scogliere con vegetazione delle coste mediterranee con *Limonium* spp. endemici" (AA.Vv., 2010). E' una specie a diffusione SW-Mediterranea; in Italia è presente in Sardegna, in Sicilia (CONTI *et al.*, 1992), nella Laguna di Orbetello (TOMEI, GUAZZI, 1993), a Tricase Porto (Le) (ACCOGLI *et al.*, 1996) (Fig.1). In passato, la specie era stata segnalata "nei siti arenosi di Taranto" (MARINOSCI, 1870), caratterizzati da depressioni costiere con un ristagno idrico, con substrato prevalentemente costituito da argille e colonizzato da specie ad elevata alofilia (TROTTER, 1936); probabilmente le antiche cenosi erano ascrivibili alla classe *Sarcocornetea-fruticosae*, Br.-Bl. & Tüxen ex A. & O. Bolòs 1950, tipica dei suoli inondata fangoso-argillosi come riportato da BIONDI *et al.* (2004) per la Sardegna.

STATUS DEL POPOLAMENTO PUGLIESE ED ESPERIENZE PREGRESSE

A Tricase Porto il popolamento si presenta formato da due nuclei, localizzati sulla sommità di due costoni rocciosi distanti in linea d'aria circa 150 m. Entrambi i costoni sono occupati da abitazioni ad

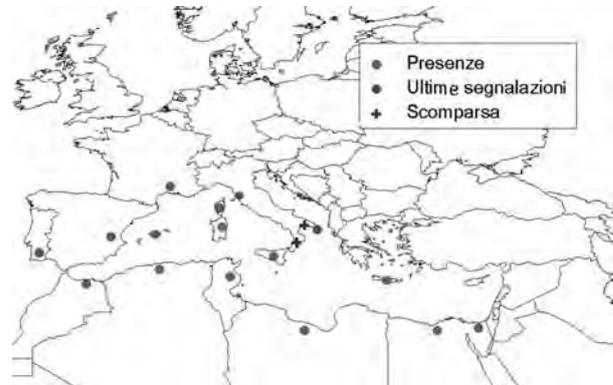


Fig. 1

Areale di *L. monopetalum* secondo GREUTER *et al.*, 1989 e TUTIN *et al.*, 1981.

Distribution area of *L. monopetalum* according to GREUTER *et al.*, 1989 and TUTIN *et al.*, 1981.

uso civico ed i cespugli di limoniastro sono localizzati nelle loro adiacenze ma non all'interno e questo potrebbe escludere un'introduzione della specie per scopo ornamentale. In totale, si possono contare circa 25 individui, dei quali 18 si presentano come grossi cespugli, larghi 1–2.5 m, alti 0.75–1.30 m; la fioritura dura meno di un mese, tra la fine di giugno e l'inizio di luglio. Le infiorescenze secche rimangono sulla pianta sino a dicembre, ma la maturazione dei frutti non è mai evidente e non è visibile la dei-

scenza. A contrastare lo sviluppo e la diffusione di nuove piante sono le estreme condizioni di povertà del substrato fortemente disturbato dalle attività antropiche che rimaneggiano continuamente le sommità dei costoni rocciosi (interventi di restauro edilizio, incendi e tagli indiscriminati) e la presenza di una flora sinantropica dominata da agave, pittosporo, caprifico, rovo.

La vulnerabilità della specie ha motivato la sua riproduzione *ex situ*, nell'Orto Botanico dell'Università del Salento e la messa a punto di protocolli di reintroduzione. Infatti, già nel 2000, era stata testata la capacità di propagazione di *L. monopetalum*, sia per via gamica che agamica, senza forzature sui semi né di ormoni radicanti per le talee. La resa germinativa era risultata molto bassa, del 2-5%, mentre elevate sono state le percentuali di attecchimento delle talee (70-95%), sia in primavera che agli inizi dell'autunno. Nel 2005 è stato effettuato un primo intervento volto al potenziamento del popolamento di *L. monopetalum* esistente a Tricase Porto, lungo un breve tratto costiero prospiciente il sito interessato da un intervento di riqualificazione, attuato dall'Amministrazione comunale. L'intervento prevedeva la realizzazione di un camminamento lungo la scogliera, attraverso i segni della storia locale ancora leggibili (tratturi per la mena delle pecore, vasche intagliate negli scogli per la concia delle pelli e per l'estrazione di blocchi lapidei, terrazzamenti per le colture agrarie primaticce, etc.). La flora del tratto costiero annovera altre specie di interesse conservazionistico, perché incluse nella Lista Rossa Nazionale come *Vincetoxicum hirundinaria* Medik. subsp. *adriaticum* (Beck) Markgr o di valore fitogeografico come l'endemico *Limonium japigicum* (Groves) Pignatti, *Lavatera arborea* L., *Scrophularia lucida* L. L'intervento di reintroduzione era stato concordato con docenti ed alunni delle Scuole Medie inferiori del comune di Tricase, che hanno partecipato dimostrando grande interesse e sensibilità. Nell'autunno 2005 è stata organizzata una giornata durante la quale, dopo un incontro tra autorità politiche locali, studiosi, studenti e cittadini, sono state messe a dimora 10 piante di *L. monopetalum* (ACCOGLI *et al.*, 2006). Purtroppo, l'intervento è stato inficiato da un incendio che nella primavera successiva ha distrutto buona parte della flora spontanea ed i trapianti effettuati.

MATERIALI E METODI

Un secondo intervento di reintroduzione di *L. monopetalum* è stato programmato nel 2011 per il sito Palude la Vela che ricade nell'omonima Riserva Naturale Regionale e prossima all'antica salina di S. Giorgio jonico (TA). Come prima fase, si è proceduto alla moltiplicazione della specie per ottenere individui giovani da mettere a dimora. La moltiplicazione *ex situ* è stata ripetuta, sia per via vegetativa che generativa, ponendosi nelle medesime condizioni degli anni precedenti, ma con l'accorgimento di distinguere talee semierbacee da talee legnose. Il materiale propagativo è stato prelevato dagli indivi-

dui presenti a Tricase Porto. Da rami di 2 o più anni, con diametro del fusto maggiore di 10 mm, sono state realizzate talee lunghe 10-18 cm; da rami di 1 anno, con diametro inferiore a 10 mm, sono state realizzate talee lunghe 7-12 cm. Il prelievo è stato effettuato sia all'inizio dell'autunno (5 ottobre 2010) che alla fine della stagione invernale (5 marzo 2011). Le talee sono state messe a radicare (senza aggiunta di ormoni) in substrato costituito da un mixer di torba e perlite in rapporto 1:2, in vasi in PVC delle dimensioni 7x7x18 cm fatti stazionare poi in tunnel freddo. Dopo 30 giorni veniva registrato l'attecchimento delle talee. I risultati definitivi hanno evidenziato il seguente andamento: in autunno, per quelle prelevate da rami di 2 anni, è stata registrata una percentuale del 74% e per quelle prelevate da rami di 1 anno del 64%; in primavera, per le talee più legnose è stata registrata una percentuale di attecchimento pari al 95% e per quelle meno legnose dell'86%. Ancora una volta i risultati dimostrano la facilità di propagazione vegetativa della specie; inoltre, anche se i valori differiscono di poco, si deduce che il periodo migliore per il taleaggio di *L. monopetalum* è a fine stagione primaverile, con rami vecchi di almeno 2 anni (Tab. 1).

TABELLA 1

Risultati della propagazione *ex situ*.
Results of *ex situ* propagation.

stagione	talee di partenza 72	% di radicazione dopo 30 gg
autunno	Ø 10 mm	64%
	Ø 10-20 mm	74%
primavera	Ø 10 mm	86%
	Ø 10-20 mm	95%

I racemi di *L. monopetalum*, dopo la fioritura, persistono sulla pianta per lungo tempo (anche sino all'inverno), per cui sono stati effettuati periodici prelievi dei frutti per l'estrazione dei semi al fine di definire il periodo di piena maturazione. Un primo prelievo dei frutti è stato effettuato in ottobre; i semi sono stati opportunamente isolati, previa rottura della capsula, ed una parte di essi è stata sottoposta a vernalizzazione (4 °C per 24 h) per simulare un'eventuale dormienza invernale. La semina è stata effettuata in capsule petri sterili con carta da filtro come substrato tenute in camera di crescita a 20 °C e fotoperiodo di 10 h. Sono state realizzate tre ripetizioni con 30 elementi per capsula. L'elaborazione dei dati registrati evidenzia un andamento del potere germinativo di *L. monopetalum*, secondo quanto riportato dalla Fig. 2. Il monitoraggio delle piastre ha evidenziato un potere germinativo dei semi molto basso (2-4%); questo dato è stato confermato dalla semina a spaglio effettuata in una seminiera, con substrato composto da torba e agriperlite nel rapporto 1:2. Da circa 200 semi sono emerse solo 6 plantule.



Fig. 2

Valutazione del potere germinativo.
Evaluation of the germinative power.

REINTRODUZIONE A PALUDE LA VELA

I sopralluoghi effettuati a Palude la Vela per l'individuazione di siti idonei alla reintroduzione hanno indotto alla scelta di due piccole superfici simili per condizioni di substrato, per copertura vegetale e parametri ambientali. Tali siti sono collocati su sponde opposte dell'acquitrino ed hanno un'estensione minima di 60 m². Per la messa a dimora sono state selezionate piante vigorose e sane, con un'altezza media di 48,9 ± 5,26 cm e diametro di 16,09 ± 3,04 cm. Nel mese di novembre 2011 è stata effettuata la loro messa a dimora.

Nel sito denominato "A" sono state trapiantate 15 piante, con un approssimativo sesto di impianto di 2 x 4 m; nel sito "B" sono state trapiantate 14 piante, in ordine sparso, in quanto l'area presentava numerose zone di erosione e continui dislivelli.

CONCLUSIONI

Nell'area Palude La Vela le condizioni ambientali sembrano più confacenti all'ecologia di *L. monopetalum* rispetto a Tricase Porto ed è positivo che tutte le piante abbiano attecchito e siano giunte a fioritura, ma solo fra qualche anno si potrà constatare la formazione di un eventuale popolamento con individui

fertili ed in grado di autopropagarsi e si avrà conferma del successo della reintroduzione.

LETTERATURA CITATA

- AA.VV., 2010 – *Manuale italiano interpretazione degli habitat (Direttiva 92/43 CEE)*. Ministero Ambiente e Tutela Territorio e Mare, S.B.I.
- ACCOGLI R., MEDAGLI P., MARCHIORI S., 1996 – *Limoniastrum monopetalum (L.) Boiss in Puglia (Plumbaginaceae)*. Giorn. Bot. Ital., 130: 1. 91° Congr. S.B.I., Ancona, 16-19 settembre 1996
- , 2006 – *Conservazione ex situ e reintroduzione di Limoniastrum monopetalum (L.) Boiss. sulla fascia costiera di Tricase Porto (Lecce)*. Inform. Bot. Ital., 38(Suppl. 1): 183-184.
- BARTOLO G., BRULLO S., MARCENÒ C., 1982 – *La vegetazione costiera della Sicilia sud-orientale*. AQ71/226, CNR, Roma.
- BIONDI E., BRUGIAPAGLIA E., FARRIS, E., FILIGHEDDU R., SECCHI Z., 2004 – *Halophilous vegetation of Olbia pond system (NE-Sardinia)*. Fitos., 41(1) Suppl. 1: 125-141.
- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1992 – *Lista Rossa Nazionale delle Piante d'Italia*. WWF Italia, Roma.
- GREUTER W., BURDET H.M., LONG G., 1989 – *Med-Checklist*. Vol. 4. 320 pp.
- MARINOSCI M., 1870 – *Flora Salentina*, 1: 22
- TOMEI P.E., GUAZZI E., 1993 – *Le zone umide della Toscana. Lista generale delle entità generali*. Atti Mus. Stor. Nat. Grosseto, 15: 120-135.
- TROTTER A., 1936 – *Rilievi ecologici intorno alla flora ed alla vegetazione della salina di S. Giorgio presso Taranto*. Ann. R. Ist. Sup. Agr. Portici, III, 5: 120-135.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A., 1981 – *Flora Europaea*. Vol. 3: 51.

RIASSUNTO - Nel presente lavoro vengono espone le principali azioni intraprese dall'Orto Botanico del DiSTeBA per la salvaguardia di *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss., specie ad alta vulnerabilità, inclusa nella Lista Rossa Nazionale delle Piante d'Italia. Da anni la specie viene coltivata *ex situ* nell'Orto Botanico e si è pensato di attuare la sua reintroduzione in località Palude la Vela, in un ambito territoriale di antica segnalazione ma dove attualmente risulta scomparsa. La propagazione di *L. monopetalum* è stata effettuata per via vegetativa e generativa e gli individui ottenuti sono stati reintrodotti in due siti della Palude, a diverse condizioni ambientali.

AUTORI

Rita Accogli (rita.accogli@unisalento.it), Maria Pia Bianchi, Piero Medagli, Silvano Marchiori, Orto Botanico del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali (Di.S.Te.B.A.), Università del Salento, Centro Ecotekne, Via Provinciale per Monteroni, 73100 Lecce

Piante vascolari minacciate e Liste Rosse: aggiornamento delle conoscenze in Puglia

R.P. WAGENSOMMER, P. MEDAGLI, E.V. PERRINO

ABSTRACT - *Threatened vascular plants and Red Lists: an update of knowledge in Apulia* - The Regional Red List of vascular plant species in Apulia Region has been updated, following recent knowledges of conservation, distributional and taxonomic interest.

Key words: Apulia, Red Lists, threatened species, update

INTRODUZIONE

In occasione della redazione della Checklist delle piante vascolari della Puglia (A. Albano, F. Bartolucci, F. Conti, P. Medagli, R.P. Wagensommer, in prep.), è stato aggiornato l'elenco delle specie minacciate in questa Regione.

Le Liste Rosse Regionali (CONTI *et al.*, 1997) riportavano per la Puglia 180 entità. Da allora sono trascorsi più di 15 anni. Alcune di queste entità erano indicate in Puglia per errore e altre sono considerate oggi sinonimi di entità non minacciate, mentre numerose specie della Lista Rossa Nazionale sono state rinvenute in Puglia solo dopo il lavoro di CONTI *et al.* (*op. cit.*). Per questo motivo abbiamo ritenuto utile aggiornare l'elenco delle specie di Lista Rossa della Regione Puglia e integrarlo con tutte le entità endemiche pugliesi ed esclusive della Regione (presenti in Italia solo in Puglia).

RISULTATI

Il Libro Rosso delle Piante d'Italia (CONTI *et al.*, 1992) riportava 458 specie e sottospecie di piante vascolari sottoposte a vari gradi di minaccia a livello nazionale. Di queste entità, 46 sono attualmente note in Puglia (Tab. 1). Considerando anche le Liste Rosse Regionali (CONTI *et al.*, 1997), il numero di *taxa* minacciati a livello nazionale e presenti in Puglia sale a 89 entità certamente presenti (di cui 1 dubitativamente alloctona) e 8 dubitativamente presenti nella Regione, mentre il numero di entità indicate come minacciate a livello Regionale è pari a 158 (di cui 1 dubitativamente alloctona), alle quali si aggiungono 4 entità dubitativamente presenti nella Regione, per un totale di 188 entità (Tab. 1).

Le specie esclusive della Puglia, cioè quelle presenti in Italia solo in questa Regione, sono 54, di cui 2 dubitativamente alloctone, alle quali si aggiungono 6 entità la cui presenza è dubbia. Di queste 54 entità, 35 sono endemiche pugliesi (Tab. 1).

Pertanto, le specie di Lista Rossa in Puglia, integrate con tutte le endemiche pugliesi e le esclusive della Regione, sono 221 (Tab. 1), pari al 9,3% della flora vascolare autoctona pugliese.

DISCUSSIONE

Il Libro Rosso e le Liste Rosse delle Piante d'Italia (CONTI *et al.*, 1992, 1997), pur essendo stati seguiti da altri lavori riguardanti le piante minacciate del nostro Paese (PIGNATTI *et al.*, 2001; SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005), sono ancora oggi il riferimento principale per le specie a rischio di estinzione in Italia. Negli ultimi anni, l'impulso alla realizzazione di una nuova Lista Rossa delle Piante d'Italia, secondo i più recenti criteri IUCN (2001, 2011), è stato dato dalla rubrica pubblicata sull'Informatore Botanico Italiano "Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana" e dal progetto appena concluso e realizzato dalla Società Botanica Italiana per conto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare relativo alla valutazione nazionale della categoria di rischio di estinzione per più di 300 specie vegetali di interesse conservazionistico e di ambienti/habitat particolarmente minacciati (ROSSI *et al.*, 2013). Attualmente questi progetti hanno portato alla valutazione del grado di minaccia di 40 specie vascolari presenti in Puglia. È auspicabile, pertanto, il contributo di tutti

TABELLA 1
 Piante vascolari endemiche, esclusive e di Lista Rossa della Regione Puglia.
 Endemic, exclusive and Red List vascular plants in Apulia Region.

N. Entità	Sinonimi	Endemiche pugliesi	Esclusive pugliesi in Italia	Libro Rosso Italia (Conti et al., 1992)	Lista Rossa Italia (Conti et al., 1997)	Lista Rossa Puglia (Conti et al., 1997)	Stato di presenza in Puglia	N.
1 Agrostemma githago L.							P	1
2 Adrovanda vesiculosa L.							NC	2
3 Allium apulum Brullo, Guglielmo, Pavone & Salmeri		X		E	CR		P	3
4 Allium atroviolaceum Boiss.						VU	P	4
5 Allium cyrilli Ten.					CR	CR	P	5
6 Allium diomedaeum Brullo, Guglielmo, Pavone & Salmeri		X					P	6
7 Allium gargaricum Brullo, Pavone, Salmeri & Terrasi		X					P	7
8 Allium lehmannii Lojac.					LR		D	8
9 Allium moschatum L.	Allium pallens L. subsp. siciliense Stearn					CR	P	9
10 Althenia filiformis Petri subsp. filiformis				V	VU	CR	P	10
11 Alyssum diffusum Ten. subsp. gargaricum Spaniel, Marmold, N.G. Passal. & Zozomová-Línová		X		V	EN	EN	P	11
12 Anacamptis palustris (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase	Orchis palustris Jacq.				VU	VU	NC	12
13 Anthemis chia L.				R	LR	CR	P	13
14 Anthemis hydruntina H. Groves subsp. hydruntina						VU	P	14
15 Anthyllis barba-jovis L.		X				EN	P	15
16 Anthyllis hermanniae L. subsp. japygica Brullo & Giusso		X				EN	P	16
17 Arum apulum (Carano) P.C. Boyce		X			CR	CR	P	17
18 Arum cylindraceum Gasp.	Arum lucanum Cavara & Grande				LR	EN	P	18
19 Asperula garganica Huter, Porta & Rigo ex Ehrend. & Krendl		X			CR	CR	P	19
20 Asperula staliana Vis. subsp. diomedea Korica, Lausi & Ehrend.		X			CR	CR	P	20
21 Asphodelus tenuifolius Cav.					CR	VU	P	21
22 Asplenium sagittatum (DC.) Bange	Phyllitis sagittata (DC.) Guinea & Hetwood			V	VU		NC	22
23 Asteriscus aquaticus (L.) Less.						VU	P	23
24 Aubrieta columnae Guss. subsp. columnae						VU	NC	24
25 Aubrieta columnae Guss. subsp. italica (Boiss.) Mattf.		X				VU	P	25
26 Aurinia leucadea (Guss.) K. Koch				R	EN	EN	P	26
27 Aurinia sinuata (L.) Griseb.	Alyssoides sinuata (L.) Medicus					VU	P	27
28 Baidellia ranunculoides (L.) Parl.					CR		P	28
29 Bellevalia ciliata (Cinillo) T. Nees					CR		NC	29
30 Berteroa obliqua (Sm.) DC. subsp. obliqua					LR	VU	P	30
31 Biscutella ambigua DC.							D	31
32 Biscutella incana Ten.	Biscutella nicaeensis Jord			V	DD	DD	NC	32
33 Bonania graeca (L.) Halácsy						CR	P	33
34 Bromus parvispiculatus H. Scholz	Athamanta macedonica (L.) Spreng						P	34
35 Bubon macedonicum L.			X				NC	35
36 Bufonia tenuifolia L.		X			VU	CR	P	36
37 Campanula garganica Ten. subsp. garganica		X			EN	EN	P	37

(segue Tab. 1)

85	<i>Eryngium pusillum</i> L.	Eryngium barrileri Boiss.							VU	P	85
86	<i>Eudianthe laeta</i> Rchb. ex Willk.	<i>Silene laeta</i> (Alton) Godr.							CR	P	86
87	<i>Euphorbia ceratocarpa</i> Ten.								VU	P	87
88	<i>Euphorbia palustris</i> L.								EW	D	88
89	<i>Falcaria vulgaris</i> Bernh.								CR	NC	89
90	<i>Fumana scoparia</i> Pomet									P	90
91	<i>Gagea apulica</i> Peruzzi & J.-M. Tison	<i>Gagea mauntanica</i> auct. Fl. Ital.							CR	P	91
92	<i>Gagea granatellii</i> (Pari.) Pari.								DD	P	92
93	<i>Gagea peduncularis</i> (J. Presl & C. Presl) Pascher									P	93
94	<i>Genista monspessulana</i> (L.) L.A.S. Johnson	<i>Teline monspessulana</i> (L.) K. Koch							EN	P	94
95	<i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br.								VU	P	95
96	<i>Halopeplis amplexicaulis</i> (Vahl) Ces., Pass. & Gibelli	<i>Salicornia amplexicaulis</i> Vahl							VU	P	96
97	<i>Helianthemum sessiliflorum</i> (Desf.) Pers.								EN	P	97
98	<i>Heilenocarum multiflorum</i> H. Wolff								LR	P	98
99	<i>Heptaptera angustifolia</i> (Bertol.) Tutin	<i>Carum multiflorum</i> (Sm.) Boiss.							VU	D	99
100	<i>Hydrocotyle vulgaris</i> L.								EN	P	100
101	<i>Inula helenium</i> L.								EN	P	101
102	<i>Inula verbascifolia</i> (Willd.) Hausskn.								VU	P	102
103	<i>Ionopsidium albidiflorum</i> Durieu								VU	P	103
104	<i>Ipomoea sagittata</i> Poir.								EN	P	104
105	<i>Iris bicapitata</i> Colas.								EN	P	105
106	<i>Iris revoluta</i> Colas.								CR	P	106
107	<i>Isoetes histrix</i> Bory								LR	P	107
108	<i>Isoetes velata</i> A. Braun subsp. <i>velata</i>								VU	P	108
109	<i>Juncus littoralis</i> C.-A. Mey.								EN	P	109
110	<i>Juncus pygmaeus</i> Rich. ex Thuill.								EN	P	110
111	<i>Juncus valvatus</i> Link subsp. <i>valvatus</i>								EN	P	111
112	<i>Klasea flavescens</i> (L.) Holub subsp. <i>mucronata</i> (Desf.) Cantó & Rivas Mart.								LR	D	112
113	<i>Kosteletzkya pentacarpos</i> (L.) Ledeb.								CR	NC	113
114	<i>Lagoecia cuminoides</i> L.									D	114
115	<i>Lagurus ovatus</i> L. subsp. <i>nanus</i> (Guss.) Messeri								VU	P	115
116	<i>Limoniastrum monopetalum</i> (L.) Boiss.								VU	P	116
117	<i>Limonium apulum</i> Brullo								CR	P	117
118	<i>Limonium avei</i> (De Not.) Brullo & Erben								VU	NC	118
119	<i>Limonium bellidifolium</i> (Gouan) Dumort.								VU	P	119
120	<i>Limonium diomedaeum</i> Brullo									P	120
121	<i>Limonium japygicum</i> (H. Groves) Pignatti									P	121
122	<i>Limonium peuceletium</i> Pignatti								CR	NC	122
123	<i>Linaria dalmatica</i> (L.) Mill.								EN	D	123
124	<i>Linum austracum</i> L. subsp. <i>tommasinii</i> (Rchb.) Greuter & Burdet	<i>Linum tommasinii</i> Rchb.							VU	P	124
125	<i>Linum maritimum</i> L. subsp. <i>maritimum</i>								EN	P	125
126	<i>Listera ovata</i> (L.) R. Br.								CR	P	126
127	<i>Lomelosia brachiata</i> (Sm.) Greuter & Burdet								VU	P	127
128	<i>Lomelosia crenata</i> (Cirillo) Greuter & Burdet subsp. <i>dallaportae</i> (Boiss.) Greuter & Burdet	<i>Tremastelma palaestinum</i> (L.) Jandh							CR	P	128
129	<i>Lotus conjugatus</i> L. subsp. <i>requienii</i> (Mauri ex Sanguin.) Greuter	<i>Scabiosa dallaportae</i> Heldr.							EW	NC	129
130	<i>Lupinus luteus</i> L.								EW	NC	130
131	<i>Lythrum thymifolia</i> L.								EN	P	131

i botanici pugliesi, affinché sia possibile valutare secondo i criteri più recenti dell'IUCN (*op. cit.*) un numero molto maggiore di specie.

L'elenco riportato in Tab. 1 include tutte le specie endemiche pugliesi ed esclusive della Puglia. Di queste entità, 33 non venivano indicate nelle Liste Rosse Regionali (CONTI *et al.*, 1997). Esse sono state incluse in Tab. 1 in via precauzionale, ma in molti casi il loro effettivo grado di minaccia deve ancora essere valutato. L'elenco non include, invece, le categorie di minaccia indicate in ROSSI *et al.* (2013), che saranno oggetto di un futuro contributo sulle specie di interesse conservazionistico in Puglia.

CONCLUSIONI

L'aggiornamento delle conoscenze floristiche in Puglia e le informazioni tassonomiche, nomenclaturali e distributive pubblicate nel corso degli ultimi anni, hanno consentito un aggiornamento delle Liste Rosse delle Piante vascolari della Regione Puglia, ma ancora molto lavoro deve essere svolto per meglio definire il numero di specie a rischio e il loro effettivo grado di minaccia secondo i più recenti criteri internazionali (IUCN, *op. cit.*).

LETTERATURA CITATA

CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1992 – *Libro Rosso delle Piante d'Italia*. Ministero Ambiente, WWF Italia,

Società Botanica Italiana, Roma.

—, 1997 – *Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia*. WWF Italia, Società Botanica Italiana, CIAS, Camerino.

IUCN, 2001 – *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland (Switzerland) & Cambridge (U.K.), II+30 pp.

—, 2011 – *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria*. Version 9.0. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee. <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>.

PIGNATTI S., MENEGONI P., GIACANELLI V. (a cura di), 2001 – *Liste rosse e blu della flora italiana*. ANPA, Roma.

ROSSI G., MONTAGNANI C., GARGANO D., PERUZZI L., ABELI T., RAVERA S., COGONI A., FENU G., MAGRINI S., GENNAI M., FOGGI B., WAGENSOMMER R.P., VENTURELLA G., BLASI C., RAIMONDO F.M., ORSENIGO S. (Eds.), 2013 – *Lista Rossa della Flora Italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate*. Comitato Italiano IUCN, Ministero Ambiente e Tutela Territorio e Mare. Roma. 54 pp.

SCOPPOLA A., SPAMPINATO G. (Eds.), 2005 – *Atlante delle specie a rischio di estinzione* (CD-ROM). Allegato a: A. SCOPPOLA, C. BLASI (Eds.), *Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia*. Palombi Ed., Roma.

RIASSUNTO – È stata aggiornata la Lista Rossa Regionale delle piante vascolari della Regione Puglia, secondo le più recenti conoscenze in ambito conservazionistico, distributivo e tassonomico.

AUTORI

Robert Philipp Wagensommer (robwagensommer@yahoo.it), Scuola di Scienze Ambientali, Università di Camerino - Centro Ricerche Floristiche dell'Appennino (Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga), San Colombo, 67021 Barisciano (L'Aquila)

Piero Medagli (pietro.medagli@unile.it), Laboratorio di Botanica Sistemica del Di.S.Te.B.A., Università del Salento, Via Provinciale Lecce-Monteroni, 73100 Lecce

Enrico Vito Perrino (enricoperrino@yahoo.it), Museo Orto Botanico, Università di Bari "Aldo Moro", Via E. Orabona 4, 70124 Bari

Meccanismi di resistenza alla verticilliosi e caratterizzazione di varietà meridionali di olivo: dati preliminari sulla fisiologia dell'interazione olivo *Verticillium dahliae*

G.L. BRUNO, C. FASCIANO, M.P. IPPOLITO, S. SERMANI, A.D. MARSICO, C. COLELLA, M. AMENDUNI, F. TOMMASI

ABSTRACT - *Mechanisms of resistance to olive Verticillium wilt and characterization of olive varieties from southern: preliminary data on physiology of olive - Verticillium dahliae interaction* - Inoculations experiment were performed with two strains of *Verticillium dahliae* characterized as defoliating (VD312D) or not defoliating (VD315ND) pathotypes, 'Frantoio' (resistant) and 'Leccino' (susceptible) olive plants. The interaction plant/pathogen was evaluated as: total phenols, carotenoids, chlorophylls, hydrogen peroxide, ascorbic acid, generic peroxidases, and ascorbate peroxidase activity. Inoculated plants showed the typical pathway associate to a stress. The two pathotypes are also able to produce *in vitro* phytotoxins. Some of these secondary metabolites should be involved on biochemical and physiological alterations associated to *Verticillium* wilt symptoms on olive trees (leaves wilting and defoliation).

Keywords: fenoli totali, metaboliti secondari, stato redox, verticilliosi

INTRODUZIONE

Verticillium dahliae Kleb. è un fungo tracheomicotico responsabile della più grave malattia dell'olivo (*Olea europaea* L.), soprattutto negli oliveti dei Paesi mediterranei. Questo fungo, oltre l'olivo, attacca più di 300 specie di piante arboree ed erbacee. La malattia determina generalmente il disseccamento di porzioni della chioma (BEJARANO-ALCÁZAR *et al.*, 2001; PEGG, BRADY, 2002; BUBICI, CIRULLI, 2011). Isolati di *V. dahliae* in grado di infettare cotone e olivo possono essere classificati in due patotipi, defogliante e non-defogliante sulla base della loro abilità o meno di indurre defogliazione nelle piante infette (MERCADO-BLANCO *et al.*, 2001, 2003). Il presente lavoro propone studi preliminari su: i) alcune risposte fisiologiche in due cultivar di olivo caratterizzate da differenti livelli di suscettibilità alla verticilliosi; ii) alcuni determinanti di patogenicità potenzialmente coinvolti nell'induzione dei sintomi fogliari prodotti da patotipi diversi di *V. dahliae*.

MATERIALI E METODI

Alterazioni fisiologiche

Piante di olivo delle cultivar 'Frantoio' (resistente) e 'Leccino' (susceptibile) sono state inoculate con gli isolati VD312D (defogliante) e VD315ND (non defogliante) seguendo il metodo descritto da CIRULLI

et al. (2008). Piante non trattate e piante le cui radici sono state immerse per 10 minuti in acqua sono state utilizzate come tesi di controllo. Sono stati valutati il contenuto di fenoli, carotenoidi, clorofilla, perossido d'idrogeno, ascorbato e l'attività delle perossidasi generiche (POD) e dell'ascorbato perossidasi (APX) in foglie delle due cultivar raccolte dopo 24, 72 e 240 ore dal trapianto applicando i metodi proposti da CHANDLER, DODDS (1983), LICHTENTHALER (1987), BRUNO, SPARAPANO (2006), TOMMASI *et al.* (2006), PARADISO *et al.* (2008). Tre mesi dopo l'inoculazione, su ogni pianta è stata valutata la presenza di malattia sulla chioma utilizzando la scala di severità dei sintomi proposta da COLELLA *et al.* (2008). L'analisi statistica dei dati è stata eseguita attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) Le medie sono state separate con il test della minima differenza significativa (MDS).

Produzione di metaboliti secondari fitotossici

Culture liquide statiche degli isolati VD312D e VD315ND di *V. dahliae* sono state allestite in tre differenti soluzioni nutritive: Czapek modificato (VdM), Patate Destrosio Broth (PDB, Difco) o Acqua Estratto di Malto (Oxoid) al 2% (EM2). Per ciascun isolato e substrato sono state preparate 10 bottiglie di Roux della capacità di 1 L contenenti

150 ml di soluzione nutritiva. Ciascuna bottiglia è stata inoculata con 5 ml di sospensione ottenuta omogeneizzando tre colonie (coltivate per due settimane in piastre Petri su substrato di PDA a 25 °C al buio) in 50 ml di acqua distillata sterile. Dopo 28 giorni di coltura (25 °C, al buio), il micelio è stato rimosso mediante filtrazione su garza e centrifugazione (5500 *xg*, 20 min, 4 °C). Aliquote (3 ml) di ciascun filtrato colturale (FC), integro o diluito (10, 100 e 1000 volte con acqua distillata) sono state utilizzate in saggi di tossicità su rametti recisi di 'Leccino' e 'Frantoio' eseguiti in ambiente controllato (UR: 50%, T: 25 °C, luce: 150 $\mu\text{E cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Acqua distillata e substrato non inoculato sono stati utilizzati come controllo. Dal terzo giorno dopo l'assorbimento delle soluzioni tossiche, è stata osservata la manifestazione dei sintomi. Dopo 24, 72 e 240 ore dall'assorbimento delle soluzioni saggiate, le foglie di ciascun rametto sono state caratterizzate in termini di flusso traspiratorio utilizzando un porometro LI-1600-LiCor. Negli stessi intervalli è stato valutato il contenuto in clorofilla e fenoli seguendo i metodi proposti in precedenza.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Alterazioni fisiologiche

Per entrambi i patotipi di *V. dahliae* saggiati, l'induzione di uno stato di malessere nella pianta è confermata dalla riduzione nel contenuto di clorofille, soprattutto dopo 24 ore. Per la cultivar suscettibile, 'Leccino' (Fig. 1), invece, il contenuto di ascorbato, clorofille e carotenoidi ha subito un incremento soprattutto nei campioni di foglie prelevate dopo 72 e 240 ore dall'inoculo con il patotipo defogliante. Le analisi condotte sulle foglie di 'Frantoio' e 'Leccino' hanno mostrato come la molecola segnale, perossido d'idrogeno, risulta maggiormente presente nella cultivar Frantoio dopo 72 ore dall'inoculo con il patotipo defogliante (Fig. 1), mentre l'attività della APX segna, negli stessi tempi, un decremento (Fig. 2).

Invece, nella cultivar Frantoio, i sistemi antiossidanti non enzimatici, hanno mostrato un calo rispetto ai controlli nei livelli di ascorbato e di fenoli (Fig. 1). Non si sono osservate variazioni nell'attività della catalasi (Fig. 2). Infatti, come dimostrato in altri sistemi, nei tessuti vegetali questo enzima svolge un ruolo nel metabolismo del perossido di idrogeno secondario rispetto all'APX, che invece è l'enzima chiave nel controllo della concentrazione in perossido di idrogeno (DE GARA *et al.*, 2003). L'attività delle POD, infine, aumenta notevolmente nelle fasi tardive dell'infezione nelle foglie di 'Frantoio', mentre in quelle di 'Leccino' un incremento è evidente 72 ore dall'inoculo (Fig. 2).

I dati evidenziati nelle nostre condizioni sperimentali sono in linea con quanto riportato dalla letteratura riguardo alle interazioni pianta-patogeno e le risposte da stress abiotici (DE GARA *et al.*, 2003). Infatti, nelle piante resistenti si assiste a una modulazione dei sistemi antiossidanti tale da causare un incremento di perossido di idrogeno a livello fogliare (DE GARA *et al.*, 2003). Per contro, nella varietà suscettibile, l'au-

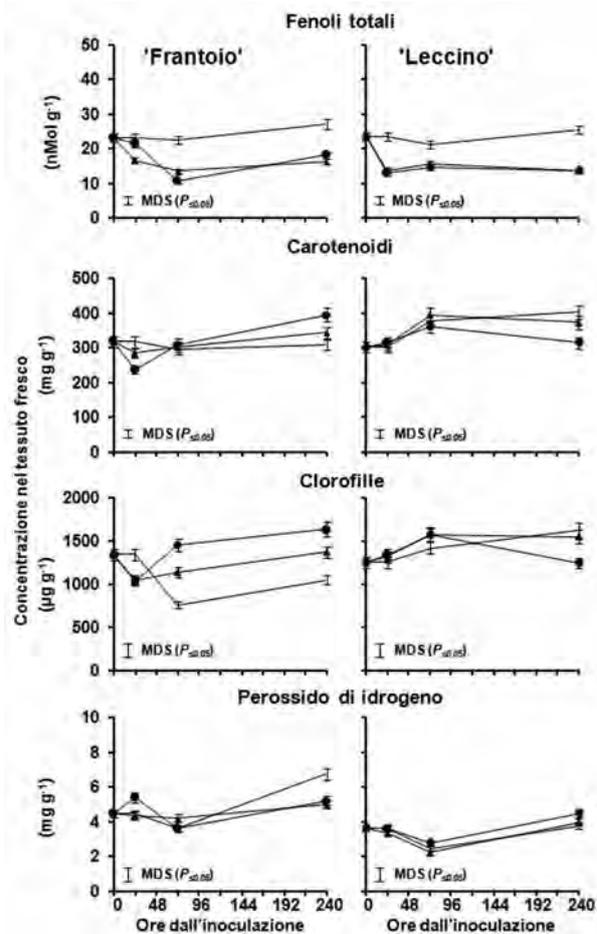


Fig. 1

Contenuto in fenoli, carotenoidi, clorofille e perossido di idrogeno in foglie di 'Frantoio' e 'Leccino' dopo 24, 72 e 240 ore dall'inoculo con VD312D (▲) e VD315ND (●). I controlli sono rappresentati da piante le cui radici sono state immerse per 10 minuti in acqua (—). Ciascun valore è la media di cinque piante.

Phenols, carotenoids, chlorophylls and hydrogen peroxide content in leaves of 'Frantoio' and 'Leccino' after 24, 72, and 240 hours after inoculation with VD312D (▲) and VD315ND (●). As controls plants were treated for 10 minutes in water (—). Each value is the mean of five plants.

mento dei livelli in antiossidanti non enzimatici non è sufficiente a indurre resistenza. La diversa risposta ai sistemi antiossidanti riscontrata nelle due varietà utilizzate in queste prove potrebbe essere considerata come un marker biochimico per valutare lo stato di avanzamento dell'infezione e il suo destino prima della comparsa dei sintomi.

Evoluzione dei sintomi

A conferma di quanto già riscontrato da CIRULLI *et al.* (2008), 'Frantoio' e 'Leccino' sono risultate rispettivamente resistenti e suscettibili ai due isolati di *V. dahliae* utilizzati. Nessun sintomo è stato registrato e sulle piante utilizzate come controllo (piante non trattate e piante le cui radici sono state immerse per

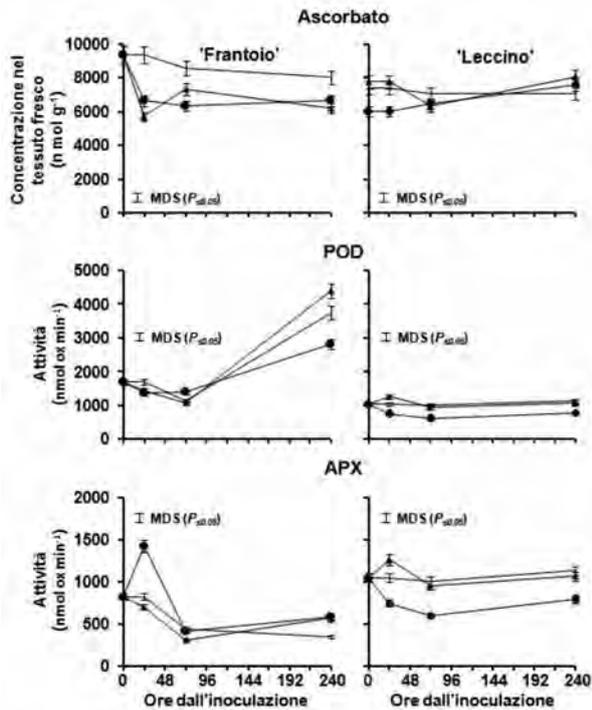


Fig. 2

Contenuto in ascorbato e attività delle perossidasi generiche (POD) e dell'ascorbato perossidasi (APX) in foglie di 'Frantoio' e 'Leccino' dopo 24, 72 e 240 ore dall'inoculo con VD312D (▲) e VD315ND (●). I controlli sono rappresentati da piante le cui radici sono state immerse per 10 minuti in acqua (—). Ciascun valore è la media di cinque piante.

Ascorbic acid concentration and peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) activity in leaves of 'Frantoio' and 'Leccino' after 24, 72, and 240 hours after inoculation with VD312D (▲) and VD315ND (●). As controls plants were treated for 10 minutes in water (—). Each value is the mean of five plants.

10 minuti in acqua) e sulle chiome di 'Frantoio' inoculate con il patotipo non defogliante. Il patotipo defogliante ha causato, su 'Frantoio', una modesta defogliazione. Le piante di 'Leccino' hanno espresso sintomi gravi con entrambi i patotipi (generale avvizzimento della chioma), aggravati nel caso del patotipo defogliante da accentuata e rapida filloptosi.

Metaboliti secondari fitotossici

Gli isolati di *V. dahliae* utilizzati in coltura liquida su substrato VdM hanno permesso di ottenere FC che, saggiate su rametti recisi di 'Leccino' (suscettibile) e 'Frantoio' (resistente), hanno riprodotto sintomi di avvizzimento e accartocciamento fogliare e defogliazione. Nessun sintomo è stato registrato sui rametti che hanno assorbito acqua distillata e i substrati non inoculati. L'assorbimento dei 3 ml di soluzione da parte dei rametti ha richiesto 30-32 ore per acqua, VdM, PDB e EM2, mentre i FC dei due isolati sono stati assorbiti in 17-24 ore.

I FC dei patotipi VD312D o VD315ND di *V. dahliae* ottenuti su substrato VdM, saggiate su entrambe

le cultivar di olivo, hanno evidenziato sintomi da 7-9 giorni dopo l'assorbimento. I FC ottenuti su substrato VdM da entrambi i patotipi inducono ripiegamento e successivo imbrunimento della lamina fogliare sui rametti di 'Frantoio'. Sui rametti di 'Leccino' sono stati registrati ingiallimenti della lamina fogliare inizialmente intorno alle nervature e, dopo 3-5 giorni, sull'intera superficie. Sintomo finale dei FC di entrambi gli isolati di *V. dahliae* dopo 28 giorni di coltura su substrato di VdM è stata una generale defogliazione dei rametti. Su 'Leccino' la defogliazione è stata severa e si è avuta dopo 17 giorni sui rametti trattati con il FC dell'isolato VD312D CF, e dopo 21 giorni su 'Frantoio'. I rametti trattati con i FC di VD315ND sono stati registrati dopo 20 giorni su 'Leccino' e dopo 25 giorni su 'Frantoio'. I sintomi sopra descritti sono stati osservati anche sui rametti che hanno assorbito i FC dei due isolati dopo diluizione di 10 e 100 volte con acqua distillata.

I FC ottenuti dai due patotipi su substrato VdM sono stati confrontati sulle due cultivar, per i loro effetti sul flusso traspiratorio e sulle variazioni in fenoli e clorofille presenti nelle foglie (Fig. 3).

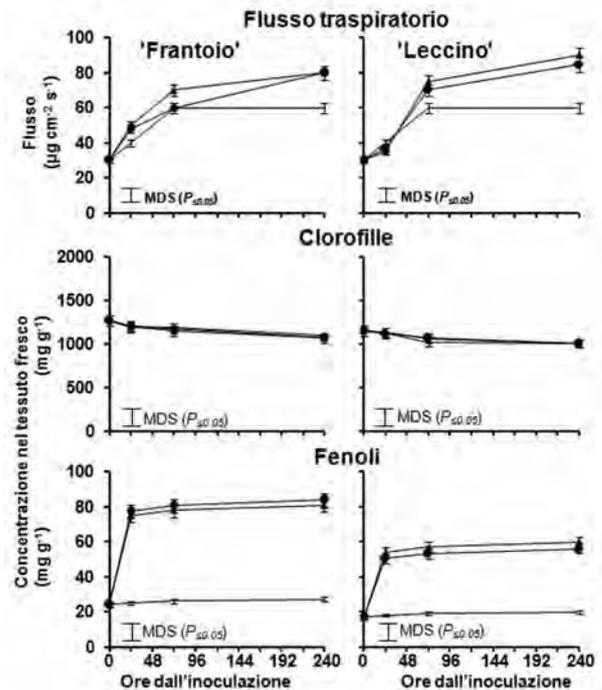


Fig. 3

Effetti sulla traspirazione e sul contenuto in clorofille e fenoli in foglie di 'Frantoio' e 'Leccino' dopo 24, 72 e 240 ore dall'assorbimento di 3 ml di filtrato culturale degli isolati VD312D (▲) e VD315ND (●) su substrato VdM. I controlli hanno assorbito 3 ml di acqua (—). Ciascun valore è la media di cinque rametti recisi.

Transpiration from abaxial leaf surfaces and chlorophylls and phenols content in leaves of 'Frantoio' and 'Leccino' after 24, 72, and 240 hours after the absorption of 3 ml of VD312D (▲) and VD315ND (●) culture filtrates on VdM. As controls twigs adsorbed 3 ml of water (—). Each value is the mean of five twigs.

Le misure di traspirazione (Fig. 3) dimostrano un forte incremento nel flusso traspiratorio nei rametti recisi che hanno assorbito i FC ottenuti dal patotipo VD312D rispetto a quelli ottenuti dal VD315ND e dalle tesi di controllo. Nessuna differenza è stata registrata nel contenuto in clorofilla. Solo la concentrazione in fenoli nelle foglie dei rametti recisi che hanno assorbito i FC ottenuti dai due isolati è risultata circa tre volte superiore rispetto ai rametti delle tesi di controllo totali (Fig. 3).

In definitiva, appare chiaro che nell'interazione *V. dahliae* e olivo entrino in gioco fattori chimici di virulenza del patogeno (fitotossine) che contribuiscono alla patogenesi e alla manifestazione dei sintomi ed inducano nell'ospite condizioni di stress. In questo stato, la pianta ospite manifesterà in parte o *in toto* le alterazioni biochimiche e fisiologiche determinatesi nei tessuti attraverso i sintomi.

Ringraziamenti - Gli Autori ringraziano i collaboratori Luca Scarola, Valentino Poliseo, Nicola Contursi e Aniello Rescigno (Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro) per il valido supporto tecnico nella realizzazione delle prove. Lavoro realizzato con il contributo della Fondazione Cassa di Risparmio di Puglia Bando 2010 - Progetto *Meccanismi di resistenza alla verticilliosi e caratterizzazione di varietà meridionali di olivo*.

LETTERATURA CITATA

- BEJARANO-ALCÁZAR J., PÉREZ-ARTÉS E., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M., 2001 - *Spread of the defoliating pathotype of Verticillium dahliae to new cotton and olive growing areas in Southern Spain*. In: *Proceedings 8th International Verticillium Symposium*, Córdoba 2001, 57.
- BRUNO G., SPARAPANO L., 2006 - *Effects of three esca-associated fungi on Vitis vinifera L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines*. *Physiol. Mol. Plant Path.*, 69: 195-208.
- BUBICI G., CIRULLI M., 2011 - *Verticillium wilt*. In: SCHENA L., AGOSTEO G.E., CACCIOLA S.O. (Eds), *Olive diseases and disorders*: 191-222. Transworld Research Network, Kerala, India.
- CHANDLER S.F., DODDS J.H., 1983 - *The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasodine in callus cultures of Solanum laciniatum*. *Plant Cell Rep.*, 2: 205.
- CIRULLI M., COLELLA C., D'AMICO M., AMENDUNI M., BUBICI G., 2008 - *Comparison of screening methods for the evaluation of olive resistance to Verticillium dahliae*. *Kleb. J. Plant Path.*, 90(1): 7-14.
- COLELLA C., MIACOLA C., AMENDUNI M., D'AMICO M., BUBICI G., CIRULLI M., 2008 - *Sources of Verticillium wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region*. *Plant Path.*, 57: 533-539.
- DE GARA L., DE PINTO M.C., TOMMASI F., 2003 - *The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction*. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 863-870.
- LICHTENTHALER H.K., 1987 - *Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic bio-membranes*. *Methods Enzymol.*, 148: 351-383.
- MERCADO-BLANCO J., COLLADO-ROMERO M., PARRILLA-ARAUJO S., RODRÍGUEZ-JURADO D., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M., 2003 - *Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by Verticillium dahliae pathotypes with real-time polymerase chain reaction*. *Physiol. Mol. Plant Path.*, 63: 91-105.
- MERCADO-BLANCO J., RODRÍGUEZ-JURADO D., PÉREZ-ARTÉS E., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M., 2001 - *Detection of the nondefoliating pathotype of Verticillium dahliae in infected olive plants by nested PCR*. *Plant Path.*, 50: 609-619.
- PARADISO A, BERARDINO R., DE PINTO M.C., SANITÀ DI TOPPI L., STORELLI M.M., TOMMASI F., DE GARA L. 2008 - *Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants*. *Plant Cell Physiol.*, 49: 362-374.
- PEGG G.F., BRADY B.L., 2002 - *Verticillium Wilts*. CABI Publishing, Wallingford.
- TOMMASI F., PACIOLLA C., DE PINTO M.C., DE GARA L. 2006 - *Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in Ginkgo biloba L. seeds*. *Plant Physiol. Biochem.*, 44: 359-368.
- RIASSUNTO - Due ceppi di *Verticillium dahliae* caratterizzati come patotipo defogliante (VD312D) o non defogliante (VD315ND) e piante di olivo delle cultivar 'Frantoio' (resistente) e 'Leccino' (suscettibile) sono stati utilizzati in prove di inoculazione artificiale focalizzate allo studio fisiologico delle interazioni pianta patogeno. La diversa risposta riscontrata nelle due varietà in termini di fenoli, carotenoidi, clorofilla, perossido di idrogeno, ascorbato, perossidasi generiche e ascorbato perossidasi indica uno stato di stress. Fitotossine prodotte *in vitro* dai due patotipi sembrano essere coinvolte nelle alterazioni biochimiche e fisiologiche alla base delle tipiche sintomatologie della verticilliosi su olivo (avvizzimento generale della chioma e defogliazione).

AUTORI

Giovanni Luigi Bruno (giovanniluigi.bruno@uniba.it), Samer Sermani, Antonio Domenico Marsico, Mario Amenduni, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.) Sezione di Patologia vegetale, Università di Bari "Aldo Moro", Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari
 Cristina Fasciano, Maria Paola Ippolito, Franca Tommasi (franca.tommasi@uniba.it), Dipartimento di Biologia, Università di Bari "Aldo Moro", Via Orabona 4, 70125 Bari
 Cecilia Colella, Dipartimento di Chimica, Università di Bari "Aldo Moro", Via Orabona 4, 70125 Bari