

**CONSERVAZIONE BIODIVERSITÀ,
GESTIONE BANCHE DATI E
MIGLIORAMENTO GENETICO
BIODATI**

a cura di *Fidalma D'Andrea*

Volume II



**Conservazione biodiversità, gestione banche dati
e miglioramento genetico – BIODATI**

**Copyright © 2013 Edizioni Nuova Cultura - Roma
ISBN: 9788868120986
DOI: 10.4458/0986**

**Copertina: a cura di Fidalma D'Andrea
Composizione grafica: a cura di Fidalma D'Andrea**

Si ringraziano Paola Giancotti e Lucia Lucera

**È vietata la riproduzione non autorizzata, anche parziale,
realizzata con qualsiasi mezzo, compresa la fotocopia,
anche ad uso interno o didattico.**

INDICE

Volume I

Premessa	1
Il quadro generale delle collezioni di germoplasma del CRA	3
Capitolo 1. Collezioni Vegetali	
ARBOREE	
La collezione ampelografica del CRA-VIT	11
La collezione di germoplasma di pregio del Centro di ricerca per la patologia vegetale (CRA-PAV): drupacee, noce, olivo e vite	21
I protocolli permanenti del CRA-SEL per la ricerca e la sperimentazione di lungo periodo nel settore forestale	33
Le collezioni di specie da frutto presenti presso l'Unità di ricerca per la frutticoltura di Caserta	81
La biodiversità frutticola del CRA-FRF: conservazione e valorizzazione	125
Le risorse genetiche del Centro di ricerca per la frutticoltura di Roma, la conservazione, la caratterizzazione e la valorizzazione	143
Valutazioni produttive e carpologiche di un trentennio di osservazioni sulla collezione varietale di mandorlo (<i>Prunus amygdalus</i> Batsch.) del CRA-SCA	167
La flora del deserto di Sonora (USA): il saguaro (<i>Carnegiea gigantea</i> [Engelm.] Britton e Rose) – Collezione del CRA-CIN	181
Il germoplasma agrumicolo del CRA-ACM di Acireale	189
Collezione di germoplasma di olivo da mensa, caratterizzazione di nuove accessioni e loro valutazione	195
La collezione del germoplasma olivicolo del CRA-OLI	205
ERBACEE	
Le risorse di germoplasma di riso presenti a CRA-RIS: una risorsa per il miglioramento genetico e per la identificazione di caratteri di importanza agronomica	245
Risorse genetiche vegetali: conservazione ed utilizzo in genomica	253
Mantenimento e valorizzazione del germoplasma di avena (<i>A. sativa</i> L.)	265
Germoplasma di lupino (<i>Lupinus albus</i> , L., <i>Lupinus angustifolius</i> L. e <i>Lupinus luteus</i> L.) in collezione presso il CRA-ACM di Acireale	271
Mantenimento, ampliamento e caratterizzazione della collezione di germoplasma di orzo (<i>Hordeum vulgare</i> L.), avena (<i>Avena sativa</i> L.) e farro (<i>Triticum monococcum</i> ssp. <i>monococcum</i> L., <i>T. dicoccum</i> Schübler, sin. <i>T. dicoccon</i> Schrank, <i>T. spelta</i> L.) conservata presso il CRA-ACM di Acireale	281
La collezione di germoplasma di frumento tenero (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>aestivum</i> L.) del CRA-ACM: iniziative di mantenimento, caratterizzazione, ampliamento e valorizzazione	297
Mantenimento, caratterizzazione e valorizzazione di una collezione di <i>Triticum</i> spp.	311
La collezione di germoplasma di specie foraggere e proteiche	321
Costituzione di semi-ibridi in <i>Medicago sativa</i>	327

Indice

Collezione TILLING di <i>Medicago truncatula</i> per studi di genomica funzionale delle leguminose	333
Collezione, mantenimento e valorizzazione di essenze vegetali autoctone mediterranee	339
Collezione, mantenimento e valorizzazione di essenze ornamentali esotiche	371
Risorse genetiche orticole	389
Collezione di farro dicocco (<i>Triticum dicoccum</i> Schübler) del CRA-CER	435
Collezione di farro spelta (<i>Triticum spelta</i> L.) del CRA-CER	453
Collezione di frumento duro (<i>Triticum durum</i> Desf.) del CRA-CER	475

Volume II

Una collezione di rosmarini ad uso prevalentemente ornamentale	489
Collezione di frumento duro in ambiente mediterraneo: germoplasma siciliano e internazionale	497
Viburno	513
Campanule: opportunità per il settore ornamentale	523
Una collezione di <i>Lilium</i> asiatici presente presso il CRA-VIV	531
Una collezione di specie del genere <i>Helichrysum</i> ad uso prevalentemente ornamentale	539
La collezione di <i>Beta</i> presso il CRA-CIN di Rovigo	549
Passiflore ornamentali	565
Caratterizzazione bioagronomica di germoplasma di avena (<i>Avena sativa</i> L.) per usi foraggeri	579
Mantenimento e valorizzazione del germoplasma di mais (<i>Zea mays</i> L.)	597

Capitolo 2. Collezioni Farmacologiche Officinali

La collezione di salvie	607
Mantenimento di una collezione di piante officinali	627

Capitolo 3. Collezioni Industriali

Collezione di semi della famiglia delle Brassicacee e loro caratterizzazione per il contenuto in glucosinolati e in acidi grassi	637
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn	657
La collezione di microrganismi d'interesse agro energetico	667
Collezione di ecotipi di canna comune (<i>Arundo donax</i> L.)	673
Costituzione, mantenimento e valorizzazione di una collezione di linee di ricino (<i>Ricinus communis</i> L.)	685
Costituzione, mantenimento e valorizzazione di una collezione di linee di girasole (<i>Helianthus annuus</i> L.)	695
Collezione di germoplasma di canapa (<i>Cannabis sativa</i> L.)	723

Capitolo 4. Collezioni Microbiologiche Batteriche

La micoteca presso il CRA-FSO: una collezione di specie e genotipi in aggiornamento dinamico	743
Collezione di microrganismi del suolo ed applicazioni biotecnologiche	749
Isolamento, caratterizzazione, conservazione e impiego agronomico di rizobi azotofissatori	779
Collezione di batteri diazotrofi ed elettrogenici isolati dal suolo	787
Collezione di microrganismi di interesse olivicolo-oleario	805
Funghi tellurici filamentosi di interesse agrario e ambientale	813
Microrganismi entomopatogeni	821
Collezione di microrganismi di interesse lattiero-caseario	831
Collezione di <i>Sinorhizobium meliloti</i>	837
L'archivio aerobiologico e la palinoteca del CRA-CMA	843
Collezione di funghi filamentosi non patogeni di interesse agro-industriale	871
La collezione di microorganismi di interesse enologico del CRA-Centro di ricerca per l'enologia di Asti	881
Collezione di linee cellulari monoclonali	895
Collezione di lieviti vinari: qualità metaboliche dei ceppi per una migliore caratterizzazione delle produzioni del territorio	903

Capitolo 5. Collezioni Zoologiche Zootecniche

Le collezioni zoologiche del Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia, Firenze	927
Storia ed interventi di conservazione del nucleo italiano del cavallo Lipizzano	943
Conservazione e valorizzazione della razza bovina Maremmana	953
La collezione di germoplasma di baco da seta (<i>Bombyx mori</i> L.) e gelso appartenente all'Unità di apicoltura e bachicoltura di Bologna, sede di Padova	961

UNA COLLEZIONE DI ROSMARINI AD USO PREVALENTEMENTE ORNAMENTALE*

Responsabile Scientifico: Dr. Claudio Cervelli

CRA-FSO Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali
Corso Inglesi, 508 – 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

Il genere *Rosmarinus* comprende 3 specie diffuse allo stato spontaneo nella parte occidentale del Bacino Mediterraneo; il *R. officinalis* è la specie di gran lunga più conosciuta ed è largamente usata e coltivata in campo medicinale, cosmetico e alimentare per il suo contenuto in metaboliti secondari ad azione antibatterica, anti-fungina e antiossidante. In campo ornamentale viene usato per la produzione di fronda recisa e di piante in contenitore ed è una delle specie più diffuse nel giardino mediterraneo; in questo settore il numero di cultivar impiegate a livello produttivo è molto limitato, a fronte della grande variabilità della specie testimoniata dall'esistenza di numerose varietà poco conosciute e di forme spontanee note solo a livello botanico. Allo scopo di caratterizzare e valorizzare il germoplasma esistente (spontaneo e non) di questo genere botanico, il CRA-FSO ha iniziato la costituzione di una collezione di specie e varietà che ammonta attualmente a 138 accessioni, mantenute come piante in contenitore in pien'aria. L'attività svolta riguarda la caratterizzazione morfologica e fenologica delle accessioni; in collaborazione con produttori del settore ornamentale viene effettuata la valutazione agronomica e l'introduzione di nuove varietà in coltivazione. E' mantenuta una costante collaborazione con istituzioni scientifiche per la caratterizzazione della variabilità fitochimica degli oli essenziali e di altri metaboliti secondari per un possibile utilizzo in campo industriale e agricolo.

Summary

The genus *Rosmarinus* includes 3 species widespread in the western part of the Mediterranean Basin; *R. officinalis* is the best known species and is widely used and grown as medicinal plant, for cosmetics and food products for its content in secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. In the ornamental field it is used for the production of cut foliage and plants in container and is one of the most common species in the mediterranean garden; in this sector the number of employed cultivars at production level is very restricted, given the great variability of the species as shown by the existence of numerous little-known varieties and spontaneous botanical forms. In order to characterize and enhance the germplasm (wild or not) of this botanical genus, the CRA-FSO has started a collection of species and varieties which currently amounts to 138 accessions, kept as container plants in outdoors. The activity concerns the morphological and phenological characterization of accessions; in collaboration with producers of ornamental sector, the agronomic evaluation and the introduction of new varieties in cultivation is carried out. A constant collaboration is maintained with scientific institutions for the characterization of phytochemistry variability of essential oils and other secondary metabolites for possible use in the industrial and agricultural sector.

Parole chiave

Valutazione, ornamentali, metaboliti, morfologia, fioritura, fisiologia, aroma, nuove colture

Keywords

Evaluation, ornamentals, metabolites, morphology, flowering,

* doi:10.4458/0986-48

1.1 Il genere *Rosmarinus*

Fa parte della famiglia delle *Lamiaceae* ed è rappresentato da tre specie arbustive o suffruticose perenni, con fogliame aromatico, originarie della zona occidentale del Bacino Mediterraneo (Sud europa e Nord Africa). La specie più nota è il *Rosmarinus officinalis*, diffuso in tutta l'area sopra citata in una varietà di habitats presenti dal livello del mare a 1500 m (Pignatti, 1982; Cervelli, 2005). È una specie pioniera di limitate esigenze idriche e dalla elevata resistenza alle alte temperature tipiche dell'estate mediterranea. È estremamente polimorfa e nell'ambito della sua naturale variabilità sono state distinte numerose entità sistematiche dalla dubbia validità (IPNI, 2012). Le altre due specie sono *R. eriocalyx* e *R. tomentosus*, a diffusione molto più ristretta di *R. officinalis*: la prima è originaria del Sud della Spagna e del Nord africa, la seconda è endemica del Sud della Spagna (Morales, 2010); ambedue formano ibridi con *R. officinalis*.

1.2 Gli usi del Rosmarino

Il *R. officinalis* è utilizzata sia come pianta culinaria, per le sue spiccate caratteristiche aromatiche e condimentarie, sia come pianta da essenza, soprattutto relativamente all'estrazione dell'olio essenziale per il quale viene ampiamente coltivata. Il rosmarino è caratterizzato anche dalla presenza di metaboliti secondari come flavonoidi ed isoprenoidi (monoterpeni, sesquiterpeni, diterpeni e triterpeni) (Croteau e Johnson, 1984 ; Kelsey *et al.*, 1984; Tomàs-Barberà e Wollenweber, 1990; Wagner, 1991; Wollenweber, 1985) che hanno dimostrato di mediare interazioni ecologiche in genere difensive con altri organismi, es. attività antinsetto (antifeedant), anti-batteriche, anti-fungine (Kelsey *et al.*, 1984; Wagner, 1991; Bell, 1981; Croteau, 1977; Muller *et al.*, 1964; Theis e Lerdau, 2003; Dweck, 2000); essi rappresentano pertanto interessanti componenti per la definizione di formulazioni agrochimiche per la difesa delle colture in sistemi agricoli biologici o integrati e promettenti molecole dotate di attività biologica nei confronti di numerosi batteri umani (Weckesser *et al.*, 2007).

Dal punto di vista della chimica degli alimenti si può sottolineare che la presenza di sostanze polifenoliche, dell'acido rosmarinico e di flavoni è causa dell'impiego delle foglie di *Rosmarinus officinalis* come antiossidante in cibi, additivi alimentari e cosmetici.

In campo ornamentale il rosmarino è utilizzato per la produzione di fronda verde recisa sia di piante in vaso (in varie dimensioni, forme e tipi di habitus), complessivamente risultando il numero di cultivar impiegate molto limitato a fronte della grande variabilità della specie. Infine, il rosmarino è una delle specie più apprezzate nel giardino mediterraneo per la sua resistenza all'aridità, la velocità di crescita, l'adattabilità alla potatura, le limitate esigenze di manutenzione; può essere usto come pianta copri suolo, piccolo arbusto o in siepi formali.

1.3 La collezione del CRA-FSO

Il CRA-FSO ha iniziato la propria attività di ricerca sul Rosmarino nel 2010 per le interessanti prospettive di multifunzionalità di questa pianta e le prospettive legate all' esplorazione della variabilità a fini produttivi.

Hanno riguardato il rosmarino il progetto INTERREG-ALCOTRA italo-francese "AROMA" (n. 68, 2010-2012) e il progetto RGV-FAO (III ciclo, 2011-2013).

Funzionale all'attività prevista dai progetti è stato l'instaurarsi di una collezione di varietà, specie e accessioni di varia origine (tra cui materiale spontaneo), con particolare riguardo a quelle dotate di caratteristiche ornamentali interessanti e con intenso aroma.

Obiettivi della collezione sono l'individuazione e valorizzazione di nuove varietà e selezioni utilizzabili per la diversificazione produttiva nel comparto delle piante in vaso, del reciso e delle piante da giardino. Un ulteriore obiettivo, perseguito in collaborazione con altre istituzioni di ricerca, è l'isolamento e caratterizzazione di sostanze naturali impiegabili in campo industriale e alimentare.

La collezione ha raggiunto attualmente le 138 accessioni (specie, ibridi, varietà e accessioni spontanee).

Tabella 1 – Elenco delle specie e varietà di rosmarino presso il CRA-FSO.

Rosmarinus officinalis f.ma alba
Rosmarinus officinalis f.ma semiprostrata
Rosmarinus officinalis var. pyramidalis
Rosmarinus officinalis 'Baie de Douarnenez'
Rosmarinus officinalis 'Barbecue'
Rosmarinus officinalis 'Barcelona'
Rosmarinus officinalis 'Beneden Blue'
Rosmarinus officinalis 'Blanc des Calanques'
Rosmarinus officinalis 'Blue Boy'
Rosmarinus officinalis 'Blue Rain'
Rosmarinus officinalis 'Boheme'
Rosmarinus officinalis 'Bonifacio'
Rosmarinus officinalis 'Boule'
Rosmarinus officinalis 'Cap Pertusato'
Rosmarinus officinalis 'Cascade d'Orleans'
Rosmarinus officinalis 'Cisampo'
Rosmarinus officinalis 'Corsican Blue' `
Rosmarinus officinalis 'Corsicus'
Rosmarinus officinalis 'Gorizia'
Rosmarinus officinalis 'Israeli'
Rosmarinus officinalis 'Joan Tesei'
Rosmarinus officinalis 'Joyce de Baggio'
Rosmarinus officinalis 'Majorcan Pink' `
Rosmarinus officinalis 'Mc Connell Blue'
Rosmarinus officinalis 'Miss Irene Renz'
Rosmarinus officinalis 'Miss Jessop's Upright'
Rosmarinus officinalis 'Montagnette'
Rosmarinus officinalis 'Porto Alabe'
Rosmarinus officinalis 'Punta di Canelle'
Rosmarinus officinalis 'Rosemarey'
Rosmarinus officinalis 'Santa Barbara Blue'
Rosmarinus officinalis 'Sappho'
Rosmarinus officinalis 'Sierra de Cazorla'
Rosmarinus officinalis 'Sissinghurst Blue'
Rosmarinus officinalis 'Sissinghurst'
Rosmarinus officinalis 'Spice Island'
Rosmarinus officinalis 'Tuscan Blue'
Rosmarinus officinalis 'Tuscany Blue'
Rosmarinus officinalis 'Ulysse'
Rosmarinus officinalis 'Vicomte de Noailles'

In foto 1 sono riportate immagini dei fiori di alcune specie e varietà in collezione presso il CRA-FSO.

Foto 1 – Alcune specie e varietà di rosmarino in collezione presso il CRA-FSO.



R.o. 'Corsicus'



R.o. 'Sierra de Cazorla'



R.o. 'Israeli'



R. o. 'Marjorca Pink'



R.o. 'Spice Island'



R.o. 'Bonifacio'



R.o. 'Barbecue'



R.o. 'Corsican Blue'



R.o. f.ma alba



R.o. 'Vicomte de Noailles'



R. x noeanus'



R. eriocalyx

La collezione di Rosmarini viene mantenuta presso la sede del CRA-FSO (43° 49' 02" N, 7° 45' 33" E) a Sanremo; le piante sono coltivate in pien'aria in contenitori di plastica (foto 2) da 30 o 60 cm di diametro.



Foto 2 – Piante in vaso della collezione dei Rosmarini presso il CRA-FSO.

Ogni accessione è rappresentata da 2 piante. L'irrigazione è effettuata tramite impianto a goccia automatizzato con programmatore a tempo. Il substrato di coltivazione è di tipo per coltivazioni vivaistiche e contiene circa il

15% di pomice diametro 7-12 mm. Quando le piante diventano troppo grandi o invecchiate per poter crescere e svilupparsi adeguatamente nei contenitori menzionati, vengono rinnovate tramite l'ottenimento di nuove piantine (tramite radicazione di talee); successive rinvasature permettono nel tempo alle piante di crescere in condizione ottimali di disponibilità idrica e nutrizionali fino al successivo rinnovo. Ad ogni invasatura viene aggiunto nel substrato un concime a rilascio controllato con rapporto equilibrato N:P₂O₅:K₂O (con microelementi) della durata di 5-6 mesi alla dose di 4 g/l. Successive necessità nutrizionali delle piante sono soddisfatte attraverso periodiche fertirrigazioni alla dose di 1,5 g/l.

Le caratteristiche climatiche del sito di collezione (tabella 2) consentono alle piante di evitare danni da gelate e di vegetare per tutto l'anno, ad eccezione del periodo centrale dell'inverno, permettendo alle varie accessioni di manifestare con continuità nell'anno le naturali caratteristiche di fioritura.

Tabella 2 - Caratteristiche climatiche del sito di collezione delle salvie (Sanremo, anno 2010):

Media	Temperatura (°C)		Umidità relativa (media)	Piovosità (mm)	Radiazione globale (Wh/mq)
	Min. assoluta	Max. assoluta			
16,0	- 0,9	32,7	68,9	696,8	1.570.128,15

1.4 Caratterizzazione e valorizzazione della collezione

Gli obiettivi sopra riportati vengono perseguiti attraverso una serie di attività volte sia alla caratterizzazione delle accessioni dal punto di vista biologico e agronomico sia alla valorizzazione produttiva, in collaborazione con istituzioni che si occupano di biochimica e con produttori del settore ornamentale.

1.4.1 Attività di caratterizzazione del germoplasma

E' imperniata sia sulla definizione delle caratteristiche morfologiche e fenologiche peculiari delle singole accessioni sia sulla caratterizzazione dei metaboliti secondari (oli essenziali e altro).

La caratterizzazione morfologica riveste importanza fondamentale a causa della frequente assenza di denominazioni varietali del materiale in produzione e di quello reperito per la collezione, nella frequente inesattezza o genericità di quello denominato, nella scarsità di fonti affidabili per l'identificazione varietale, nella assenza di descrittori.

Per tale motivo una rilevante parte dell'attività sul rosmarino concerne il raffronto tra accessioni e varietà di varia provenienza al fine di confrontarne le caratteristiche, in studi nella



Foto 3 – Varietà di rosmarino con differente portamento dei rami.

descrizione dei caratteri, nella identificazione di descrittori affidabili per la discriminazione a livello intraspecifico, nell'acquisizione di ampio materiale fotografico. Vengono perciò effettuate misurazioni biometriche, analisi morfologiche e cromatiche su organi vegetativi e riproduttivi. Questa attività ha evidenziato l'elevata variabilità esistente nel portamento della pianta (foto 3), nella lunghezza degli internodi (foto 4) nella forma e dimensione della foglia (foto 5); grande variabilità è riscontrabile soprattutto nelle caratteristiche cromatiche del fiore e nei disegni del labbro inferiore (foto 1).



Foto 4 – Accessioni con differente lunghezza degli internodi.

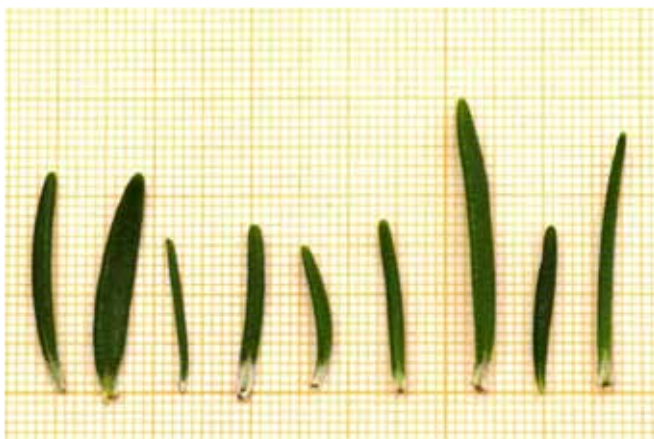


Foto 5 – Variabilità della forma e delle dimensioni della foglia in accessioni di rosmarino.

Per quanto riguarda la caratterizzazione fenologica, è possibile evidenziare tra le differenti accessioni una diversa abbondanza di fioritura, una diversa continuità del periodo di fioritura, una maggiore o minore compresenza di getti vegetativi e fioriferi. Nel complesso la fioritura del rosmarino avviene in flussi durante tutto il corso dell'anno, con una pausa maggiore durante il periodo estivo; in inverno si può avere una fioritura abbondante già a febbraio. Studi sono in corso per evidenziare la lunghezza della fase giovanile in piante di recente propagazione. L'attività di caratterizzazione degli oli essenziali e di altri metaboliti secondari su specie e varietà della collezione viene effettuata in collaborazione con istituzioni che si occupano specificamente di questo aspetto, in particolare i Dipartimenti di Chimica e Biochimica dell'Università di Genova e di Pisa. La collezione è utilizzata come fonte di germoplasma per l'ottenimento di biomassa per l'estrazione dei principi attivi.

1.4.2 Valutazione ornamentale e individuazione di nuove potenziali colture

La valorizzazione del germoplasma è legata all'effettuazione di prove di coltivazione in collaborazioni con produttori di piante aromatiche per l'introduzione di nuove selezioni originali, ma anche alla possibilità di sviluppare nuove tipologie di prodotto in funzione delle caratteristiche peculiari delle accessioni.



Foto 6 – Varietà di rosmarino in coltivazione in vaso.

Vengono effettuate, anche presso produttori interessati, prove di coltivazione in vaso di varietà (foto 6) appartenenti alla collezione al fine di valutarne in condizioni colturali le modalità di sviluppo e le caratteristiche di fioritura. Oltre all'habitus tipico di ciascuna varietà, differenze sono emerse anche nella velocità di crescita e nella precocità di fioritura, ottenendosi per alcune accessioni piante fiorite dopo pochi mesi di coltivazione. Differenze varietali sono state evidenziate anche in termini di altezza della pianta, numero di rami principali e secondari, lunghezza dei rami, numero totale di nodi del fusto.

Materiale propagativo delle cultivars viene reso disponibili per i produttori.

1.5 Attività di documentazione e divulgazione

La caratterizzazione e la valorizzazione della collezione di salvia è portata avanti anche attraverso la costituzione di documentazioni (schede descrittive, opuscoli), l'organizzazione di seminari e giornate "porte aperte", la partecipazione a convegni e mostre.

E' stato inoltre acquisito ampio materiale fotografico sulle accessioni riguardante le differenti parte della pianta.

Descrittori morfologici sono in corso di definizione per la costituzione di un database.

1.6 Bibliografia

- Bell E. A. 1981. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. The biochemistry of plants; a comprehensive treatise. Vol. 7. Secondary plant products. New York: Academic Press, 1-19
- Cervelli C. (a cura di), 2005. Le specie arbustive della macchia mediterranea: un patrimonio da valorizzare), 2005. Collana Sicilia Foreste (Palermo), supplemento n. 26.
- Cowan M. M., 1999. Clinical Microbiology Reviews 564-582.
- Croteau R., 1977. Plant Physiology 59: 519-520.

- Croteau R., Johnson M. A., 1984. In: Rodriguez E, Healey PL, Metha J, eds. Biology and chemistry of plant trichomes New York: Plenum Press 133-185.
- Dixon R. A., 2001. Nature 411: 843-847.
- Gebbink E. A. K., Jansen B. J. M., de Groot A., 2002. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. Phytochemistry 61: 737-770.
- IPNI, 2012. International Plant Name Index, <http://www.ipni.org>
- Kelsey R. G., Reynolds G. W., Rodriguez E., 1984. In: Rodriguez E, Healey PL, Metha J, eds. Biology and chemistry of plant trichomes New York: Plenum Press 187-241.
- Morales R., 2010. Rosmarinus. In: Castroviejo (ed.), Flora Iberica vol. 12, Real Jardin Botanico, Madrid, 327-331.
- Muller W. S., Muller C.H., 1964. Bulletin of the Torrey Botanical Club 91: 327-330.
- Pare P. W., Tumlinson J. H., 1999. Plant Physiology 121: 325-331.
- Pignatti S., 1982. Flora d'Italia. *Salvia* L. Edagricole, Bologna, vol. II, pp.502-507.
- Theis N., Lerdau M., 2003. Int. J. Plant Sci. 164:S93-S102.
- Tomàs-Barberà FA, Wollenweber E. 1990. Plant Systematics and Evolution 173: 109-118.
- Wagner G. J., 1991. Plant Physiology 96: 675-679.
- Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C. M., 2007, Phytomedicine 14 (7-8): 508-16.
- Weir T. L., Sang-Wook P., Vivanco J. M., 2004. Current Opinion in Plant Biology 7:472-479
- Wollenweber E., 1985. Plant Systematics and Evolution 150: 83-88.

COLLEZIONE DI FRUMENTO DURO IN AMBIENTE MEDITERRANEO: GERMOPLASMA SICILIANO E INTERNAZIONALE*

Massimo Palumbo, Michele Cambrea, Stefania Licciardello, Antonino Pandolfo, Anastasia Pesce, Alfio Platania, Domenico Roccasalva, Maria Russo, Fabiola Sciacca, Alfio Spina, Nino Virzi

CRA-ACM Centro di ricerca per l'agrumicoltura e le colture mediterranee
Corso Savoia, 190 – 95024 Acireale (CT)
E-mail: massimo.palumbo@entecra.it

Riassunto

Il gruppo di ricerca sui cereali del Centro di Ricerca per l'Agrumicoltura e le Colture Mediterranee di Acireale (CRA-ACM) è impegnato da anni in attività di salvaguardia e valorizzazione della biodiversità attraverso il recupero, la conservazione, la catalogazione, la moltiplicazione e la caratterizzazione delle risorse genetiche cerealicole. In particolare, la collezione comprende antichi ecotipi siciliani di frumento duro, ampiamente diffusi in Sicilia nella prima metà del ventesimo secolo, caratterizzati da un'ampia variabilità genetica, adattabilità agli ambienti mediterranei, caratteristiche qualitative idonee per la produzione di svariati pani tipici locali. La collezione di germoplasma di *Triticum* attualmente mantenuta presso il CRA-ACM comprende, oltre gli antichi ecotipi di frumenti siciliani, vecchie e recenti varietà italiane ed accessioni provenienti da differenti Paesi del bacino del Mediterraneo. Inoltre, nell'ambito delle attività di raccolta del germoplasma cerealicolo, il CRA-ACM ha stabilito proficue collaborazioni con organismi internazionali, quali l'ICARDA (Siria) e il CIMMYT (Messico). La collezione di frumento duro, che viene periodicamente rinnovata in parcelle sperimentali, è costantemente oggetto di studio per una più approfondita caratterizzazione bioagronomica, biochimica, qualitativa e molecolare.

Summary

Cereal working group of CRA - Research Centre for citrus and Mediterranean crops (Acireale, Italy) - for many years is engaged in maintenance and enhancement of biodiversity. The research team is involved in the recovery, preservation, cataloging, multiplication and characterization of cereal genetic resources. The germplasm collection includes ancient Sicilian durum wheat populations, both old and new Italian cultivars and accessions from different Mediterranean countries. Sicilian landraces were widespread in the island in the first half of the last century and were characterized by wide genetic variability, adaptability to Mediterranean environments and qualitative characteristics suitable for the production of typical local breads. In the context of germplasm collection activities, the CRA-ACM has established profitable collaborations with international organizations such as the International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA, Syria) and the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT, Mexico). The collection of durum wheat is periodically renewed in experimental field plots. It is also constantly being studied for a more detailed characterization of agronomic and technological parameters and for researches regarding biochemical and molecular aspects.

Parole chiave

Biodiversità, caratterizzazione, frumento duro, *landraces*, qualità, risorse genetiche

Keywords

Biodiversity, characterization, durum wheat, landraces, quality, genetic resources

1.1 Importanza delle collezioni di germoplasma nell'ambito delle colture cerealicole

I cereali rappresentano la principale risorsa alimentare del pianeta e i prodotti della loro trasformazione costituiscono da sempre gli alimenti "di base" per l'alimentazione umana. Poco

* doi:10.4458/0986-51

meno della metà della superficie delle terre arabili, ovvero circa 684 milioni di ettari, risulta investita a cereali.

L'incessante aumento della popolazione mondiale acuisce il problema del reperimento delle fonti alimentari ed è prevedibile che saranno ancora i cereali a dover contribuire in misura sostanziale alla soluzione di tale problema.

In termini di superficie coltivata, il frumento (duro e tenero) è il cereale più estesamente coltivato nel mondo, seguito da riso e mais (FAO, 2008). Il frumento duro, in particolare, alimenta una filiera trainante del comparto agro-alimentare italiano e costituisce una delle principali risorse agricole nell'intero bacino del Mediterraneo.

L'Italia, con circa 3,8 milioni di tonnellate (Istat, 2011), rappresenta il primo produttore europeo (50%) e, insieme al Canada, uno dei principali produttori mondiali di frumento duro.

Nel Mezzogiorno d'Italia (Molise, Campania, Puglia, Basilicata, Sardegna, Calabria e Sicilia) si concentra la quota nazionale più rilevante e si coltivano circa 860.000 ettari (pari al 67% della superficie investita in Italia).

Secondo i dati ISTAT del 2011, la Sicilia è il primo produttore nazionale di frumento duro, seguita dalla Puglia; il 26% della superficie italiana destinata alla coltura viene coltivata in Sicilia (297.156 ha), che contribuisce alla produzione nazionale di granella con una quota del 22%. La durogranicoltura, infatti, riveste in Sicilia un ruolo di primissimo piano, occupando il 95,5% della superficie regionale coltivata a cereali e circa un quarto dell'intera SAU dell'isola.

Il legame che esiste da secoli fra la Sicilia ed il frumento duro è sostenuto da ragioni ambientali, culturali, economiche e sociali; la coltura del grano duro è insostituibile per l'economia agricola siciliana, in modo particolare per quella delle aree interne non irrigue, ed è alla base di una complessa filiera produttiva che coinvolge e alimenta società sementiere, aziende agricole, centri di stoccaggio, imprese artigianali e industriali di prima e seconda trasformazione (molini, pastifici e panifici).

In molte aree del bacino del Mediterraneo, la granicoltura viene praticata in ambienti ritenuti ad alto rischio di desertificazione. Il mantenimento della biodiversità tra i vegetali e la conservazione dei parenti selvatici delle piante coltivate, ancora presenti nelle regioni di origine, rappresentano un utile serbatoio di geni da utilizzare nel lavoro di *breeding* dei cereali per migliorare la resistenza agli stress ambientali o ai parassiti.

D'altra parte, il miglioramento genetico dei cereali, indispensabile per assicurare l'incremento della produzione di cibo e per ridurre l'impatto dell'agricoltura sull'ambiente, ha portato alla costituzione di nuove varietà di buona qualità ed elevata produttività. Tuttavia, l'intensificazione della pressione selettiva ha spinto i *breeders* a concentrare la propria attenzione su una cerchia ristretta di genotipi, utilizzati sempre più frequentemente come parentali nei programmi di miglioramento genetico, e ciò ha comportato una sensibile riduzione della variabilità nell'ambito del germoplasma attualmente più diffuso in cerealicoltura e alla progressiva scomparsa di antiche varietà e popolazioni locali di cereali a paglia.

Tale tendenza viene oggi oculatamente bilanciata, sia incentivando l'attività delle Istituzioni scientifiche che hanno conservato il prezioso germoplasma nelle loro collezioni, sia recuperando varietà, razze e tradizioni locali rimaste appannaggio di pochi agricoltori.

La conservazione e la valorizzazione del germoplasma autoctono è il presupposto fondamentale per una strategia di sviluppo endogeno sostenibile ed un'opportunità per recuperare i valori di una civiltà rurale legata ad antiche tradizioni.

Un primo passo per un più proficuo uso delle risorse genetiche dei cereali è definire e documentare le risorse che sono disponibili. Il processo di utilizzazione delle risorse genetiche dei vegetali riguarda la ricerca, la classificazione, la conservazione, la caratterizzazione e l'utilizzazione del germoplasma dotato di variabilità genetica e di ampia adattabilità agli ambienti tipici mediterranei.

Le principali ricadute riguardano la valorizzazione del patrimonio delle risorse genetiche nel bacino del Mediterraneo, l'utilizzazione dei genotipi più idonei a sistemi colturali *low input* a basso impatto ambientale, la disponibilità di materia prima diversificata a vantaggio di tutti gli operatori della filiera cerealicola.

1.2 Salvaguardia e valorizzazione della biodiversità in *Triticum*: metodologia utilizzata

L'attività di conservazione e implementazione della collezione di *Triticum* è realizzata grazie al *know-how* acquisito dal gruppo di ricerca del CRA-ACM e all'impiego delle infrastrutture e attrezzature di cui è dotato il Centro: aziende agrarie, attrezzature sperimentali idonee per la semina, moltiplicazione, conservazione, catalogazione e caratterizzazione delle risorse genetiche cerealicole.

L'attività condotta dal CRA-ACM prevede diverse fasi:

- raccolta e riproduzione del germoplasma;
- implementazione della collezione con il reperimento e la raccolta di nuove accessioni;
- caratterizzazione biomorfologica e agronomica delle accessioni allevate in parcelle sperimentali;
- caratterizzazione biochimica, qualitativa e tecnologica dei genotipi in laboratorio;
- caratterizzazione genetico-molecolare delle singole accessioni;
- catalogazione e conservazione del germoplasma in condizioni atmosferiche controllate;
- schedatura informatizzata delle risorse genetiche in collezione;
- valorizzazione del germoplasma e della variabilità genetica presente in esso mediante l'individuazione di genotipi di particolare interesse per le caratteristiche produttive, qualitative e di adattabilità.

Inoltre l'attività del CRA-ACM riguarda lo studio e valorizzazione di prodotti tipici (pani tradizionali, altri prodotti da forno) a base di materia prima derivante da popolazioni e varietà locali di frumento duro.

Relativamente al recupero del germoplasma, periodicamente vengono effettuate in Sicilia campagne di raccolta presso aziende cerealicole che detengono ancora popolazioni locali o vecchie varietà; inoltre, nell'ambito delle attività di raccolta del germoplasma cerealicolo, il CRA-ACM ha stabilito proficue collaborazioni con organismi nazionali ed internazionali, quali l'*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas* (ICARDA, Siria) e l'*International Maize and Wheat Improvement Center* (CIMMYT, Messico).

Foto 1 e 2 Alcune spighe del germoplasma selezionato presso il CIMMYT (Messico).



Per assicurare la vitalità del seme e moltiplicare il materiale genetico in collezione, presso le strutture aziendali del CRA-ACM ogni anno viene attuata la riproduzione di una parte del germoplasma. I genotipi da riprodurre vengono seminati mediante seminatrice a file singole o seminatrice parcellare, in parcelle di dimensioni diverse in funzione del materiale disponibile e delle quantità di seme da produrre. Le parcelle più piccole sono normalmente costituite da 2 file della lunghezza di 1,5 m, distanti 20 cm. Per le accessioni di cui si dispone di quantità sufficienti di seme e per le quali si ritiene necessario ottenere una produzione maggiore che consenta la caratterizzazione agronomica e tecnologica, vengono allestite parcelle di maggiori dimensioni (10 - 20 m²).

Nel corso degli anni, i campi di moltiplicazione sono stati realizzati presso le aziende sperimentali del CRA-ACM in località Libertinia (CT), sita in un tipico ambiente collinare delle aree interne della Sicilia, e presso l'azienda S. Giovanni Arcimusa (Lentini – SR).

Foto 3 Semina delle parcelle mediante seminatrice sperimentale.



Il germoplasma viene caratterizzato dal punto di vista bio-morfologico e agronomico impiegando i descrittori standard utilizzati per la caratterizzazione dei genotipi di *Triticum*. In dettaglio, l'attività di caratterizzazione realizzata in campo e, dopo la raccolta, in laboratorio prevede l'acquisizione dei seguenti parametri:

- il portamento della pianta a fine accostamento;
- l'epoca di spigatura;
- la suscettibilità/resistenza alle malattie e alle fisiopatie;
- la glaucescenza dello stelo e della spiga;
- l'altezza della pianta a maturità;
- la suscettibilità all'allettamento;
- il grado di pienezza della paglia in sezione trasversale;
- la forma, la compattezza e il colore della spiga a maturità;
- la lunghezza e il colore delle ariste;
- il colore e la forma della cariosside;
- la resa in granella.

Dopo la raccolta, le accessioni in collezione sono caratterizzate attraverso la determinazione dei principali parametri merceologici:

- peso ettolitrico,
- peso delle 1000 cariossidi,
- contenuto proteico,
- quantità e qualità del glutine.

La caratterizzazione biochimica dei genotipi viene effettuata presso i laboratori del CRA-ACM mediante analisi elettroforetica delle proteine di riserva del seme (Sciacca *et al.*, 2008), attraverso la realizzazione di gel di poliaccrilamide, per l'identificazione delle subunità gluteniniche a basso e ad alto peso molecolare (BPM e APM), in accordo con il metodo descritto da Payne *et al.* (1980) (Pogna *et al.*, 1985).



Foto 4 Determinazione del contenuto proteico e del glutine, su semola e granella, mediante strumentazione NIT (Near Infrared Trasmittance).

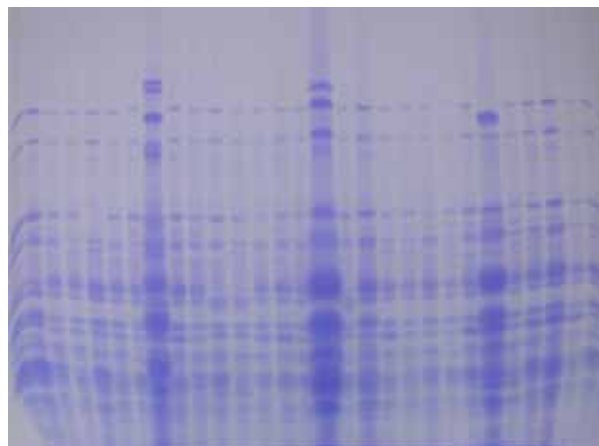
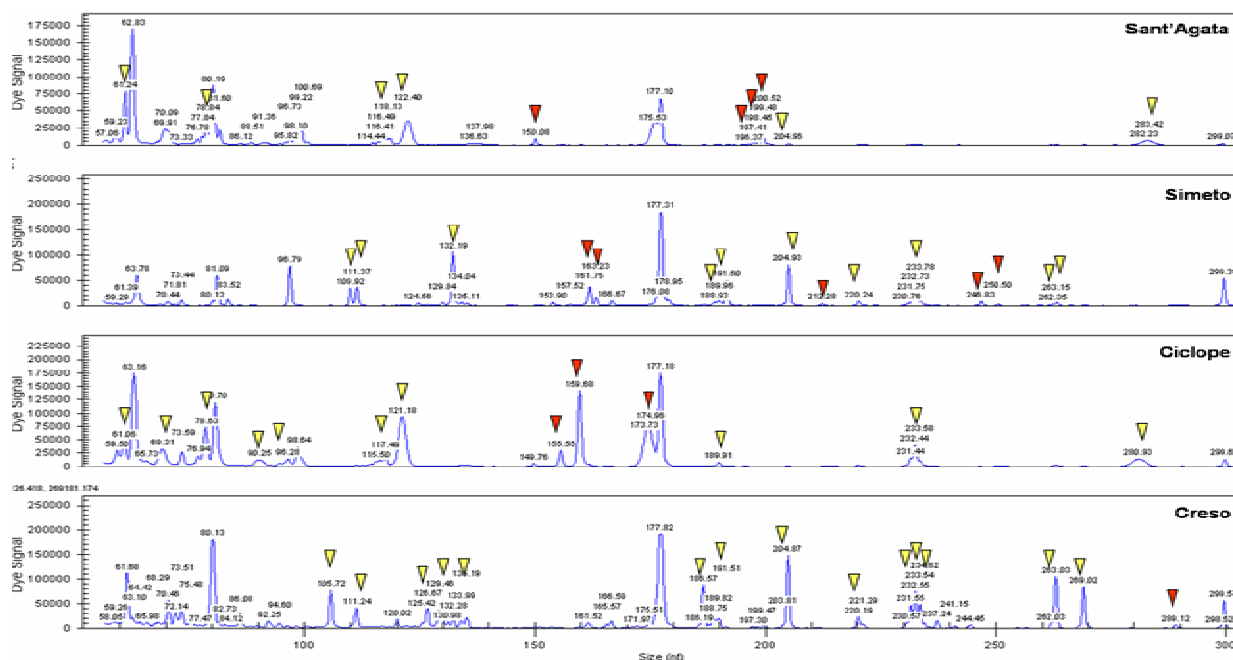


Foto 5 Analisi elettroforetica in SDS-PAGE delle proteine di riserva estratte da cariocidi di Timilia e varietà testimoni.

Il lavoro di caratterizzazione delle accessioni prosegue anche con l'utilizzazione di tecniche di analisi del genoma attraverso l'impiego di marcatori molecolari, quali AFLP e SSR (Sicacca *et al.*, 2011). In particolare la tecnica AFLP in fluorescenza ha consentito di generare *fingerprinting* caratteristici e riproducibili ed è risultata particolarmente efficace per discriminare anche tra varietà strettamente vicine da un punto di vista genetico (Fichera *et al.*, 2006; Sicacca *et al.*, 2010) (Fig. 1).

Figura 1 *Fingerprinting* di varietà ottenuto con la tecnica fAFLP.



Un considerevole numero di accessioni in collezione è stato sottoposto a valutazione qualitativa attraverso la determinazione dei principali parametri reologici e tecnologici:

- colore della semola;
- determinazione dei parametri alveografici (W, P/L);
- determinazione dei parametri farinografici (assorbimento idrico, tempo d'impasto, stabilità, indice di caduta);
- giudizio mixografico;
- determinazione del contenuto in glutine e dell'indice di qualità del glutine (*gluten index*).

Foto 6 Alveografo di Chopin per la determinazione delle caratteristiche reologiche dei genotipi in collezione.



In considerazione dell'estesa utilizzazione del frumento duro, nei Paesi del bacino del Mediterraneo, per la produzione di diversi tipi di pane, su molti genotipi in collezione viene valutata la qualità panificatoria (Palumbo *et al.*, 2002 e 2008).

Foto 7 Pane di semola di frumento duro.



Pertanto, viene effettuato il test di panificazione sperimentale utilizzando la metodica AACC (metodo 10-10), opportunamente modificata per la valutazione del frumento duro. Sui pani ottenuti (da 100 g di semola) viene espresso un giudizio finale tenendo conto dei diversi rilievi effettuati: peso, altezza, volume, colore della crosta, colore della mollica, porosità ed alveolatura.

Foto 8 Pani monovarietali ottenuti con il test di panificazione sperimentale.



La conservazione del germoplasma viene effettuata in una camera fredda (semeteca), in condizioni di temperatura ed umidità controllate.

Tutti i risultati derivanti dalla caratterizzazione bio-morfologica, agronomica, biochimica, molecolare, qualitativa e tecnologica del germoplasma sono elaborate e inserite in una banca dati per consentire la schedatura informatizzata delle risorse genetiche presenti in collezione; a tale scopo sono state predisposte schede descrittive contenenti i principali descrittori impiegati nelle collezioni mondiali di germoplasma vegetale. A titolo di esempio, si riporta la scheda dell'accessione Timilia (Fig. 2).

1.3 La collezione di frumento duro del CRA-ACM

Il gruppo di lavoro sui cereali del Centro di Ricerca per l'Agricoltura e le Colture Mediterranee di Acireale (CRA-ACM) è impegnato da anni in attività di salvaguardia e valorizzazione della biodiversità. Tale attività ha consentito di raccogliere e catalogare genotipi di diversa provenienza e di recuperare e salvaguardare risorse genetiche altrimenti destinate all'estinzione, a seguito della diffusione delle moderne varietà più produttive.

Attualmente, la struttura dispone di un'ampia collezione di germoplasma cerealicolo comprendente:

- vecchie e recenti varietà italiane di frumento duro,
- antiche popolazioni siciliane di *Triticum*,
- linee *breeding* stabilizzate,
- cultivar e *landraces* provenienti da differenti aree del pianeta.

In particolare, sono stati reperiti, moltiplicati e caratterizzati genotipi di frumento duro di provenienza algerina, accessioni provenienti dall'*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas* di Aleppo (ICARDA, Siria), centinaia di accessioni provenienti dall'*International Maize and Wheat Improvement Center* (CIMMYT, Messico), genotipi provenienti dalle regioni mediterranee del nord-Africa (Magreb) e dal Medio Oriente (Giordania, Siria).

Figura 2 Scheda descrittiva di un'accessione della collezione di frumento duro del CRA-ACM.

Risorse Genetiche Cerealicole

FRUMENTO DURO (*Triticum durum* Desf.)

Centro di Ricerca per l'Agricoltura e le Colture Mediterranee, Acireale (Ct)



Accessione	TIMILIA		
Varietà <input type="checkbox"/>	Linea <input type="checkbox"/>	Popolazione <input checked="" type="checkbox"/>	
Provenienza (località, anno di raccolta)	Sicilia, 2009/2010		

CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA

Culmo:

✓ Altezza pianta a maturità	alta
✓ Grado di pienezza della paglia in sezione trasversale (lume midollare rilevato a metà tra la base della spiga e l'ultimo nodo)	culmo pieno

Spiga:

✓ Forma della spiga sul profilo	fusiforme
✓ Ariste all'apice della spiga (lunghezza rispetto alla spiga)	più lunghe
✓ Colore delle ariste	bruno
✓ Colore della spiga a maturazione	giallastro chiaro
✓ Pubescenza della superficie esterna delle glume inferiori a maturazione	assente o molto debole
✓ Compattezza della spiga - lunghezza di 10 segmenti centrali del rachide - valutazione visiva compattezza:	41 mm media
✓ Forma della cariosside	ovale



CARATTERIZZAZIONE AGRONOMICA

✓ Epoca di spigatura	tardiva
✓ Produttività (rispetto ai testimoni: Duilio, Iride e Simeto)	bassa
✓ Resistenza alle principali malattie crittogamiche	mediamente resistente
✓ Resistenza all'allettamento	mediamente suscettibile

CARATTERIZZAZIONE QUALITATIVA

Parametri merceologici:

✓ Peso ettolitrico	medio
✓ Peso 1000 semi	medio-basso

Parametri qualitativi:

✓ Contenuto proteico	medio-alto
✓ Contenuto in glutine	medio-alto
✓ Gluten index	basso
✓ Indice di giallo semola	basso

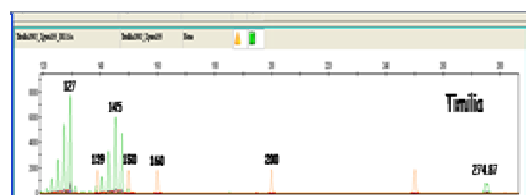
Parametri tecnologici:

✓ W alveograf.	basso ($< 100 \text{ J} \times 10^{-4}$)
✓ P/L alveograf.	mediam. equilibrato (> 1)
✓ Sviluppo farinogr.	medio ($> 120''$)
✓ Stabilità farinogr.	bassa ($< 180''$)

CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA

Analisi elettroforetica GLUTENINE	
subunità ad alto peso molecolare	6 + 8
subunità a basso peso molecolare	2

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE



Fingerprinting di Timilia ottenuto con primer Xgwm 155-3A

Foto 9 Rilievi bioagronomici e fenologici sul germoplasma coltivato in parcelle.



1.3.1 Le popolazioni siciliane di frumento duro

Di particolare interesse è una ricca collezione di vecchie popolazioni siciliane di frumento duro, caratterizzate da un'ampia variabilità genetica (De Cillis, 1939 e 1942). Esse, ampiamente diffuse in Sicilia nella prima metà del ventesimo secolo, hanno rappresentato la fonte da cui, per processi selettivi ed adattativi, si sono originati genotipi caratterizzati da una specifica adattabilità ai particolari ambienti mediterranei. La maggior parte di queste *landraces* presentava, però, una taglia eccessivamente elevata, suscettibilità all'allettamento e un ciclo biologico tardivo (Palumbo *et al.*, 2005; Perrino and Martignano, 1973; Porceddu and Bennet, 1971). In seguito all'introduzione delle moderne *cultivar* caratterizzate da taglia bassa, precocità ed elevata produttività, la coltivazione delle vecchie popolazioni locali è stata pressoché abbandonata dagli agricoltori (Boggini *et al.*, 1990). Tuttavia alcune di esse (Timilia, Russello) presentano caratteristiche qualitative particolari e vengono tuttora coltivate ed utilizzate per la produzione di svariati pani tipici locali (Abbate *et al.*, 1997; Palumbo *et al.*, 2008; Spina *et al.*, 2011). Per queste ragioni esse rappresentano una preziosa fonte di biodiversità, da mantenere e da utilizzare sia tal quale sia per la disponibilità di risorse genetiche da introdurre in programmi di *breeding* finalizzati al miglioramento della resistenza agli stress biotici ed abiotici e al miglioramento della qualità tecnologica (Palumbo *et al.*, 2007; Spina *et al.*, 2010).

La collezione di *landraces* di frumento duro comprende le popolazioni elencate in tabella 1.

La caratterizzazione biochimica ha permesso di evidenziare un'elevata biodiversità tra le popolazioni studiate ed all'interno di esse (tabella 2). In particolare, i risultati della caratterizzazione elettroforetica delle proteine di riserva del seme hanno mostrato che il 25% delle popolazioni siciliane testate è dotato della composizione gluteninica ad alto peso molecolare (APM) "13+16", presente soltanto nel 6% delle moderne *cultivar* italiane di frumento duro (Sciacca *et al.*, 2003). Al contrario, le subunità "7+8", ampiamente diffuse nelle varietà italiane, risultano presenti solo nell'11% delle popolazioni siciliane esaminate. Inoltre, su alcune cariossidi delle popolazioni Pavone, Vallelunga Glabra e Tunisina sono state riscontrate nuove subunità APM non ancora identificate. All'interno di alcune *landraces* sono stati identificati due o tre biotipi che differivano per bande gluteniniche ad alto peso molecolare (codificate dal locus *Glu-B1* nel braccio lungo del cromosoma 1B). Tutte le popolazioni testate sono risultate "Nulli" per le subunità codificate dal locus *Glu-A1* nel braccio lungo del cromosoma 1A (Sciacca *et al.*, 2011).

Sulle popolazioni siciliane di grano duro sono state condotte anche analisi molecolari al fine di effettuare una caratterizzazione genetica (Sciacca *et al.*, 2003 e 2011). Dopo aver utilizzato la tecnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) come approccio preliminare per la

individuazione di marcatori specifici, la genotipizzazione è stata condotta utilizzando marcatori SSR. Tale tecnica, impiegata per determinare il *fingerprinting* di diverse accessioni nell'ambito delle *landraces* Timilia e Russello, ha permesso di evidenziare polimorfismo intra e interpopolazione (Figg. 3 e 4).

Foto 10, 11, 12, 13, 14 Spighe di accessioni di antiche popolazioni siciliane di frumento duro.

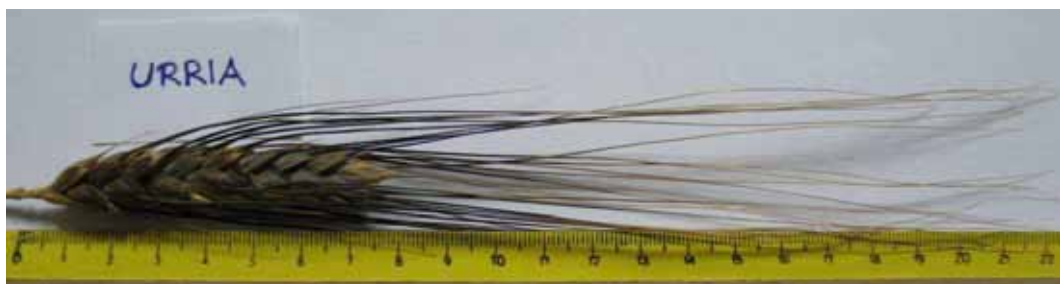


Tabella 1 Elenco delle popolazioni siciliane in collezione e classificazione botanica.

Genotipi	Classificazione botanica secondo De Cillis (1942)
BIANCUCCIA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucomelan</i> Koern.
BIVONA	<i>Triticum turgidum</i> L. var. <i>speciosissimum</i> Koern.
BUFALA NERA CORTA	<i>Triticum turgidum</i> L. var. <i>iodurum</i> Koern.
BUFALA NERA LUNGA	<i>Triticum turgidum</i> L. var. <i>iodurum</i> Koern.
BUFALA ROSSA LUNGA	<i>Triticum turgidum</i> L. var. <i>mertensii</i> Koern.
CANNIZZARA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucurum</i> Koern.
CASTIGLIONE GLABRO	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>erythromelan</i> Koern.
CICIREDDA	<i>Triticum turgidum</i> L. var. <i>siculum</i>
COTRONE	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>erythromelan</i> Koern.
FARRO LUNGO	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>melanopus</i> Koern.
GIOIA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>erythromelan</i> Koern.
GIUSTALISA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>melanopus</i> Koern.
INGLESA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucomelan</i> Koern.
LINA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>erythromelan</i> Koern.
MARGHERITO	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucomelan</i> Koern.
MARTINELLA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>melanopus</i> Koern.
PAVONE	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>erythromelan</i> Koern.
PRIZIUSA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>hordeiforme</i> Koern.
REALFORTE	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>melanopus</i> Koern.
REGINA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucurum</i> Koern.
RUSCIA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>erythromelan</i> Koern.
RUSSELLO	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>hordeiforme</i> Koern.
SAMMARTINARA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucurum</i> Koern.
SCORSONERA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>coerulescens</i> Koern.
SEMENZELLA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>melanopus</i> Koern.
SICILIA LUTRI	<i>non riportata</i>
SICILIA RESTE BIANCHE	<i>non riportata</i>
SICILIA RESTE NERE	<i>non riportata</i>
TIMILIA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>affine</i> Koern.
TIMILIA RESTE BIANCHE	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>affine</i> Koern.
TIMILIA RESTE NERE	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>reichenbachii</i> Koern.
TIMILIA SG1	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>affine</i> Koern.
TRENTINO	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucomelan</i> Koern.
TRIPOLINO	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>leucurum</i> Koern.
TUNISINA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>reichenbachii</i> Koern.
URRIA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>reichenbachii</i> Koern.
VALLELUNGA GLABRA	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>erythromelan</i> Koern.
VALLELUNGA PUBESCENTE	<i>Triticum durum</i> Desf. var. <i>apulicum</i> Koern.

Tabella 2 Subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (APM) prevalenti in 36 popolazioni siciliane di frumento duro.

APM "20" (Frequenza 42%)		APM "6+8" (Frequenza 22%)	APM "13+16" (Frequenza 25%)	APM "7+8" (Frequenza 11%)
Biancuccia	Kahla	Bivona	Giustalisa	Bufala Rossa L.
Bufala Nera C.	Margherito	Cannizzara	Martinella	Regina
Bufala Nera L.	Realforte	Ingleza	Pavone	Sicilia Reste B.
Castiglione	Trentino	Priziusa	Russello	Sicilia Reste N.
Cotrone	Tunisina	Ruscia	Scorsonera	
Duro Lucano	Vincitutti	Semenzella	Timilia SG1	
Farro Lungo	Volturmo	Sicilia Lutri	Tripolino	
Gioia		Timilia	Vallelunga Glabra	
			Vallelunga Pub.	

Figura 3 Polimorfismo intra-popolazione rilevato mediante l'utilizzo di marcatori SSR.

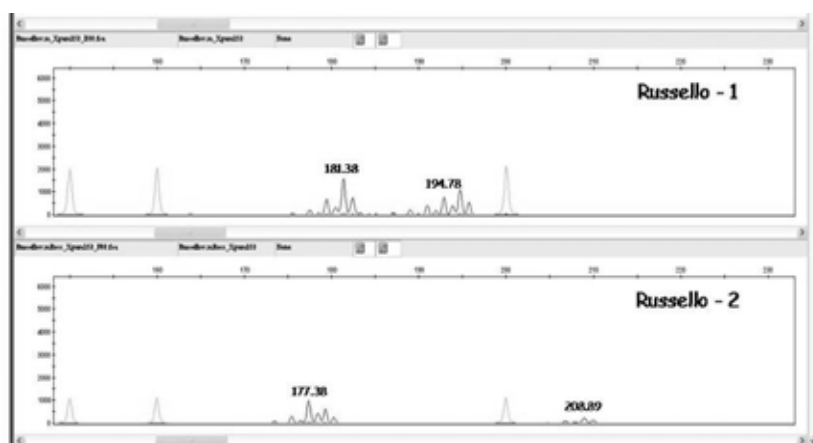


Figura 4 Polimorfismo inter-popolazioni rilevato mediante l'utilizzo di marcatori SSR.

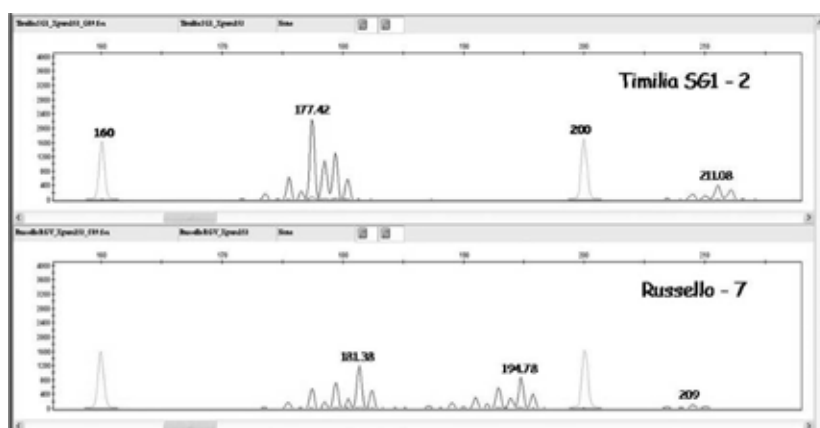


Tabella 3 Media e *range* dei parametri qualitativi rilevati sulle popolazioni siciliane di frumento duro.

Parametri qualitativi	Media	Range
Peso 1000 semi (g)	35,7	29,3 - 43,5
Peso ettolitrico (Kg/hL)	78,3	74,9 - 81,2
Contenuto proteico (% s.s.)	15,8	12,5 - 17,3
<i>Gluten Index</i>	38,5	12,5 - 90,1
Indice di giallo della semola (b*)	19,5	16,3 - 22,8
W (Jx10 ⁻⁴)	127,7	41 - 435
P/L	2,7	1,1 - 5,7
Assorbimento idrico (%)	66,4	61,2 - 73,5
Tempo di sviluppo dell'impasto (s)	201	132 - 270
Stabilità farinografica (s)	163,5	84 - 276
Indice di caduta (U.B.)	109,4	50 - 185
Volume del pane (cm ³)	399,2	297 - 490
Peso del pane (g)	158,6	150 - 166
Porosità interna*	5,4	3 - 8
Rugosità della crosta**	2,9	2 - 4

* : 1= molto poroso; 8= poco poroso

** : 1= molto liscio; 4= molto rugoso

Ampia variabilità è stata riscontrata, inoltre, per tutti i parametri qualitativi rilevati (tab. 3). Alcune popolazioni hanno evidenziato ottima qualità tecnologica e buona attitudine panificatoria. Vallelunga Pubescente ha mostrato valori equilibrati di P/L alveografico, associati ad elevati tempi di sviluppo dell'impasto e di stabilità farinografica oltre che a soddisfacenti valori dell'indice di caduta (55 U.B.). Sicilia Lutri ha mostrato un buon contenuto proteico ed un elevato tempo di sviluppo dell'impasto, mentre Priziusa ha evidenziato apprezzabili parametri alveografici.

Relativamente alla valutazione dell'attitudine panificatoria, le popolazioni Vallelunga Pubescente, Sicilia Lutri e Priziusa hanno mostrato valori elevati del volume del pane.

Il lavoro di caratterizzazione delle popolazioni siciliane di frumento duro evidenzia che esse rappresentano una preziosa fonte di biodiversità da mantenere e valorizzare. Alcune di esse, infatti, sono tuttora utilizzate per la produzione di prodotti tradizionali (Palumbo *et al.*, 2003), altre sono state inserite in programmi di *breeding* finalizzati al miglioramento della qualità e della stabilità produttiva del grano duro.

Foto 15 Test di panificazione sperimentale per la valutazione dell'attitudine panificatoria di diverse popolazioni siciliane di grano duro.



1.4 Ricadute e benefici delle attività di conservazione e caratterizzazione delle risorse genetiche

Fra i benefici scientifici dell'attività di conservazione delle risorse genetiche vanno considerati il mantenimento e la conoscenza della variabilità genetica fra ed entro popolazioni. In particolare la caratterizzazione delle accessioni disponibili consente una loro efficace utilizzazione in programmi di miglioramento (Raciti *et al.*, 2003). Il lavoro di raccolta, moltiplicazione, caratterizzazione e valutazione dei genotipi di frumento duro ha messo in evidenza nel corso degli anni un'elevata variabilità sia per le caratteristiche bio-agronomiche (Palumbo *et al.*, 2005) che qualitative (Carcea *et al.*, 2008) ed alcune accessioni in particolare hanno mostrato di possedere spiccata adattabilità ed elevata stabilità produttiva in ambiente mediterraneo (Mastrangelo *et al.*, 2008; Palumbo e Boggini, 2002; Virzì *et al.*, 2009).

Un'adeguata conoscenza e valorizzazione della biodiversità, inoltre, può produrre positive ricadute economiche quali l'aumento della redditività della coltivazione del frumento duro e dell'intera filiera, grazie alla disponibilità di materia prima diversificata e all'utilizzazione di costituzioni genetiche più idonee a sistemi colturali *low input*, in grado di ridurre i costi di produzione (Lombardo, 2004; Palumbo *et al.*, 2007; Porfiri, 2004; Quaranta *et al.*, 2009).

L'identificazione, nell'ambito del germoplasma disponibile, di genotipi dotati di buona adattabilità comporta anche ricadute sociali che si concretizzano nel sostegno alle aree marginali del bacino del Mediterraneo. In tali ambienti, nelle quali la coltivazione del grano duro riveste una fondamentale funzione sociale, la disponibilità di cultivar resistenti alle avversità contribuisce a disincentivare l'abbandono delle aree svantaggiate (Spina *et al.*,

2001). Detti benefici sociali riguardano sia le popolazioni rurali sia il comparto economico legato al suo indotto, come l'industria molitoria, le aziende di panificazione, i pastifici ecc. Relativamente ai benefici ambientali, la selezione di genotipi più idonei a sistemi colturali *low input* produce effetti positivi sull'impatto ambientale. Infatti, la disponibilità di *cultivar* più resistenti alle malattie implica una riduzione dell'uso di fitofarmaci, mentre la disponibilità di nuovi genotipi dotati di più elevata efficienza dell'uso dell'azoto (NUE) comporta una riduzione della somministrazione di fertilizzanti azotati (Virzì et al., 2008).

Foto 16 Un momento della visita tecnica presso i campi sperimentali di frumento duro allestiti nell'azienda del CRA-ACM a Libertinia (CT), maggio 2011.



1.5 Diffusione dei risultati dell'attività svolta

Nel corso degli anni, per la diffusione dei risultati delle attività di conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche sono state realizzate molteplici azioni:

- visite guidate ai campi sperimentali;
- mostre cerealicole per la divulgazione dei materiali genetici e dei prodotti trasformati (pani tipici, prodotti tradizionali ecc.);
- pubblicazioni divulgative e tecnico-scientifiche;
- seminari e incontri divulgativi con la partecipazione di ricercatori, tecnici e operatori della filiera cerealicola.

Foto 17 Incontro divulgativo con la presentazione della collezione cerealicola presso il CRA-ACM di Acireale (CT), dicembre 2011.



1.6 Bibliografia

- Abbate V., Boggini G., Coppolino F., Lombardo G. M., 1997. Analisi della variabilità tra ed entro popolazioni di frumento duro Russello raccolte nell'area Iblea. In: Atti del 3° Convegno Nazionale Biodiversità, Reggio Calabria 1997: 335-341.
- Boggini G. Palumbo M., Calcagno F., 1990. Characterization and utilization of Sicilian landraces of durum wheat in breeding programmes. In: J.P. Srivastava and A.B. Damania eds., "Wheat Genetic Resources: Meeting Diverse Needs", John Wiley & Sons, New York: 223-234.
- Carcea M., Palumbo M. *et al.*, 2008. Caratteristiche qualitative delle varietà di frumento duro coltivate in Italia – raccolto 2008. In: CD realizzato da INRAN e C.R.A., nell'ambito del progetto MiPAAF "Sperimentazione Interregionale sui Cereali - S.I.C."
- De Cillis U., 1939. Fattori di progresso della granicoltura siciliana : varietà elette di grano e loro produzione. Lezione svolta al corso interprovinciale per gli impiegati agricoli. Ordinamento dell'azienda agricola. Palermo. Enciclopedia Agraria Italiana Utet 1985: 605.
- De Cillis U., 1942. I frumenti siciliani. Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia. Catania. Pubblicazione n°9.
- Fichera C., Sciacca F., Blanco C., Di Silvestro S., Palumbo M., 2006. Molecular characterization of durum wheat cv. "Sant'Agata" by AFLP in fluorescence. Journal of Genetics and Breeding, vol. 60: 147 - 152.
- Lombardo G.M., 2004. Evoluzione varietale del frumento duro in Sicilia nel corso del XX secolo. In: "I frumenti siciliani: patrimonio da mantenere e valorizzare." G. Maimone Eds.-Catania, pp. 69-72.
- Mastrangelo A.M., Rizza F., Badeck F., Mazzucotelli E., Virzi N., Palumbo M., Matteu L., Li Destri Nicosia O., Cattivelli L., 2008. Assessment of durum wheat biodiversity for grain yield in environments with different water supplies. In: Proceedings of the International Durum Wheat Symposium "From seed to pasta: the durum wheat chain", Bologna 2008: 165.
- Palumbo M., Boggini G., 2002. Grain yield in Italian environments and glutenin composition of durum wheat cultivars. Journal of Agriculture and Environment for International Development, 3/4: 273-281.
- Palumbo M., Spina A., Boggini G., 2002. Bread-making quality of Italian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. Italian Journal of Food Science 2: 123-133.
- Palumbo M., Sciacca F., Virzi N., Boggini G., 2003. Breadmaking quality of Sicilian durum wheat landraces. Proceedings of 2nd International workshop "Durum wheat and pasta quality: recent achievements and new trends", Roma 2002: 77-81.
- Palumbo M., Spina A., Sciacca F., Virzi 2005. Studio della composizione proteica, delle caratteristiche qualitative e dell'attitudine panificatoria di antiche popolazioni siciliane di frumento duro. Tecnica Agricola 1-2: 53-64.
- Palumbo M., Sciacca F., Cambrea M., Licciardello S., Mazzone V., 2007. Interventi per la valorizzazione delle risorse genetiche di frumento duro. Risorse Genetiche Vegetali 1/2: 8-9.
- Palumbo M., Spina A., Virzi' N., Sciacca F., Blanco C., 2007. Caratterizzazione qualitativa, bioagronomica e molecolare di antichi ecotipi mediterranei di grano duro. In: Atti del 2° Convegno Nazionale Piante Mediterranee "Valorizzazione delle risorse e sviluppo sostenibile", Agrigento 2004: 242 - 249.
- Palumbo M., Blangiforti S., Cambrea M., Gallo G., Licciardello S., Spina A., 2008. Sicilian durum wheat landraces for production of traditional breads. In: Proceedings of the International Durum Wheat Symposium "From seed to pasta: the durum wheat chain", Bologna 2008: 132.
- Palumbo M., Spina A., Russo M., Sciacca F., Virzi' N. 2008. Evaluation of durum wheat varieties for baking quality. In: Proceedings of 13rd ICC Cereal and Bread Congress, Madrid 2008: 70.
- Payne, P.I., Law C.N. and Mudd E.E. 1980. Control by homoeologous group 1 chromosomes of the high-molecular weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. Theoretical Applied Genetics, 58: 113-120.
- Perrino P. and Martignano F., 1973. The presence and distribution of old wheat varieties in Sicily. Ecologia Agraria 9: 1-11.
- Pogna N.E., Mellini F., Dal Belin Peruffo A., 1985. Il ruolo dell'elettroforesi su gel di poliacrilamide nella identificazione varietale e nello sviluppo di nuove varietà di grano duro con buona qualità pastificatoria. Monografie di Genetica Agraria, 7: 199-212.

- Porceddu E. and Bennet E., 1971. Primi risultati di una spedizione di esplorazione e raccolta di vecchie varietà di frumento in Sicilia. *Ecologia Agraria* 7: 3-18.
- Porfiri O., 2004. Le varietà locali delle piante coltivate: un patrimonio genetico, culturale e storico da recuperare, salvaguardare e valorizzare. In: "I frumenti siciliani: patrimonio da mantenere e valorizzare, Eds. G. Maimone, Catania, pp. 17-68.
- Quaranta F. *et al.*, 2009. Schede varietali per il frumento duro nell'Italia meridionale. CD realizzato nell'ambito del progetto S.I.Cer.Me. - "Sistema Integrato per lo sviluppo della Cerealcoltura Meridionale", coordinamento Palumbo M.
- Raciti C. N., Doust M. A., Lombardo G. M., Boggini G., Pecetti, L., 2003. Characterization of durum wheat Mediterranean germplasm for high and low molecular weight glutenin subunit in relation with quality. *European Journal of Agronomy*, 19: 373-382.
- Sciacca F., Blanco C., Salafia L., Sgarlata M. T., Di Silvestro I. and Palumbo M., 2003. Genetic and biochemical characterization of durum wheat Sicilian landraces. *Proceedings of "Tenth International Wheat Genetics Symposium"*, Paestum 2003: 634-636.
- Sciacca F., Romano E., Palumbo M., 2004. Caratterizzazione biochimica e biomorfologica e valutazione agronomica di varietà di frumento duro diffuse in Algeria. In atti del "VI Convegno Nazionale Biodiversità - Opportunità di Sviluppo Sostenibile", Bari 2001: 199-207.
- Sciacca F., Fichera C., Spina A., Virzi' N., Palumbo M. 2008. Biochemical and molecular characterization of durum wheat genotypes. In: *Proceedings of 13rd ICC Cereal and Bread Congress*. Madrid 2008: 186.
- Sciacca F., Fichera C., Di Silvestro S., Conte E., Palumbo M., 2010. Genetic diversity of Italian germplasm of durum wheat as determined by AFLP in fluorescence. *Biologia Plantarum*, 54 (1): 198 - 200.
- Sciacca F., Cambrea M., Licciardello S., Pesce A., Spina A., Virzi N., Palumbo M., 2011. Confronto tra tecniche molecolari per la determinazione del fingerprinting di varietà di frumento duro. . In: Carcea M., Marconi E., Palumbo M., Redaelli R. (ed). *Atti 8° Convegno nazionale AISTEC, Aci Castello (CT) 2011: 212-215.*
- Sciacca F., Russo M. P., Virzi N., Spina A., Cambrea M., Licciardello S., Pesce A., Palumbo M., 2011. Genotipizzazione di antiche popolazioni siciliane di frumento duro attraverso la caratterizzazione biochimica e molecolare. In: Carcea M., Marconi E., Palumbo M., Redaelli R. (ed). *Atti 8° Convegno nazionale AISTEC, Aci Castello (CT) 2011: 52-55.*
- Spina A., Cambrea M., Palumbo M., Boggini G., 2001. Frumento duro: valutazione e caratterizzazione agronomica e qualitativa di popolazioni siciliane e *landraces* di provenienza nord-africana maggiormente rispondenti ai nuovi sistemi colturali eco-compatibili. In: *Atti del 5° Convegno Nazionale Biodiversità, Caserta 1999: 616-622.*
- Spina A., Blangiforti S., Cambrea M., Gallo G., Licciardello S., Palumbo M., 2010. Valorizzazione di germoplasma locale di frumento duro per la produzione di pani tipici. *Atti dell'VIII° Convegno Nazionale sulla Biodiversità "La biodiversità - Risorsa per sistemi multifunzionali"*, Lecce 2008. L. De Bellis, S. Marchiori, A Miceli Eds., pp. 425-427.
- Spina A., Blangiforti S., Gallo G., Licciardello S., Sciacca F., Palumbo M., 2011. I grani siciliani: il caso Timilia. *Atti 8° Convegno nazionale AISTEC, Aci Castello (CT) 2011: 207-211.*
- Virzi N., Cambrea M., Licciardello S., Palumbo M., Desiderio E., D'egidio M.G., 2008. Agronomic and quality traits of durum wheat varieties in Mediterranean environments. In: *Proceedings of the International Durum Wheat Symposium "From seed to pasta: the durum wheat chain"*, Bologna 2008: 150.
- Virzi N., Cambrea M., Licciardello S., Palumbo M., Desiderio E., D'Egidio M. G., 2009. Studio della variabilità e delle relazioni fra parametri agronomici e qualitativi nel panorama varietale italiano di frumento duro. *Atti del 38° Convegno Nazionale della Società Italiana di Agronomia (SIA), Firenze 2009: 283-284.*

VIBURNO*

Responsabili Scientifici: Dr. Enrico Farina, Dr.ssa Carla Dalla Guda

CRA-FSO Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali
Corso Inglesi, 508 – 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

Sono descritte le condizioni di realizzazione e mantenimento di due collezioni di Viburni situate in ambiente rivierasco (Sanremo, IM) e in ambiente preappenninico ligure (Vezzanelli di Zignago, SP). Nel complesso si tratta di 80 accessioni sulle quali vengono eseguite osservazioni di crescita comparativa in modo da valutare l'adattabilità alle differenti condizioni pedoclimatiche. La collezione a Vezzanelli, iniziativa in collaborazione col Comune di Zignago, si pone anche l'obiettivo di costituire richiamo sia turistico che naturalistico.

Summary

The conditions for foundation and maintenance of two Viburnum collections in the Italian Riviera (Sanremo, IM) and in a pre-Appennine environment (Vezzanelli di Zignago, SP) are described. Growth data are collected on the 80 accessions in order to determine the adaptability to the different environmental conditions. The collection at Vezzanelli is an initiative carried out with the cooperation of Comune di Zignago, it also aims to set up call for both tourism and natural.

Parole chiave

Viburno, collezione, germoplasma, vivaismo, produzioni ornamentali, giardino, acclimatazione, crescita, fenologia

Keywords

Viburnum, collection, germplasm, nursery, ornamental production, garden, acclimatization, growth, phenology

1 Introduzione – Importanza economica

La scelta sul genere è stata determinata dall'importanza che alcune specie di Viburno rivestono in campo florovivaistico. I tre Viburni Europei sono diffusamente utilizzati ad esempio come portainnesto (*V. opulus* e *V. lantana*) o per diffuse produzioni di piante in vaso (*V. tinus*) in vivai dal Nord Italia fino alla Sicilia. Una importanza non trascurabile da un punto di vista economico è rappresentato dalla presenza sui mercati floricoli delle suddette specie europee nelle diverse tipologie di fronde per reciso. Fronda fiorita in primavera (*V. opulus* Sterile) e in pieno inverno (*V. tinus* Macrophylla) o di fronde con frutto in estate (*V. opulus* Compactum; *V. opulus* Xanthocarpum) o in tardo autunno (*V. tinus*; *V. tinus* Eve Price; *V. tinus* Compactum; *V. tinus* Macrophylla). Produzione di nicchia nel settore delle fronde con frutto estive è anche *V. lantana*. Meno importanti, almeno per i viburni europei, sono le presenze nella tipologia di fronda verde, commercializzata per tutto l'anno, rappresentata quasi esclusivamente da *V. tinus* (*V. tinus* Variegatum, *V. tinus*, *V. lucidum*). La presenza massiva di Viburni non solo europei è certamente nei giardini dove molte specie sono usate ad esempio come siepi divisorie sempreverdi (*V. tinus*, *V. rhytidophyllum*, *V. lucidum*) o apprezzate per la spettacolare fioritura primaverile (*V. opulus* Sterile, *V. x burkwoodii*, *V. carlesi*, *V. x carlcephalum*, *V. x juddii*, *V. plicatum*) o per la fioritura invernale (*V. x bodnantense*, *V. suspensum*, *V. tinus*) o ancora semplicemente valorizzati per il fogliame verde (*V. lucidum*, *V. cinnamomifolium*, *V. davidii*) anche per le colorazioni spettacolari autunnali (*V. opulus*, *V. dentatum*, *V. Huron*). Le specie citate sono solo una piccola parte del genere, versatile per caratteristiche biologiche, agronomiche e ornamentali, tolleranti in alcuni casi condizioni climatiche estreme. Alcune specie a foglia caduca tollerano temperature fino a – 20 °C; altre si contraddistinguono per la forte tolleranza alla siccità.

* doi:10.4458/0986-52

1.1 Il Genere Viburno – Cenni di classificazione

Come per molti altri generi i Viburni sono in sostanziale revisione da parte dei classificatori. Inseriti nell'ordine Dipsacales (Thorne,1992) la loro appartenenza alla famiglia Caprifoliaceae (Cronquist, 1988) è stata messa in discussione da ulteriori studi di tipo genetico (Backlund and Bremer, 1997) e attualmente i Viburni sono classificati nella famiglia Adoxaceae, sempre nell'ordine Dipsacales. Ciò non esclude tuttavia ulteriori cambiamenti, anche a seguito di moderne tecniche di analisi genetica.

Vengono annoverate nei vari dizionari (Bailey, 1958; AA.VV,1999) circa 200 specie, tutte arbustive sparse nell'emisfero boreale, dal vecchio continente, all'Asia, all'America al nord Africa. Il numero delle specie varia molto a seconda delle diverse revisioni (Dirr, 2008) tuttavia la maggior parte delle specie è di provenienza asiatica (Kenyon, 2001). Più recenti studi di tassonomia (Donoghue et al. 2004; Winkworth and Donoghue, 2005) riducono a 175-160 il numero delle specie ascrivibili al genere Viburnum.

1.2 Origine della collezione

Diverse prove sperimentali sono state fatte sul genere Viburno nell'ambito di progetti di ricerca riguardanti la programmazione della fioritura per *V. tinus*, *V. opulus* Sterile, *V. x burkwoodii* a partire dal 1997 con un Progetto finanziato dalla Regione Liguria. Sono state messe a punto tecniche colturali idonee per produzione di fronda fiorita o fronda con frutti di altri viburni, comprese le esigenze nutrizionali e le modalità di potatura. Altre specie ancora sono state studiate per valorizzarne la potenzialità di sfruttamento sempre per il settore della fronda recisa. I risultati di questa serie di attività pluriennale sono confluiti in un libro (Dalla Guda & Farina, 2004) oltre che in alcuni articoli di specifico contenuto su Riviste tecnico/scientifiche di settore o rapporti tecnici per operatori alla produzione. L'ampio numero di accessioni (specie/varietà/piante da seme) costituitosi negli anni ha permesso di poter costituire un nucleo di piante ben acclimatate (Tabella 1). Il mantenimento della collezione, compreso il rinnovo e l'implementazione è da anni finanziato da progetto FAO - RGV.

1.2.1 Costituzione della collezione

Le piante appartenenti alle diverse specie/varietà sono state acquistate nel tempo in vivai specializzati situati in Olanda, nel Nord Italia o viciniori nell'area del Ponente Ligure. Una piccola quota di piante è frutto di propagazione effettuata in loco. Da una quindicina di anni esiste quindi nell'azienda sperimentale del CRA-FSO a Sanremo una collezione di specie/cultivar di Viburno utilizzata per attività di ricerca o per valutazioni di base relative all'adattabilità delle specie o cultivar del genere all'ambiente mediterraneo (localizzazione Sanremo, areale costiero 50 m s.l.m.). Nel 2006 è iniziata la realizzazione della duplicazione parziale della collezione in provincia di La Spezia (zona preappenninica, 800 m s.l.m.).

Tab. 1 Lista completa delle accessioni di Viburno (anno 2011)

N°	Specie/varietà	N°	Specie/varietà
1	<i>V. bitchiuense</i>	41	<i>V. lucidum</i>
2	<i>V. x bodnantense</i> Charles Lamont	42	<i>V. macrocephalum</i>
3	<i>V. x bodnantense</i> Dawn	43	<i>V. macrocephalum</i> Keteleeri
4	<i>V. bracteatum</i>	44	<i>V. nudum</i> Winterthur
5	<i>V. buddleifolium</i>	45	<i>V. odoratissimum</i> Awabuki
6	<i>V. x burkwoodii</i>	46	<i>V. opulus</i> (specie)
7	<i>V. x burkwoodii</i> Anna Russel	47	<i>V. opulus</i> (clone portainn.)
8	<i>V. x burkwoodii</i> Annika	48	<i>V. opulus</i> Compactum
9	<i>V. x burkwoodii</i> Chenaultii	49	<i>V. opulus</i> Compactum Nanum
10	<i>V. x burkwoodii</i> Conoy	50	<i>V. opulus</i> Sterile
11	<i>V. x burkwoodii</i> Park Farm	51	<i>V. opulus</i> <i>Xanthocarpum</i>
12	<i>V. x carlcephalum</i>	52	<i>V. parvifolium</i>
13	<i>V. carlesi</i>	53	<i>V. plicatum</i> Igloo
14	<i>V. carlesi</i> Aurora	54	<i>V. plicatum</i> Lanarth
15	<i>V. cassinoides</i> Bullatus	55	<i>V. plicatum</i> Mariesii

Viburno

16	<i>V. cassinoides</i> Sear Charms	56	<i>V. plicatum</i> New Port
17	<i>V. chingii</i>	57	<i>V. plicatum</i> Pink Beauty
18	<i>V. cinnamomifolium</i>	58	<i>V. plicatum</i> plicatum
19	<i>V. cylindricum</i>	59	<i>V. plicatum</i> Pop Corn
20	<i>V. davidii</i>	60	<i>V. plicatum</i> Rotundifolium
21	<i>V. dentatum</i> Autumn Jazz	61	<i>V. plicatum</i> St.Keverne
22	<i>V. dentatum</i> Longifolium	62	<i>V. plicatum</i> Rowallane
23	<i>V. dentatum</i> Moonglow	63	<i>V. plicatum</i> Shasta
24	<i>V. dentatum</i> Scabrellum	64	<i>V. plicatum tomentosum</i>
25	<i>V. dilatatum</i> Erie	65	<i>V. plicatum</i> Watanabe
26	<i>V. dilatatum</i> Ineke	66	<i>V. x pragense</i>
27	<i>V. erubescens</i>	67	<i>V. propinquum</i>
28	<i>V. Eskimo</i>	68	<i>V. rhytidophyllum</i>
29	<i>V. farreri</i>	69	<i>V. rhytidophyllum</i> Green Trump
30	<i>V. farreri</i> Nanum	70	<i>V. rhytidophylloides</i> Willwood
31	<i>V. foetidum</i> ceanothoides	71	<i>V. rufidulum</i> Royal Gard
32	<i>V. x globosum</i>	72	<i>V. sargentii</i> Onondaga
33	<i>V. grandiflorum</i>	73	<i>V. setigerum</i>
34	<i>V. harryanum</i>	74	<i>V. sieboldi</i> Seneca
35	<i>V. x hillieri</i> Winton	75	<i>V. suspensum</i>
36	<i>V. ichangense</i>	76	<i>V. tinus</i>
37	<i>V. x juddii</i>	77	<i>V. tinus</i> Compactum
38	<i>V. lantana</i>	78	<i>V. tinus</i> Eve Price
39	<i>V. lantana</i> Mohican	79	<i>V. tinus</i> Macrophylla
40	<i>V. lobophyllum</i> Huron	80	<i>V. tinus</i> Variegatum

1.2.2 Obiettivi dell'attività di collezione

Gli obiettivi possono essere così sintetizzati:

- Costituire e preservare un serbatoio di germoplasma afferente al genere *Viburnum*;
- Acquisire conoscenze sulla biologia, sulla tecnica di coltivazione, sulla adattabilità a condizioni pedoclimatiche mediterranee di specie/cultivar di Viburno con osservazioni prolungate negli anni. Le attività comprendono la coltivazione in ambienti rivierasche o di media collina, il rilevamento di dati fenologici, la caratterizzazione morfologica e la valutazione di attitudine alla propagazione vegetativa o sessuata;
- Valorizzare il genere Viburno nel settore delle produzioni ornamentali definendo la validità di specie/cv per l'utilizzazione come fronda recisa, pianta in contenitore o in piena terra per arredo urbano, per giardino;
- Favorire la diffusione di conoscenze sulla biodiversità in addetti al settore florovivaistico, in studenti, o a più ampio raggio in semplici visitatori anche occasionali;
- Le collezioni possono risultare elementi di attrazione a scopo turistico; possono proporsi come risorsa socio economica per il territorio.

1.3 La Collezione a Sanremo

La collezione a Sanremo è mantenuta presso la Sede CRA-FSO. Consta di circa 40 specie corrispondente a circa 80 accessioni considerando anche le varietà. La collezione è mantenuta all'aperto in piena terra (Foto 1) e in piccola parte in vaso. Le piante in piena terra sono mantenute con automazione irrigua garantita da monitoraggio continuo dello stato idrico del terreno eseguita da idoneo sensore. Sulla collezione vengono eseguite attività di manutenzione, di ricerca agronomica di base (crescita, adattabilità), rilievi fenologici e morfologici. Esiste una attività di acquisizione di dati meteorologici locali per eventuali correlazioni con dati di adattabilità o con dati fenologici.

L'attività di manutenzione comprende anche la predisposizione di riserve di piante per intervenire in caso di mortalità o decadimento di esemplari. Pertanto sono state eseguite attività tipiche delle più comuni tecniche di propagazione vegetativa (taleggio, radicazione) e in qualche caso anche di riproduzione per seme. Specie recalcitranti alla propagazione per

talea sono state propagate per innesto. Esiste un vivaio per l'allevamento del materiale propagato.

1.3.1 Gestione irrigua e operazioni di manutenzione delle piante

La gestione irrigua è automatizzata tramite sensoristica FDR (monitoraggio del contenuto d'acqua del terreno) e sistema Agrimonitoring situato localmente. La distribuzione d'acqua avviene tramite erogatori su linee di irrigazione. Il numero di erogatori è relazionato alla dimensione e caratteristiche vegetative della pianta (pianta a foglia caduca o sempre verde).

Potature di mantenimento vengono eseguite in periodi invernali o estivi a seconda delle caratteristiche vegetative del materiale vegetale.

La nutrizione è assicurata da interventi di distribuzione di concime ternario in periodo invernale e da un paio di fertirrigazioni in periodo primaverile/estivo.

1.3.2 Criteri di disposizione delle piante

La parte più antica della collezione (piantagioni dal 1997) è occupata dalle tre specie



mediterranee in più varietà e da *V. x burkwoodii*. Successivamente sono state introdotte in questo appezzamento altre specie con lo scopo di valutarne l'adattabilità per fronda con frutto o per fronda verde. Disposto tutto su una fascia pianeggiante di terreno, su 3-4 file, l'impianto prevede una distanza minima fra un individuo e l'altro di almeno 1,2-1,5 m. Sono presenti circa una trentina fra specie e varietà.

Una fascia di terreno è stata dedicata successivamente (impianto 2005) alla collezione di *V. plicatum* (circa una decina di varietà) e altre 6 specie (*V. nudum*, *V. sieboldi*, *V. rufidulum*, *V.x bodnantense*, *V. cassinoides*, *V. farreri*) disposte sempre su 3 file ma intervallata da essenze (*Idesia polycarpa*) atte a fornire ombra in estate alle piante sottostanti. Due altri piccoli appezzamenti sono occupati da viburni a fioritura spettacolare (una decina fra specie/varietà) o anche semplicemente in temporanea osservazione. Una quota di individui viene anche mantenuta in vaso a scopo di eventuale rimpiazzo. Ciascuna specie/varietà è presente in 2 o più esemplari.

Foto 1 Un'immagine della collezione di Viburni a Sanremo (periodo estivo).

1.4 La collezione a Vezzanelli (Comune di Zignago, SP)

Più recentemente nell'ambito di obiettivi di programmi di valorizzazione e salvaguardia del germoplasma vegetale (derivante da Programma FAO-RGV) è stata avviata la duplicazione della collezione in ambiente differente da quello rivierasco di Sanremo. Allo scopo sono stati realizzati accordi col Comune di Zignago (La Spezia) che ha messo a disposizione terreno, mano d'opera e mezzi per la realizzazione di un "Giardino dei Viburni" in località Vezzanelli (zona preappenninica, 800 m s.l.m.). Per l'Unità di Ricerca CRA-FSO il Giardino dei Viburni è così utilizzato per eseguire in modo più allargato prove di adattamento di essenze del genere di Viburno alle condizioni climatiche; per il Comune di Zignago si tratta di predisporre un punto di richiamo turistico in una zona già di suo ricca di potenziale naturalistico. La collezione è stata dotata di un impianto di irrigazione localizzato che è stato messo in condizione di essere

attivato attraverso messaggistica SMS, previa valutazione di opportunità di intervento a partire dall'informazione sull'entità delle precipitazioni naturali desunte via Web dalla rete meteo della Regione Liguria (stazioni di Sesta Godano, Serò, Casoni, Cuccarello). Più recentemente il Giardino è stato dotato di un sensore di contenuto idrico del terreno che comunica il dato con un sistema computerizzato di supporto decisionale all'irrigazione in grado di inviare comando di apertura di elettrovalvole al conseguimento di un valore di set-point prestabilito. Il Giardino dei Viburni a Vezzanelli è dotato di pannello fotovoltaico per garantire autonomia energetica nella gestione di monitoraggio, ricetrasmisione di dati/comandi, azionamento degli attuatori di intervento irriguo (elettrovalvole).

1.4.1 Localizzazione e contesto economico-naturalistico della Collezione a Vezzanelli

L'ampio prato dei Vezzanelli, appena sotto il Monte Dragnone, si colloca lungo la vecchia strada che da Levanto portava a Pontremoli incrociando l'Alta Via dei Monti liguri. La via di comunicazione ha storicamente collegato le attività sociali, economiche rurali fra i territori rivieraschi del Levante Ligure (dalle Cinque Terre sino a Sestri Levante) a quelle dei territori più interni verso la pianura Padana, coinvolgendo anche quelle del comune di Zignago come zona di transizione fra le precedenti.

Oggi questi luoghi di significato storico sono frequentemente meta di escursionisti, attirati dai santuari dislocati lungo l'antico sentiero, dalle fonti, dalle espressioni della natura; si possono con facilità riscoprire luoghi sereni e spaziosi, profumi di erbe, suoni antichi e oasi di silenzi, impressioni ormai quasi dimenticate ma che la Liguria interna sa ancora offrire. Il giardino montano intende rafforzare questi vincoli fra uomo e paesaggio e i Viburni sembrano calarsi perfettamente nel ruolo, come specie rustiche capaci tuttavia di offrire generosa bellezza e genuinità.

1.4.2 Le specie – base "mediterranee"

La specie a fioritura più spettacolare è *Viburnum opulus* Sterile, tipico di aree centro-settentrionali europee (Foto 2). È una specie ortiva conosciuta più comunemente come "Palla di Neve" o "Pallon di Maggio", nome che richiama il periodo di fioritura e la forma globosa dell'infiorescenza. La specie spontanea (*V. opulus*) è a fioritura più modesta, infiorescenza piatta e fiori fertili piccoli, ma comunque in grado di regalare in estate frutti a grappolo rossi di grande impatto ornamentale. Mediterraneo è invece *Viburnum tinus*, conosciuto come "lentaggine" e noto per le sue fioriture che, nei climi più miti, si protraggono dall'autunno fino a primavera inoltrata, per il fogliame lucido e per i frutti blu intenso, quasi metallici che la specie e qualche cultivar portano in abbondanza.

Foto 2 Alcuni Viburni mediterranei in collezione a Vezzanelli.



V. opulus Sterile "Palla di neve"



V. tinus (sec. piano); in primo piano *V. lucidum*



V. opulus Compactum



V. tinus, fruttificazioni

Infine *V. lantana*, forse il più rustico per resistenza sia al freddo che alla siccità, con i suoi steli usati anticamente per legare fascine, la fioritura abbondante e poi le infruttescenze dense con drupe verdi immature, rosse e infine nere a fine ciclo. Proprio da questi tre Viburni, specie che sono diffuse in natura nei boschi e zone collinari dell'Europa, è nata l'idea di realizzare il giardino in tre settori: il settore delle fioriture primaverili spettacolari; il settore dei frutti ornamentali estivi-autunnali; il settore della collezione di cultivar e di altre specie di Viburno anche di provenienza non strettamente europea.

Non mancano nell'ambito delle tre specie citate diversificazioni varietali: *V. tinus* è presente anche nelle cultivar *Macrophylla*, *Variegatum*, *Compactum* e *Eve Price*, *V. lantana* anche nella varietà *Mohican*, *V. opulus* anche nelle cultivar *Sterile* e *Xanthocarpum*.

1.4.3 Le altre specie non mediterranee

Sono presenti per alcuni degli scopi generali della collezione molte specie di Viburno, soprattutto di provenienza Nord-Americana o asiatica, sia da zone fredde (aree montane asiatiche) che relativamente temperate (estremo oriente, isole del Pacifico orientale). Esistono anche ibridi mentre la diversificazione è ulteriormente garantita, nel caso di alcune specie, da cultivar, talora numerose. Questa massa di materiale vegetale, proveniente o selezionata in ambienti molto differenti da quelli della collezione consente una attività di verifica di ambientamento e di selezione per condizioni climatiche specifiche, interessanti per lo sfruttamento in Italia. Ovviamente si conta sulla possibilità di incrementare ulteriormente in futuro il numero di accessioni presenti nella collezione.

Foto 3 Viburni ad elevato valore ornamentale in collezione a Vezzanelli.



V. x burkwoodii, infiorescenza



V. plicatum plicatum



V. macrocephalum



V. x juddii, infiorescenze

Molte specie/ ibridi hanno forte potenziale ornamentale, per fioritura, fruttificazione o fogliame e valorizzano l'aspetto del Giardino. Fra le specie a fioritura spettacolare primaverile *V. x burkwoodii*, *V. carlesi*, *V. x juddii*, *V. macrocephalum*, *V. sargentii* *Onondaga* e le diverse varietà di *V. plicatum* (Foto 3). Sono inoltre interessanti per la presenza di fruttificazioni estive molto ornamentali *V. setigerum* e *V. rhytidophyllum*. La totalità delle specie garantisce al giardino un mosaico di colori intensi per fogliame, verde più o meno brillante o giallo-arancio fino a rosso fuoco in autunno. Profumati a fioritura, tali da poter costituire un giardino a percorso sensoriale sono *V. x burkwoodii* in diverse varietà, *V. carlesi*, *V. x carlcephalum*, *V. bitchiuense*.

1.4.4 Altre specie, altri generi

Per motivi tecnici quali garantire ombra alle piante più esigenti o per realizzare siepi divisorie sono state inserite nel giardino altre essenze, scelte anche per la rusticità e l'adattabilità al



Cotonaster lacteus



Pyracantha



Callicarpa japonica

Foto 4 Altri generi ad elevato valore ornamentale in collezione a Vezzanelli.

luogo ma tutte contraddistinte dalla presenza di frutti ornamentali godibili dalla tarda estate (*Photinia serrulata*, *Idesia polycarpa*, *Callicarpa japonica*, *Cydonia oblonga*, *Cotoneaster* sp., *Pyracantha* sp., *Melia azedarach*, *Diospyros* sp) (Foto 4). Anche su tali essenze, in possesso di forti caratteri ornamentali, sono eseguiti test di adattabilità al clima locale.

1.4.5 Schema di realizzazione del Giardino dei Viburni

Schema del Giardino dei Viburni, diviso nei tre settori-obiettivo, con identificativo (numerico) e relativa localizzazione di alcune essenze



Parte superiore - I settore: fioriture primaverili (entrata)- II settore: frutti autunnali (centrale)
- III settore: germoplasma di viburno (a destra e nella parte inferiore)

Legenda Viburni e di altro materiale vegetale a Vezzanelli

1 *V. x juddii*; **2** *V. x burkwoodii*; **3-4-5** *V. x burkwoodii* Anna Russel, Annika, Park Farm; **6** *V. x bodnantense* Charles Lamont; **7** *V. plicatum plicatum*; **8** *Idesia polycarpa*; **9-10-11** *V. plicatum* Pink Beauty, Igloo, Shasta; **12** *V. buddleifolium*; **13** *Photinia serrulata*; **14** *V. lantana* Mohican; **15** *V. lantana*; **16-17-18-19** *V. tinus macrophylla*, *Variegatum*, *Compactum*, Eve Price; **20** *V. suspensum*; **21** *V. lucidum*; **22** *V. tinus*; **23** *V. parvifolium*; **24** *V. harryanum*; **25** *V. x carlcephalum*; **26-27** *V. x burkwoodii* Conoy, Chenaultii; **28** *V. x hillieri* Winton; **29** *Diospyros* sp.; **30** *V. x bodnantense* Dawn; **31** *V. Eskimo*; **32** *V. dilatatum* Erie; **33** *V. dentatum* Autumn Jazz; **34** *V. setigerum*; **35** *V. cinnamomifolium*; **36** *V. nudum* Winterthur; **37** *V. bracteatum*; **38** *V. Huron*; **39** *V. davidii*; **40** *V. x pragense*; **41** *V. dentatum* Moonglow; **42** *V. odoratissimum* Awabuki; **43-44** *Callicarpa japonica* frutti viola, fr.bianchi; **45-46-47-48** *Cotoneaster salicifolius*, *nitens*, *lacteus*, *pannosus*; **49-50** *V. opulus*; **51** *V. opulus* Sterile; **52** *Melia azedarach*; **53** *Cryptomeria japonica*; **54** *Paulownia tomentosa*; **55-56** *Pyracantha coccinea*, SR; **57** *Cydonia oblonga*; **58-59** *V. opulus* Compactum, Xanthocarpum; **60** *V. propinquum*; **61** *V. rhytidophyllum* Green Trump; **62** *V. rhytidophyllum*; **63** *V. carlesii* Aurora; **64** *V. macrocephalum*; **65** *V. x globosum*; **66** *V. sargentii* Onondaga; **67** *V. chingii*; **68-70-71** *V. plicatum* Pop Corn, Newport, Watanabe; **69** *Catalpa* sp.; **72** *V. bitchiuense*; **73** *V. foetidum* var. *ceanothoides*; **74** *V. grandiflorum*; **75** *V. erubescens*; **76** *V. dilatatum* Ineke; **77** *V. cassinoides* Sear Charm; **78** *V. ichangense*; **79** *V. rufidulum*; **80** *Aesculus*

hippocastanum; **81** *V. sp.*; **82** *Chaenomeles cv.*; **83-84** *Spirea* fiore rosa, bianco; **85-86** *Syringa vulgaris* fiore rosa, bianco; **87** *Pyracantha cvs.*; **88** *Hypericum androsaemum*; **89-90** *V. dentatum* Scabrellum, Longifolium; **91** *V. rugosum*; **92** *V. rhytidophylloides* Willwood; **93** *V. sieboldi* Seneca; **94** *Cornus nuttallii*; **95-96-97** *V. plicatum* Mariesii, Rowallane, Lanarth; **98** *V. plicatum f. tomentosum*; **99** *Pyracantha sp. e cvs.*; **100** *V. cassinoides* Bullatus; **101-109** *V. da seme.*

L'inizio della realizzazione della collezione nell'appezzamento superiore è dell'estate 2006. L'inizio della realizzazione nell'appezzamento inferiore è del 2010.

1.5 Bibliografia

- AA.VV., 1999. *Viburnum*. in 'Dictionary of Gardening'. The Royal Horticultural Society. Huxley, Griffiths, Levy Eds. Vol IV :656-661. ISBN 1-56159-240-4.
- Backlund A., Bremer B. 1997. Phylogeny of Asteroidae based on rbcL sequences, with particular references to Dipsacales. *Pl Syst. Evol.* 207:225-254.
- Bailey L.H., 1958. *Viburnum*. in 'The Standard Cyclopaedia of Horticulture'. The Mc Millian Company. Vol III :3456-3464.
- Cronquist a., 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants (II Edition). New York Botanical Garden. New York.
- Dalla Guda C., Farina E. 2004. *Viburni per l'areale mediterraneo*. Ace International. ISBN 88-87387-10-9 (128 pagine).
- Dirr M.A., 2008. *Viburnums. Flowering Shrubs for Every Season*. Timber Press, Portland-London. (262 pagine).
- Donoghue M. J., Baldwin J. Li., Winkworth R. C. 2004. *Viburnum* phylogeny based on chloroplast trnK intron and nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Syst. Bot.* 29:188-198.
- Thorne, 1992. Classification and Geography of Flowering Plants. *Botanical Review* 58:225-348.
- Winkworth R.C. and Donoghue M. J., 2005. *Viburnum* phylogeny based on combined molecular data: implications for taxonomy and biogeography. *Amer. J. Bot.* 92:653-666.

CAMPANULE: OPPORTUNITÀ PER IL SETTORE ORNAMENTALE*

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Carla Dalla Guda e Dr. Enrico Farina

CRA-FSO Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali
Corso Inglesi, 508 – 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

La collezione afferente al genere *Campanula* a Sanremo consta di materiale commerciale acquisito da ditte sementiere e/o giardini Botanici ma anche di specie spontanee reperite in zona o sul territorio italiano (*C. fragilis*, *C. versicolor*, *C. sabatia*, *C. macrorhiza*, *C. cochleariifolia*, *C. isophylla*). Consta anche di materiale originale (popolazioni da seme) ottenuto attraverso selezione di genotipi commerciali e/o da flora spontanea adattata alle condizioni climatiche più mediterranee della riviera, a minor esigenza di vernalizzazione (*C. persicifolia*) o con peculiari caratteristiche di rifioritura (*C. glomerata*, *C. latifolia*, *C. trachelium*). La costituzione della collezione è avvenuta nel tempo a seguito di programmi di ricerca volti alla valorizzazione del genere *Campanula* per l'inserimento di nuove specie nei processi industriali di produzione del settore delle ornamentali; nell'ottica della salvaguardia delle specie locali endemiche o sub endemiche; con lo scopo di definire itinerari tecnici di produzione per le diverse specie individuandone infine il settore di destinazione finale: fiore reciso, vaso fiorito, giardino, arredo urbano. Viene anche sottolineata l'importanza del genere per il settore vivaistico nonché il ritorno economico per turismo o per la semplice produzione di materiale sementiero a livello locale per specie rare, caratteristiche o semplicemente adattate.

Summary

The *Campanula* collection at Sanremo consists of materials acquired from seed companies and/or botanical gardens or nurseries, but also of wild species found in the area of Western Liguria or on the Italian territory (*C. fragilis*, *C. versicolor*, *C. sabatia*, *C. macrorhiza*, *C. cochleariifolia*, *C. isophylla*).

The continuous cycles of gametic propagation necessary to maintain the presence of many annual species succeeded in obtaining plants adapted to the local mediterranean conditions. So selections flowering in mild winter conditions (*C. persicifolia*) or with the peculiar characteristics of re-flowering in the climatic conditions of the Riviera dei Fiori (*C. glomerata*, *C. latifolia*, *C. trachelium*) are available. Plants with interesting agronomic or morphologic characters are propagated by crown division or by cuttings. The constitution of the collection started after research programs aimed to the evaluation of species of the genus *Campanula* as new ornamental crops suitable for cut flowers/potted plant production, for garden or landscape.

Parole chiave

Biodiversità, specie endemiche, fiore reciso, vaseria, collezioni

Keywords

Biodiversity, endemic species, cut flower, pot plants, collections

1 Introduzione

A forte diffusione nell'areale mediterraneo, il genere *Campanula* con le 60 specie presenti sul territorio italiano (Pignatti, 1982), circa 1/5 del patrimonio mondiale, offre notevoli opportunità per il settore delle ornamentali. Presenze quasi abituali, ai margini dei boschi, nelle radure, sui declivi, a lato delle strade, le campanule sono fiori tradizionalmente legati a un ambiente che è familiare alla maggior parte degli Europei anche se non mancano specie esotiche dell'estremo Oriente, molto interessanti da un punto di vista ornamentale. Blu, e non solo blu, ma viola,

* doi:10.4458/0986-53

bianche, rosa, bicolori, maculate, raramente gialle, rappresentano un serbatoio di germoplasma da valorizzare e potenziare.

1.1 Il materiale in collezione

Da alcuni anni presso il CRA-FSO, nel contesto di una attività sulla innovazione di prodotto attraverso la valorizzazione di specie minori, sono state valutate per il genere *Campanula* le potenzialità di una trentina di specie spontanee e/o commerciali in relazione a un possibile loro inserimento nei diversi settori del fiore reciso, del vaso fiorito, del giardino, dell'arredo urbano. Questa attività di ricerca che ha previsto anche il reperimento di germoplasma autoctono ha permesso di raccogliere presso il CRA-FSO materiale spontaneo raro o peculiare (specie endemiche o subendemiche) accanto a genotipi commerciali, valorizzati per vaso fiorito ma anche apprezzati per le diverse tipologie di giardino (roccioso, montano, mediterraneo, inglese). Le diverse specie sono osservate in crescita libera, valutandone l'attitudine all'ambientamento in zona mediterranea, la naturale temporizzazione delle fasi di sviluppo, il possesso di requisiti per il settore del reciso e/o la potenzialità per vaso o giardino.

La collezione di *Campanule* presso il CRA-FSO è costituita da un mix di materiali così definibili:

- a) piante ottenute da seme prodotto da coltivazione in loco di spontanee ovvero da seme raccolto in natura e/o da seme commerciale; trattandosi di specie nella maggior parte dei casi annuali, ripetuti cicli di propagazione gamica hanno dato origine a popolazioni selezionate per adattabilità alle condizioni locali;
- b) piante propagate per taleggio e/o divisione di genotipi ritenuti interessanti per caratteristiche di tipo commerciale, potenzialmente commerciale o agronomico (rifiorenza, taglia, colore del fiore, ecc.). Si tratta di materiale commerciale, oppure di materiale originale, identificato in popolazioni da seme, e propagato per via vegetativa per il mantenimento di tali caratteri superiori.

Il materiale è allevato in piena terra, con substrato più o meno pesantemente ammendato con materiali organici a seconda delle esigenze della specie, oppure in vasi di varie dimensioni. I vasi possono essere deposti al suolo o sospesi (basket) L'ombreggio estivo è pratica routinaria. Alcune specie peraltro devono essere allevate durante l'estate portando le piante in vaso in ambienti raffrescati.

Irrigazioni vengono fornite secondo frequenze tipiche della stagione, del contesto in cui si sviluppa l'apparato radicale, della dimensione del vaso. Ne risulta l'impiego di irrigazione localizzata (ala gocciolante, spaghetti), sia di irrigazioni con lancia e manica di distribuzione (contenitori per piante in frequente spostamento in conseguenza di rinvasi). La nutrizione viene assicurata da fertirrigazioni relativamente rade. I trattamenti antiparassitari sono soprattutto volti al contrasto delle attività di fitofagi e limacce.

Sulle piante vengono eseguiti a cadenza rilievi di tipo fenologico e vengono programmate operazioni per il ricambio/reintegro di piante in fase di deperimento, di notevole anzianità o morte.

A tale scopo vengono eseguite in genere semine nella stagione autunno/invernale oppure radicazioni di talea o divisione di cespo fra l'autunno e la primavera. Dopo le fasi propagative le piante sono sottoposte alle comuni pratiche vivaistiche.

Infrequentemente si fanno acquisizioni di seme da Ditte sementiere, spesso specializzate sul genere. In alcuni casi si procede all'acquisizione di cultivar o materiale clonale. Spesso si provvede per le specie dell'areale Ligure a raccolta di seme in natura, in quantitativi modesti e senza distruggere le piante.

Lista di *Campanule* in collezione a Sanremo, CRA-FSO

Specie di riferimento, varianti morfologiche	Origine/ Caratteri "superiori"	Metodo di propagazione corrente
<i>C. medium</i> fiore bianco	Selezione -Stelo eretto, colore bianco puro	micropropagazione
<i>C. persicifolia</i> mix colori (bianco-azzurro); <i>C. persicifolia</i> cv Chettle Charm	Selezioni- Adattata a inverni miti (mix); commerciale	Seme/divisione cespo
<i>C. trachelium</i> mix colori (bianco-blu-viola).	Selezioni -Floribundità superiore	Seme

Campanule: opportunità per il settore ornamentale

<i>C. glomerata</i> cl.4/8; <i>C.glomerata</i> cv.Joan Elliott	Selezioni- Elevata floribundità, per reciso/giardino (clone 4/8)	Divisione cespo
<i>C. glomerata</i> vari cloni fiori bianchi o blu violaceo	Selezioni- In fase di test agronomico	Divisione cespo
<i>C. latifolia</i> varie selezioni fiori blu, viola, bianco, rosa; <i>C.latifolia</i> var.macrantha	Adattata a climi mediterranei, selezioni a colore orientato	Seme
<i>C. rapunculoides</i> mix seme, clone	Selezioni- Clone taglia bassa	Divisione cespo
<i>C. pyramidalis</i> , fiorie bianco, fiore blu.		Seme
<i>C. lactiflora</i> ; <i>C. lactiflora</i> cv. Loddon Anna	Commerciale	Divisione cespo (cv.Loddon Anna)
<i>C. thyrsoides</i>	Commerciale	Seme
<i>C. primulifolia</i>	Commerciale	Seme
<i>C. rigidipila</i> (così acquisita)	Commerciale	Seme
<i>C. americana</i>	Commerciale	Seme
<i>C. antennaria</i> (così acquisita)	Commerciale	Seme
<i>C. kolenatiana</i>	Commerciale	Seme
<i>C. ochroleuca</i>	Commerciale	Seme
<i>C. alliariifolia</i>	Commerciale	Seme
<i>C. takesimana</i> mix seme e vari cloni	Selezioni- Cloni distinti per colore	Divisione cespo
<i>C. punctata</i> mix seme	Selezioni	Divisione cespo
<i>C. portenschlagiana</i> (<i>C.muralis</i>)	Selezioni	Seme, divisione cespo
<i>C. poscharskyana</i>	Selezioni	Seme/talea
<i>C. carpatica</i> fiore.blu, fiore bianco	Commerciale	Seme
<i>C. macrorhiza</i>	Spontanea	Seme/Divisione cespo
<i>C. sabatia</i>	Spontanea	Seme
<i>C. isophylla</i>	Spontanea e commerciale	Seme/Talea/Divisione cespo
<i>C. fragilis</i>	Spontanea	Seme/Talea
<i>C. garganica</i>	Commerciale	Seme/Divisione cespo
<i>C. cochleariifolia</i>	Spontanea e Commerciale	Seme/Talea/Divisione cespo
<i>C. versicolor</i>	Spontanea e Commerciale	Seme
<i>C. rotundifolia</i> , <i>C.rotundifolia</i> . cv. White Gem	Spontanea e Commerciale	Seme/Talea/Divisione Cespo
<i>C. makaschvilii</i>	Commerciale	Seme
<i>C. moesiaca</i>	Commerciale	Seme
<i>C. Pamela</i>	Commerciale	Talea
<i>C. Blue Star</i> (Addenda)	Commerciale	Talea
Altre Campanulacee		
<i>Platycodon densiflorus</i>	Commerciale- mix .blu, rosa, bianco	seme
<i>Adenophora pereskiaefolia</i>	Commerciale	seme
<i>Azorina vidalii</i> (<i>C. vidalii</i>)	Commerciale (endemismo Isole Azorre)	seme

1.2 Attività di propagazione (il mantenimento)

L'attività di mantenimento del materiale vegetale risulta particolarmente onerosa comprendendo specie annuali o bienni (*C. rapunculus*, *C. medium*), monocarpiche, (*C. thyrsoides*), altre non particolarmente longeve (*C. trachelium*, *C. lactiflora*, *C. latifolia*). Non mancano esempi però di campanule a carattere quasi infestante quali *C. primulifolia* che produce quantitativi esagerati di seme o di specie a forte colonizzazione del terreno (*C. muralis*, *C. poscharskyana*, *C. punctata*, *C. takesimana*). La germinabilità del seme inoltre non raggiunge valori ottimali per tutte le specie anche per quelle reperite in giardini botanici o

presso ditte sementiere specializzate. L'attività di allevamento in campo e/o in vaso permette talvolta di raccogliere seme da piante adattate all'ambiente rivierasco e nel tempo di effettuare una selezione per individui in grado di espletare il ciclo di sviluppo in condizioni climatiche strettamente mediterranee. Molto del germoplasma commerciale proviene infatti dal Nord Europa (Danimarca) e, con qualche eccezione, le campanule necessitano di vernalizzazione e di cicli di temperature relativamente fresche per espletare le prime fasi di sviluppo e successivamente fiorire.

1.3 Potenzialità della collezione

La costante attività di reperimento di germoplasma di campanula anche a livello territoriale ha permesso la raccolta di materiale vegetale commerciale ma anche spontaneo. Malgrado la grande diffusione del genere, sono ancora relativamente poche le informazioni relative a specie che potrebbero proporsi o rivisitarsi come innovazione di prodotto per il settore delle ornamentali. Giardino, arredo urbano, vaso fiorito, fiore reciso sono i settori in cui le diverse tipologie di prodotto possono essere proposte e affermarsi. Le osservazioni sul ciclo di sviluppo naturale delle diverse specie (valutazione bioagronomica) ne mettono in evidenza le peculiarità da esaltare o favorire tramite l'applicazione di tecniche agronomiche semplici o avanzate. L'obiettivo primario è valutare il potenziale di adattamento ai processi industriali di produzione nelle specifiche condizioni mediterranee per alcune specie scelte di *Campanula*. Ciò comporta per le spontanee una documentazione (Alberti, 2008; Bernini *et al.*, 2002; Vivaldi Lantrua, 2008) e una indagine di tipo floristico, atta a determinarne diffusione, frequenza, periodo di fioritura, habitat. La grande plasticità di tutto il genere permette inoltre di isolare ecotipi ad alta valenza ornamentale in grado di esprimere al meglio il proprio potenziale di propagazione o di evidenziare, per alcuni individui o in popolazioni da seme, anche tramite incroci guidati, una reattività sfruttabile ai fini della programmazione della fioritura. Valorizzazione di germoplasma, offerta diversificata sul mercato, estensione del periodo dell'offerta, destagionalizzazione, individuazione di nuove tipologie e destinazioni d'uso sono dunque le scelte fatte a livello di obiettivi tecnici di ricerca. Non meno importante è poter realizzare con tali materiali vegetali percorsi tematici a scopo cognitivo e conservativo di specie ad alta valenza ornamentale con particolare attenzione alla flora locale. Lo scopo è di avvicinare il grande pubblico al mondo delle specie spontanee per innescare una richiesta di questi prodotti percepiti come naturali ma innovativi, evocativi, anche rari (Conti *et al.* 1992).

1.4 Fruibilità della collezione

L'attività di ricerca espletata è fruibile da parte di vivaisti e produttori che volessero proporre al mercato specie innovative per il settore del reciso, del vaso fiorito, specie fruibili anche per giardino o per composizioni. La disponibilità di informazioni tecniche è stata ampia (Dalla Guda & Farina, 2010; Farina & Dalla Guda, 2006), pubblicizzata anche attraverso le iniziative di Porte Aperte fatte presso il CRA-FSO. Ampliamento dell'offerta, destagionalizzazione della produzione, continuità dell'offerta, disponibilità di colori e tipologie di fiore differenziate sembrano punti di forza per far affermare questo nuovo prodotto. Anche l'appartenenza ad un contesto mediterraneo è un valore aggiunto alla produzione che non necessita di supporti termici aggiuntivi ma che contemporaneamente qualifica il coltivatore perché altamente specializzata. Anche l'attività vivaistica può trarre vantaggi nell'acquisire tecniche di produzione non solo di materiale destinato al reciso ma anche di materiale raro e connotativo da esitare per giardino privato, per collezione o per arredo pubblico. La produzione di semi in loco potrebbe costituire una attività a notevole riscontro economico per numerose specie di campanule.

1.5 Bibliografia

- Alberti M., 2008. *Fiori di Montagna in Liguria*. Edizioni Grafiche Amadeo -centro stampa offset- Imperia (182 pag). ISBN 978-88-89104-33-0.
- Alberti M., 2008. *Fiori del Mare in Liguria*. Edizioni Grafiche Amadeo -centro stampa offset- Imperia (166 pag). ISBN 978-88-89104-43-9.
- Bernini A., Marconi G., Polani F., 2002. *Campanule d'Italia e dei territori limitrofi*. Verba & Scripta s.a.s. Pavia (192 pag).
- Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1992. *Il Libro Rosso delle piante d'Italia*. WWF.

Dalla Guda C., Farina E., 2010. *Campanule del Mediterraneo*. Editore Ace International 124 pp. ISSN 978-88-87387-25-4.

Farina E., Dalla Guda C., 2006. *Campanula - Guida pratica alla coltivazione*. Editore ACE International-Floritecnica-Data&Fiori. 240 pag. ISBN 88-87387-15-X.

Pignatti S., 1982. *Campanulaceae*. In: *Flora d'Italia*. Vol II: 682-702 Edagricole. ISBN 88-206-2311-0.

Vivaldi Lantrua A. M., 2008. *Flora spontanea nella provincia di Imperia dal litorale alla zona alpina*. Atene edizioni - Arma di Taggia (350 pag) ISBN 88-88330-15-1.

Materiale di campanula in collezione



C. trachelium



C. rapunculoides



C. glomerata, clone



C. persicifolia, selez. locale



C. medium, clone micropropagato



C. macrorhiza



C. garganica

Campanule: opportunità per il settore ornamentale



C. isophylla



C. fragilis



C. portenschlagiana



C. poscharskyana



C. rotundifolia



C. takesimana

UNA COLLEZIONE DI *LILIUM* ASIATICI PRESENTE PRESSO IL CRA-VIV*

Responsabile Scientifico: Dr. Antonio Grassotti

Personale coinvolto: Dott.ssa Beatrice Nesi, Dott.ssa Sara Lazzereschi, Dott.ssa Simona Pecchioli

CRA-VIV Unità di ricerca per il vivaismo e la gestione del verde ambientale ed ornamentale

Via dei fiori, 8 – 51012 Pescia (PT) Tel. 0572 451033

Contatto e-mail: viv@entecra.it

Riassunto

La floricoltura italiana è tradizionalmente penalizzata dalla quasi totale assenza di materiale vegetale di provenienza nazionale, in particolare per quanto riguarda i bulbi da fiore che ogni anno vengono importati prevalentemente dall'Olanda, Cile e Nuova Zelanda. L'elevato costo dei bulbi di importazione e la necessità di ottenere piante con caratteristiche genetiche note e adatte agli ambienti agronomici italiani, ha sollecitato il CRA-VIV a sviluppare nel corso degli anni, un programma di miglioramento genetico che consentisse di mettere a disposizione dei coltivatori italiani nuove varietà in possesso di caratteristiche commerciali innovative. Tale programma di miglioramento genetico ha consentito di individuare diverse varietà caratterizzate da breve ciclo biologico ed in grado di essere facilmente propagate vegetativamente. Tali varietà selezionate, per ciclo colturale, taglia delle piante, numero di fiori per steli ed alcuni caratteri commerciali testati agronomicamente, sono state inserite in un programma di moltiplicazione, ingrossamento e valutazione dello stato fitosanitario volto ad una loro introduzione in opportuni cicli di coltivazione.

Summary

Among the most important floricultural crops used as cut flower, is lily very popular in Italy. However, all bulbs are imported from the Netherlands, Chile and New Zealand and the cost of the bulbs are high. The imported material has other important constraints, such as how it will perform under the Italian environmental conditions, especially under high temperature conditions. Therefore a breeding program was initiated at CRA-VIV that included classical cross design (diallelic cross), physical agents to induce mutations of Asiatic hybrid lilies. Several interesting clones are now available. The selected clones vary in a number of characters such as: different flowering time, plant size, flower colour, different type of spots, pathogen resistance and pollenless flowers. Some cut flower and pot types are available now for Italian growers.

Parole chiave

Bulbi, fiore reciso, pianta da vaso, stato fitosanitario, virus

Keywords

Breeding program, diallelic crosses, cut flower, pot cultivation

1 Descrizione generale della collezione attualmente disponibile in pieno campo

Le 162 varietà presenti presso il CRA-VIV, sono state costituite negli anni a partire da 120 genitori diversi del gruppo degli 'Ibridi Asiatici' ed alcune altre specie reperite nei luoghi di origine, compreso il *L. bulbiferum*, reperito nell'areale di Pescia. Il disegno sperimentale seguito per gli incroci è stato di tipo diallelico, parziale ed incompleto. Le impollinazioni sono state eseguite manualmente, impollinando per ciascuna combinazione disponibile da due a cinque fiori. Inizialmente le osservazioni hanno riguardato l'epoca di fioritura, il colore del fiore la presenza ed il tipo di punteggiatura, successivamente è stata avviata la fase di moltiplicazione ed ingrossamento delle progenie selezionate, così che oggi disponiamo di un numero di bulbi, da 60 a 100 per ogni clone selezionato.

* doi:10.4458/0986-55

1.2 Mantenimento e descrizione collezione

Il programma di miglioramento genetico ha consentito di rendere disponibili per le aziende vivaistiche interessate diversi cloni in possesso di caratteri innovativi. Tali cloni vengono mantenuti in coltivazione negli anni presso i campi sperimentali del CRA-VIV. Di seguito si descrivono le loro attitudini principali per cui sono stati mantenuti negli anni.

Figura 1 Campo adibito alla collezione.



1.2.1 Selezione in base alla lunghezza degli steli

Cloni idonei alla coltivazione in pien'aria nel periodo estivo (taglia elevata, che non risente dell'esposizione al pieno sole nel periodo luglio-agosto): cloni 555, 556, 557 giungono a fioritura naturale la prima decade di luglio con steli di altezza compresa tra 120 e 130 cm; il mercato del fiore reciso italiano privilegia materiale di taglia elevata tra 80 e 150 cm.

1.2.2 Selezione in base alla forma ed al colore del fiore del fiore

Cloni con nuove forme (il fiore di *Lilium* è caratterizzato da 6 tepali leggermente sovrapposti con o senza punteggiatura): i cloni 12 e 20 si evidenziano per la forma il primo, infatti al momento della fioritura ha una aspetto simile a quello di un tulipano, il secondo presenta i filamenti trasformati in petaloidi, che lo fanno sembrare un fiore doppio.

Cloni con nuovi colori (negli ibridi asiatici i colori variano dal bianco al rosso, dal giallo all'arancio, fino al rosa): i cloni 40, 00144, 00196, 00208, 00134 appaiono interessanti, sia per il colore, che per l'assenza di punteggiatura.

1.2.3 Selezione in base all'assenza di polline

Cloni senza polline (il polline del *Lilium* risulta particolarmente imbrattante per gli oggetti con cui viene a contatto, una riduzione del polline o una sua completa assenza può essere un carattere particolarmente apprezzato soprattutto dal fiorista): cloni 12, 409, 599, 00198, 00117, 00121, 00107, 00207 presentano questo carattere abbinato ad altri particolarmente interessanti come la taglia elevata.

Figura 2 a e b cloni 12 e 20 selezionati per la loro particolare forma del fiore; c – d ed e, cloni 409, 599 e 00144 selezionati poiché senza polline; f, clone 0039 selezionato per la particolare punteggiatura; g, clone 0035 selezionato come bulbo adatto per la coltivazione in vaso; h, clone 556, selezionato oltre che per la lunghezza dello stelo (140 cm circa) oltre che per la particolare colorazione bicolore.



1.2.4 Selezione come pianta idonea alla coltivazione in vaso

Cloni idonei alla coltivazione in vaso (dal punto di vista commerciale solo poche varietà si prestano a questo tipo di utilizzazione. In alcuni casi si ricorre a trattamenti chimici mediante il ricorso a brachizzanti, con risultati qualitativamente non soddisfacenti, in altri casi si ricorre all'utilizzazione di bulbi di calibro ridotto; in questo caso ad una relativa riduzione della taglia, si accompagna una forte riduzione del numero dei fiori per infiorescenza): cloni 227, 0035, 0036, 0068, 0069 appaiono idonei per questa utilizzazione in virtù della taglia ridotta e per l'equilibrio tra l'infiorescenza e l'apparato fogliare della pianta.

1.2.5 Selezione in base alla tipologia di punteggiatura

Cloni selezionati per tipologia di punteggiatura (la presenza di punteggiatura sui tepali, in particolare nella zona della gola, ha la funzione di attrarre gli insetti impollinatori, non è un carattere particolarmente apprezzato dal mercato, a meno che la sua presenza non conferisca un aspetto particolare al fiore). Il clone 41 presenta una punteggiatura di tipo lineare particolarmente interessante, come pure i cloni 00187, 0010, 0039, 00149 che per la loro punteggiatura allungata e molto evidente, sono in grado di dare una risposta innovativa al consumatore.

1.2.6 Selezione in base alla produzione di bulbilli

Cloni selezionati per la produzione di bulbilli (il *Lilium*, come altre bulbose, si propaga quasi esclusivamente per via vegetativa, o attraverso le scaglie, mediante la disarticolazione del bulbo, o attraverso bulbetti che si formano intorno al bulbo in coltivazione, oppure, infine, attraverso i bulbilli che si formano, nella parte aerea, all'ascella delle foglie. La produzione dei bulbilli è un carattere genetico e la sua presenza facilita la produzione di materiale per la propagazione delle varietà. In alcuni cloni, presenti presso il CRA-VIV, il carattere 'presenza di bulbilli' è stato indotto dal parentale maschile 'Beni no mai'). I cloni 631, 004, 009, 0038, 0090, 00116, 00154 e molti altri sono in possesso di questo carattere, che consente di favorire una rapida disponibilità di bulbi commerciali di quel clone.

1.2.7 Selezione in base alla lunghezza del ciclo culturale

Cloni selezionati per ciclo di coltivazione (le diverse varietà di *Lilium*, grazie alla possibilità di essere conservate per lunghi periodi a -1 °C, possono essere coltivate durante tutto l'arco dell'anno. Per questo risulta importante disporre di cloni a differente ciclo culturale. Tra il

germoplasma in nostro possesso sono presenti cloni selezionati per la diversa lunghezza del ciclo colturale (precoce, medio e tardivo), che offrono ai produttori una ampia scelta, per una programmazione della produzione che risulti la più ampia possibile, durante tutto l'arco dell'anno.

Tabella 1 Selezione di Ibridi Asiatici ottenuti nel programma di miglioramento genetico da incroci di bulbi di calibro 14/16 piantati all'inizio di Marzo in pien'aria.

Clone	Epoca fioritura	Colore	Punteggiatura	Polline	Lungh stelo (cm)	Lungh infiorescenza (cm)	Bocci Fiorali (n.)	Carattere selezionato
12	05/06	giallo	no	no	77	43	6	Forma
13	25/05	rosso/arancio	si	si	70	45	5	Colore
19	05/06	rosso/giallo	si	si	74	44	9	Colore
20	05/06	giallo/arancio	si	no	84	50	8	Doppio
41	28/05	arancio	si	si	68	51	12	Punteggiatura
227	03/06	arancio	si	si	48	30	18	Da vaso
352	10/06	bianco	si	si	52	29	9	Da vaso
409	01/06	giallo	no	no	73	50	3	Pollenless
555	30/06	arancio	si	si	128	95	7	Lughezza stelo
556	15/07	giallo	si	si	140	113	7	Lughezza stelo
557	10/07	giallo	si	si	108	78	9	Lughezza stelo
599	01/06	arancio	si	no	50	39	5	Pollenless
004	05/06	rosso/arancio	si	no	60	43	4	Pollenless
0010	14/06	giallo	si	si	60	45	7	Da vaso
0035	20/05	giallo	si	no	45	35	7	Da vaso
0036	23/05	arancio	si	si	46	32	4	Da vaso
0039	23/05	giallo	si	si	55	36	6	Punteggiatura
0068	01/06	bianco	no	si	63	42	6	Da vaso
0069	01/06	melone	si	si	50	35	5	Da vaso
00144	05/06	albicocca	no	no	50	37	7	Pollenless
00187	19/06	arancio/giallo	si	si	76	59	12	Punteggiatura
00194	19/06	melone	no	no	68	49	7	Punteggiatura
00195	17/06	melone	no	no	75	57	6	Punteggiatura
00198	25/06	giallo limone	no	no	86	64	12	Punteggiatura
00208	14/06	bianco	no	no	72	55	4	Pollenless

Tutto il materiale sopra esposto, viene mantenuto annualmente in coltivazione, presso i campi sperimentali del CRA-VIV ed al momento della fioritura vengono fatti rilievi biometrici a campione, per valutare il mantenimento nel tempo dei loro caratteri distintivi. Inoltre una parte del materiale viene mantenuto *in vitro* su substrati idonei e allevati in cella climatica a 22-23 °C con fotoperiodo di 16 ore.

1.3 Valutazione e mantenimento dello stato fitosanitario della collezione

La collezione sopradescritta, mantenuta in coltivazione presso il CRA-VIV ha subito nel corso degli anni un decadimento qualitativo che si è manifestato con un ridotto sviluppo vegetativo dei bulbi e delle piante e soprattutto con deformazioni e striature necrotiche a carico dei fiori e delle foglie. Ciò è riconducibile alla presenza di virosi. Le virosi più comuni che si possono riscontrare sul *Lilium* sono rappresentate da *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), *Lilium Symptomless Virus* (LSV), *Lilium Mottle Virus* (LMoV), *Lily X Virus* (LXV) e *Tulip Breaking Virus* (TBV). Si riscontrano, anche se meno frequentemente, *Tomato spotted wilt Virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Arabic mosaic Virus* (ArMV), *Tobacco ringspot Virus* (TRSV), *Tomato Ringspot Virus* (ToRSV), *Lily Mild Virus* (LMV), *Narcissus Mosaic Virus* (NaMV) *Broad bean wilt* (BBWV), *Strawberry Latent Ring Spot Virus* (SLRSV).

Molto spesso sono le infezioni congiunte di 2 o più virus a causare delle alterazioni consistenti che si ripercuotono sullo sviluppo della pianta e/o dei bulbi. Allo scopo di indagare le cause di alcune alterazioni manifestatesi a carico di alcuni cloni presenti in collezione è stato effettuato un campionamento delle piante sintomatiche per diagnosticare la presenza di agenti virali. Ciò

ha presupposto la messa a punto di tecniche diagnostiche di biologia molecolare (RT-PCR) per la diagnosi dei principali virus che infettano il *Lilium*: CMV, LSV, LMoV, INSV e TSWV.

1.3.1 Campionamento materiale, estrazione RNA e sintesi del cDNA

Sono state campionate 60 piante sintomatiche appartenenti a 20 differenti cloni della collezione, con 3 repliche per ogni clone, da cui sono stati prelevati campioni di tessuto fogliare. Da tali tessuti è stato estratto l'RNA totale mediante un protocollo modificato (Mackenzie *et al.*, 1997) basato sul kit di estrazione RNasy Plant Mini kit (Qiagen). L'RNA estratto è stato retrotrascritto a cDNA mediante il Kit iScript cDNA Synthesis (Biorad). In un tubo da 1.5 mL è stata preparata una mix in accordo con il protocollo suggerito dalla ditta produttrice: 16 µL costituiti da 11 µL di H₂O sterile, 4 µL di Buffer 1X iScript e 1 µL dell'enzima retrotrascrittasi iScript. A tale mix sono stati aggiunti per ogni campione estratto 4 µL di RNA ed è stato usato il seguente protocollo termico: un ciclo a 25 °C per 5 minuti, un ciclo a 42 °C per 30 minuti ed infine un ciclo a 85 °C per 5 minuti.

1.3.2 RT-PCR e point

Per ogni campione sono stati amplificati 2 µL di cDNA in un volume totale di 25 µL contenenti i seguenti reagenti per campione: 1X Buffer GoFlexi (Promega), 2.0 mM di MgCl₂, 0.2 mM di dNTPs, 0.5 µM per i primer (Tab. 2), BSA 1X e 0.04 U/ µL dell'enzima GoTaq HotStart (Promega). La reazione è stata condotta in un termociclatore 'MyCycler' (Biorad), con il seguente protocollo termico uguale per tutti e cinque i virus oggetto di indagine: denaturazione iniziale a 94 °C per 2 min, 30 cicli comprendenti denaturazione a 94 °C per 30 sec, *annealing* a 55 °C per 45 sec ed estensione a 72 °C per 45 sec, seguiti da un'estensione finale a 72 °C per 7 min. Dopo l'amplificazione 10 µL di prodotto di PCR sono stati caricati in gel di agarosio al 2% e colorato con GelRed.

Tabella 2 Primers per amplificazione attraverso RT-PCR.

Virus	Primer sequence (5'-3')	Dimensioni frammento	Reference
CMV	5'- ACTCTTAACCACCCAACCTT -3' 5'- AACATAGCAGAGATGGCGG -3'	280 bp	Faggioli <i>et al.</i> , 2005
LSV	5'- AAGGATCCATGCAATCAAGACCAAGA -3' 5'- AAGAGCTCTCATCCATTATTTGCGTA -3'	900 bp	Singh <i>et al.</i> , 2005
LMoV	5' -GCAAATGAGACACTCAATGCTG -3' 5' -CGTGCGTGAAGTAACTTCATAG -3'	651 bp	Ji Hyun Lim <i>et al.</i> , 2009
INSV	5'- GGATGTAAGCCCTTCTTTGTAGTGG -3' 5'- CCTTCCAAGTCACCCTCTGATTG -3'	364 bp	Liu <i>et al.</i> , 2009
TSWV	5'- AAT TGC CTT GCA ACC AAT TC -3' 5'- ATC AGT CGA AAT GGT CGG CA -3'	267 bp	Mumford <i>et al.</i> , 1996

1.3.3 Risultati della diagnosi

La diagnosi di CMV, LSV e LMoV è stata inizialmente effettuata con protocolli specifici descritti in letteratura, tali protocolli sono stati successivamente uniformati con un unico protocollo termico in modo da consentire una diagnosi veloce. I risultati ottenuti dall'amplificazione sono riportati nella tabella sottostante: su 20 cloni testati 16 sono risultati infettati da CMV, 18 sono risultati positivi anche a LSV e soltanto 1 a LMoV, quindi alcuni campioni sono risultati positivi per due o più virus contemporaneamente (Tab. 3). Tutti i campioni sono risultati negativi ad entrambi i tospovirus, INSV e TSWV.

Tabella 3 Elenco campioni *Lilium* con relativi risultati dopo RT-PCR.

Clone	CMV	LSV	LoMV	INSV	TSWV
352	+	+	-	-	-
513	+	+	-	-	-

556	+	+	-	-	-
557	+	+	-	-	-
618	-	-	-	-	-
0010	+	+	-	-	-
0019	+	+	-	-	-
0039	-	-	-	-	-
0040	+	+	-	-	-
0071	-	+	-	-	-
0098	+	+	-	-	-
00107	+	+	-	-	-
00117	+	+	+	-	-
00121	+	+	-	-	-
00134	-	+	-	-	-
00149	-	+	-	-	-
00187	+	+	-	-	-
00196	+	+	-	-	-
00207	+	+	-	-	-
00219	-	+	-	-	-

Il materiale risultato infetto in seguito a diagnosi è stato separato dal resto della collezione e sottoposto a risanamento mediante prelievo dell'apice meristemato e eventuale termoterapia, in vista di un successivo eventuale reinserimento nella collezione.

1.4 Bibliografia

- Faggioli F., Ferretti L., Albanese G., Sciarroni R., Pasquini G., Lumia V. and Barba M. 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* 87(1): 49-55.
- Faggioli F., Ferretti L., Pasquini G., and Barba M. 2002. Strawberry latent ring spot virus in leaves of olive tree in Italy using one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology* 150: 636-639.
- Grassotti A., Mercuri A., Schiva T., De Ranieri M., 1987. Mutazioni indotte tramite agenti fisici su *Lilium*. *Ann.Ist.Sper. Floric. Sanremo Vol.XVIII*, 1:1-15.
- Grassotti A., Torrini F., Mercuri A., Schiva T., 1989. Genetic improvement of *Lilium* in Italy. *Acta Hort.* 266, 339-347.
- Grassotti A., Mercuri A., Roh M.S., 1996. Selection of *Lilium* for bulbil production characteristic. *Acta Hort.* 414: 129-132.
- Grassotti A., Nesi B., 2002. Il miglioramento genetico del *Lilium*: un'esperienza italiana. *Atti Convegno del 25-26 Giugno 2002 Bari. III WORKSHOP SOI "Lo stato dell'arte nel miglioramento genetico delle principali specie ortoflorofrutticole d'interesse mediterraneo"*, p 71-79.
- Grassotti A., Nesi B., 2002. Nuove varietà di *Lilium*. Principali caratteri e possibili impieghi. *Atti del Convegno del 22 Novembre 2002 Ercolano-Napoli "Florovivaismo tra innovazione e novità"*, p 166-173.
- Grassotti A., Nesi B.,Lazzereschi S., Cacini S., Pacifici S., 2011. Breeding Asiatic Hybrid Lilies: an Italian Experience. *Acta Hort.* 900, 237-241.
- Han L-J. and Liu W-H. 2007. Studies on Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) occurring on lily. *Agricultural Science in China*, 6(10): 1201-1208.
- Liu H-K., Sears J.L. and Mou B. 2009. Spinach (*Spinacia oleracea*) is a New Natural Host of Impatiens necrotic spot virus in California. *Plant Dis.* 93(6): 673.
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S., and Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81: 222-226.

- Mumford R.A., Barker I. and Wood K.R. 1996. An improved method for the detection of Tospoviruses using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 57: 109-115.
- Niimi Y., Ham D.S., Mori S. and Kobayashi H. 2003. Detection of Cucumber mosaic virus, lily symptomless virus and lily mottle virus in *Lilium* species by RT-PCR. *Scientia Hort.* 97: 57-63.
- Sato H., Hagiwara K., Nakamura S., Morikawa T., Honda Y. and Omura T. 2002. A comparison of sensitive and specific methods for the detection of Lily Mottle Virus in Lily plants. *Journal of Phytopathology* 150: 20-24.
- Sharma A., Mahinghara B.K., Singh A.K., Kulshrestha S., Raikhy G., Singh L., Verma N., Hallan V., Ram R. and Zaidi A.A. 2005. Identification, detection and frequency of lily viruses in Northern India. *Scientia Hort.* 106: 213-227.
- Singh A.K., Hallan V., Ram R. and Zaidi A.A. 2005. Variability in the coat protein of Lily symptomless virus isolates infecting various lily species. *Plant Pathology*, 54: 621-624.

UNA COLLEZIONE DI SPECIE DEL GENERE *HELICHRYSUM* AD USO PREVALENTEMENTE ORNAMENTALE*

Responsabile Scientifico: Dr. Claudio Cervelli

CRA-FSO Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali
Corso Inglesi, 508 – 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

Il genere *Helichrysum* comprende 500-600 specie diffuse in Africa, Europa meridionale e Asia adattate a condizioni di aridità, con fogliame spesso tomentoso e capolini con brattee cartacee. Molte hanno utilizzo medicinale nella tradizione popolare e sono ricche di oli essenziali. Le specie del Bacino Mediterraneo sono di tipo fruticoso o suffruticoso: alcune presentano elevata variabilità intraspecifica e areali estesi, altre sono endemismi. Sono interessanti sia le loro caratteristiche ornamentali (vistose fioriture e fogliame sempreverde spesso di colore bianco-cinereo) sia la loro capacità di adattamento alle condizioni tipiche del giardino mediterraneo. Il germoplasma di *Helichrysum* disponibile a livello vivaistico è molto limitato, per cui il CRA-FSO ha iniziato la collezione di accessioni di elicriso appartenenti a specie, varietà, ibridi e cloni presenti soprattutto nel Bacino Mediterraneo. Le accessioni raccolte sinora sono 137. L'attività svolta riguarda la caratterizzazione morfologica, fenologica e agronomica delle accessioni, la definizione delle loro peculiarità ornamentali e di protocolli colturali per produzioni di piante in vaso fiorite o non. È inoltre portata avanti una collaborazione con istituzioni scientifiche per la caratterizzazione della variabilità fitochimica degli oli essenziali e di altri metaboliti secondari per un possibile utilizzo anche in campo industriale e agricolo.

Summary

The genus *Helichrysum* includes 500-600 species widespread in Africa, southern Europe and Asia adapted to drought conditions, often with tomentose foliage and flower heads with papery bracts. Many species have medicinal use in folk tradition and are rich in essential oils. Mediterranean species are shrubs or subshrubs: some of them have high interspecific variability and extended wide distribution, other ones are endemic. They are interesting in their ornamental characteristics (showy blooms and evergreen foliage often white-grey coloured) and their ability of adaptation to the typical conditions of the mediterranean garden. The germplasm of *Helichrysum* available at nursery level is very restricted, so the CRA-FSO arised a collection of accessions of *Helichrysum* species, varieties, hybrids and clones native mainly of the Mediterranean basin. The accessions collected so far are 137. The activity relates to the morphological, agronomical and phenological characterization of accessions, the definition of their ornamental peculiarities and of cultural protocols for production of pot plants, flowering or not. It is also carried out a collaboration with scientific institutions for the characterization of phytochemical variability of essential oils and other secondary metabolites for possible use in agricultural and industrial field.

Parole chiave

Valutazione, ornamentali, metaboliti, morfologia, fioritura, fisiologia, aroma, nuove colture

Keywords

Evaluation, ornamentals, metabolites, morphology, flowering, physiology, aroma, new crops

1 Il genere *Helichrysm*

È uno dei più numerosi della famiglia delle *Asteraceae*, essendo rappresentato da 500–600 specie (Hilliard 1983; Anderberg 1991; Bayer *et al.* 2007) diffuse in Africa, Europa meridionale e Asia (Anderberg, 1991), che comprendono una grande diversità di forme biologiche, dalle piante annuali agli alberi. La sistematica di questo genere è piuttosto complessa e controversa (Galbany — Casals *et al.*, 2009; Galbany — Casals *et al.*, 2006a; Galbany — Casals *et al.*, 2004; Aghababyan *et al.*, 2007; Scialabba *et al.*, 2008), ma le specie originarie del Bacino

* doi:10.4458/0986-57

Mediterraneo formano un gruppo relativamente omogeneo di specie suffruticose o fruticose (Galbany-Casals *et al.*, 2006b); alcune specie hanno areali vasti (es. *H. italicum* e *H. stoechas*) mentre altre costituiscono endemismi a livello nazionale o regionale, in particolare in Sicilia e Sardegna, dove sono rappresentate da popolazioni localizzate (Scialabba *et al.*, 2008; Bacchetta *et al.*, 2003; Giardina *et al.*, 2007). Soprattutto in specie quali *H. stoechas*, *H. italicum* e *H. rupestre* la variabilità intraspecifica è elevata ed è frequente la presenza di ibridi sia tra queste specie sia con altre (Martin e Puech, 2001; Galbany-Casals *et al.*, 2006b). Gli elicrisi si trovano prevalentemente in aree costiere, in ambienti con marcate caratteristiche di aridità, ventosità e forte radiazione solare (Pignatti, 1982). Per questo frequentemente le specie hanno caratteristiche morfologiche peculiari, quali la forte tomentosità del fogliame, che risulta perciò di colore verde-grigio o bianco-cinereo; i fiori sono di solito di colore giallo e caratteristici sono i capolini di consistenza cartacea, che mantengono immutato il loro aspetto anche quando essiccati, da cui il nome di "perpetuini" o, in francese, "immortelle". Molte specie hanno un caratteristico aroma e sono ricche di oli essenziali.

1.2 Gli usi degli elicrisi

Alcune specie trovano utilizzo in campo medicinale nella tradizione popolare delle aree geografiche di cui sono originarie: in Sudafrica specie quali *H. adenocarpum* e *H. ecklonis* sono usate contro la diarrea, mentre preparati di *H. cymosum*, *H. kraussii*, *H. odoratissimum* e *H. nudifolium* sono usati contro raffreddori, tosse e problemi respiratori (Hutchings *et al.*, 1996; Lourens *et al.*, 2008; Watt and Breyer-Brandwijk, 1962); a Madeira le parti aeree di *H. obconicum*, specie endemica, sono usate per farne tè contro malattie dell'apparato gastrointestinale (Rivera e Obón, 1995). Altre specie sono state analizzate per i loro composti terpenici e fenolici (Meyer *et al.*, 1997; Roussis *et al.*, 2000; Tomas-Barberan *et al.*, 1990). *Helichrysum italicum*, largamente diffuso nel bacino Mediterraneo, presenta proprietà antinfiammatorie, antiallergiche, antibatteriche, antimicotiche, antiossidanti e stimolanti e viene coltivato per l'estrazione dell'olio essenziale e di flavonoidi (di cui è ricco) (Pietta *et al.*, 1991), impiegati ad uso prevalentemente cosmetico (Voltolina, 2001); è anche usato come aromatizzante per cibi. Ad uso ornamentale la specie più conosciuta è *H. bracteatum* (di origine australiana), attualmente però riclassificato nel genere *Xerochrysum*: ha foglie verdi e capolini di consistenza cartacea di colore variabile dal bianco al giallo all'arancio al rosso (Knight, 1990): è prodotta come fiore reciso o come pianta in vaso, per il cui uso sono state selezionate numerose varietà compatte e con fiori di maggiori dimensioni. Come pianta non fiorita da vaso è coltivato anche *H. italicum*, per il suo fogliame grigio-argenteo. Altra specie ad uso ornamentale è *H. orientale* (proveniente dall'area orientale del Bacino Mediterraneo), i cui capolini immaturi, di colore bianco o giallo, sono utilizzati da decenni come fiore secco. Come pianta per il giardino mediterraneo la specie più comune è *H. petiolare* (di origine sudafricana), del quale si sfrutta l'effetto gradevole del fogliame (di colore verde-grigio), la sua resistenza all'aridità e le caratteristiche di pianta coprisuolo.

1.3 La collezione del CRA-FSO

A fronte del vasto germoplasma presente in questo genere botanico, a livello vivaistico la disponibilità di materiale vegetale è limitata a poche specie e varietà. L'adattabilità ad ambienti aridi e ecologicamente difficili, la compattezza del fogliame e le peculiari caratteristiche cromatiche delle foglie (soprattutto nelle tonalità più tendenti al bianco-grigio) e dei giovani capolini (giallo-dorati e lucidi) rendono l'elicriso un soggetto ornamentale interessante per un utilizzo nei giardini mediterranei gestiti con criteri di bassa manutenzione (ridotti apporti idrici e necessità di manodopera) e che si trovano spesso in situazioni pedologiche marginali o comunque non ottimali (terreni rocciosi o ricchi di scheletro, poco idonei alle specie da giardino più esigenti). La collezione si incentra sul reperimento di germoplasma appartenente soprattutto a specie originarie del Bacino Mediterraneo, sfruttando la elevata variabilità intraspecifica di alcune specie e la presenza di numerosi ibridi interspecifici naturali; a ciò si aggiunge anche la possibilità di reperire alcune varietà già selezionate ad uso ornamentale. Lo scopo della collezione è la caratterizzazione delle accessioni ottenute e l'individuazione e valorizzazione di nuove varietà e selezioni utilizzabili per ottenere produzioni ornamentali di elevata qualità merceologica e agronomica atte ad una diversificazione produttiva nel comparto delle piante in vaso e delle piante aromatiche, ma anche, in funzione delle caratteristiche

specifiche, del reciso. Un ulteriore obiettivo, perseguito in collaborazione con altre istituzioni di ricerca del settore biochimico, è l'isolamento e caratterizzazione di nuove sostanze naturali impiegabili in campo industriale e alimentare.

Per quanto riguarda il CRA-FSO, hanno riguardato l'elicriso il progetto INTERREG-ALCOTRA italo-francese "AROMA" (n. 68, 2010-2012), i progetti "PRO.FLO.MER" (2006-2009) e BIODATI (2011-2014).

La collezione ha raggiunto attualmente le 137 accessioni (specie, varietà e accessioni spontanee).

La collezione di elicrisi viene mantenuta presso la sede del CRA-FSO (43° 49' 02" N, 7° 45' 33" E) a Sanremo; le piante sono coltivate in pien'aria in contenitori di plastica (foto 2) fino a 60 cm di diametro.

In foto 1 sono riportate immagini dei fiori e foglie di alcune specie e varietà in collezione presso il CRA-FSO.

Tabella 1 Elenco delle specie e varietà di elicriso presenti presso il CRA-FSO.

Helichrysum crassifolium
Helichrysum cymosum
Helichrysum errerae var. errerae
Helichrysum hyblaicum
Helichrysum italicum
Helichrysum italicum subsp. Microphyllum
Helichrysum italicum subsp. microphyllum 'Lefka Ori'
Helichrysum orientale
Helichrysum panormitanum var. panormitanum
Helichrysum petiolare
Helichrysum petiolare 'Limelight'
Helichrysum sanguineum
Helichrysum saxatile var. saxatile
Helichrysum saxatile var. morisianum
Helichrysum scandens
Helichrysum serotinum
Helichrysum serotinum subsp. picardii
Helichrysum siculum
Helichrysum stoechas
Helichrysum 'Korma'
Helichrysum 'Miel et Curry'



H. italicum



H. serotinum



H. errerae subsp. errerae



H. italicum subsp. microphyllum 'Lefka Ori'



H. hyblaeum



H. orientale



H. petiolare



H. petiolare 'Lime Light'



H. stoechas



H. italicum subsp. microphyllum



H. panormitanum subsp. panormitanum



H. serotinum subsp. picardii

Foto 1 Fogliame e infiorescenze di alcune specie e varietà di elicriso in collezione presso il CRA-FSO.

Ogni accessione è rappresentata da 2 piante. L'irrigazione è effettuata tramite impianto a goccia automatizzato con programmatore a tempo. Il substrato di coltivazione è di tipo per coltivazioni vivaistiche e contiene circa il 15% di pomice (diametro 7-12 mm); ad esso è stato aggiunto un egual volume di agriperlite per renderlo più idoneo alla coltivazione dell'elicriso, che necessita di buon drenaggio. All'invasatura viene aggiunto nel substrato un concime a rilascio controllato con rapporto equilibrato N:P₂O₅:K₂O (con microelementi) della durata di 5-6 mesi alla dose di 4 g/l. Successive necessità nutrizionali delle piante sono soddisfatte attraverso periodiche fertirrigazioni alla dose di 1,5 g/l.

Le caratteristiche climatiche del sito di collezione (tabella 2) consentono alle piante di evitare danni da gelate e di vegetare per tutto l'anno, ad eccezione del periodo centrale dell'inverno, permettendo alle varie accessioni di manifestare con continuità nell'anno le naturali caratteristiche di fioritura.



Foto 2 Piante della collezione di elicrisi presso il CRA-FSO.

Tabella 2 Caratteristiche climatiche del sito di collezione delle salvie (Sanremo, anno 2010)

Temperatura (°C)			Umidità relativa (media)	Piovosità (mm)	Radiazione globale (Wh/mq)
Media	Min. assoluta	Max. assoluta			
16,0	- 0,9	32,7	68,9	696,8	1.570.128,15

1.4 Caratterizzazione e valorizzazione della collezione

Gli obiettivi sopra riportati vengono perseguiti attraverso una serie di attività volte sia alla caratterizzazione delle accessioni dal punto di vista biologico e agronomico sia alla valorizzazione produttiva, in collaborazione con istituzioni che si occupano di biochimica e con produttori.

1.4.1 Attività di caratterizzazione del germoplasma

È imperniata sia sulla definizione delle caratteristiche morfologiche, fenologiche, propagative e colturali peculiari delle singole accessioni sia sulla caratterizzazione dei metaboliti secondari (oli essenziali).

La caratterizzazione morfologica riveste importanza fondamentale a causa di frequenti errori di denominazioni riportate per il materiale di provenienza vivaistica e della complessa situazione di identificazione botanica e di classificazione sistematica, in relazione anche alla variabilità intraspecifica e alla possibilità di ibridazione. Viene acquisito ampio materiale fotografico e sono effettuate misurazioni biometriche e analisi morfologiche su organi vegetativi e riproduttivi.

Elevata variabilità tra le specie è stata osservata nelle dimensioni della pianta, degli internodi, delle foglie (Cervelli *et al.*, 2010)(foto 3) e nel loro colore (foto 1). Quasi tutte le accessioni hanno colore giallo dei fiori ma esistono differenze nella tipologia e dimensione dei capolini, nel

loro colore allo stadio immaturo (foto 1), nella complessità della struttura dell'infiorescenza (Cervelli *et al.*, 2010).

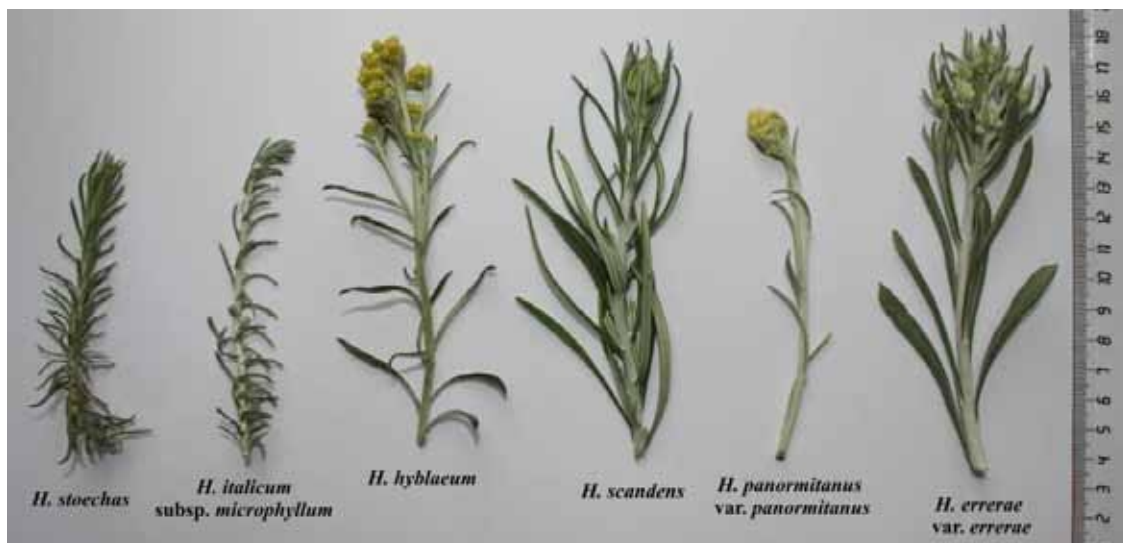


Foto 3 Rametti di diverse specie di *Helichrysum*.

Per quanto riguarda la fenologia, la fioritura principale avviene nel periodo primaverile sempre molto abbondante, ed è possibile evidenziare tra le accessioni specie più precoci o più tardive (Cervelli *et al.*, 2010). Alla fioritura (foto 4) segue sempre la formazione di una notevole quantità di semi, che vengono raccolti e conservati per la collezione.

Su alcune specie è stata valutata l'attitudine alla propagazione vegetativa in vivo, evidenziando una capacità di radicazione delle talee (foto 5) che può superare il 90 % (Cervelli, 2009).

Il periodo per ottenere talee da piante coltivate (mantenute in costante attività vegetativa) è rappresentato da buona parte dell'anno, escludendo solo la primavera durante la quale i getti portano apicalmente le infiorescenze; per quanto riguarda le piante spontanee, vista la stasi estiva dovuta all'aridità, il momento migliore di prelievo delle talee risulta limitato al periodo compreso tra metà autunno e fine inverno.

Dal punto di vista agronomico la crescita delle piante è risultata relativamente veloce in quasi tutte le accessioni finora testate (Cervelli, 2009), necessitando meno di un anno dalla propagazione per talea alla fioritura. Durante il periodo estivo alcune accessioni hanno evidenziato problemi di sopravvivenza legate ad un'abbondante irrigazione.

Su sei specie, il cui materiale vegetale è stato fornito dal CRA-FSO, è stata determinata dal Dipartimento di Biochimica dell'Università di Pisa la composizione dell'olio essenziale, individuando in alcune accessioni un elevato contenuto in composti terpenici di rilevante pregio (dati non ancora pubblicati).



Foto 4 *Helichrysum panormitanum* in boccio (sin.) e *H. italicum* in piena fioritura (dx.)

1.4.2 Valutazioni produttive e individuazione di nuove potenziali colture

È stato definito su alcune specie un protocollo colturale (figura 1) utilizzabile, in ambienti con gelate assenti o fugaci, per l'ottenimento di piante in vaso fiorite o non (Cervelli, 2009)(foto 6), definendone le specifiche caratteristiche ornamentali e il potenziale impiego presso il consumatore (Cervelli, 2008). L'aroma del fogliame, particolarmente intenso in alcune specie, permette il loro sfruttamento anche come piante aromatiche in vaso non fiorite (es. *H. italicum* subsp. *microphyllum*), ottenendo prodotti da affiancare alla produzione di piante aromatiche tipiche mediterranee ad uso anche alimentare.

Dati preliminari sui risultati della coltivazione in piena terra di alcune specie (a scopo ornamentale o per estrazione di olio essenziale) sono state ottenuti attraverso collaborazioni con il CRA-SFM di Bagheria e con coltivatori di piante officinali francesi, nell'ambito dei progetti sopra citati.

Materiale propagativo delle specie e varietà in collezione viene reso disponibili per i produttori interessati.



Foto 5 Talee radicate di *Helichrysum panormitanum*.



Figura 1 Fasi di coltivazione in vaso di *Helichrysum hyblaicum*.

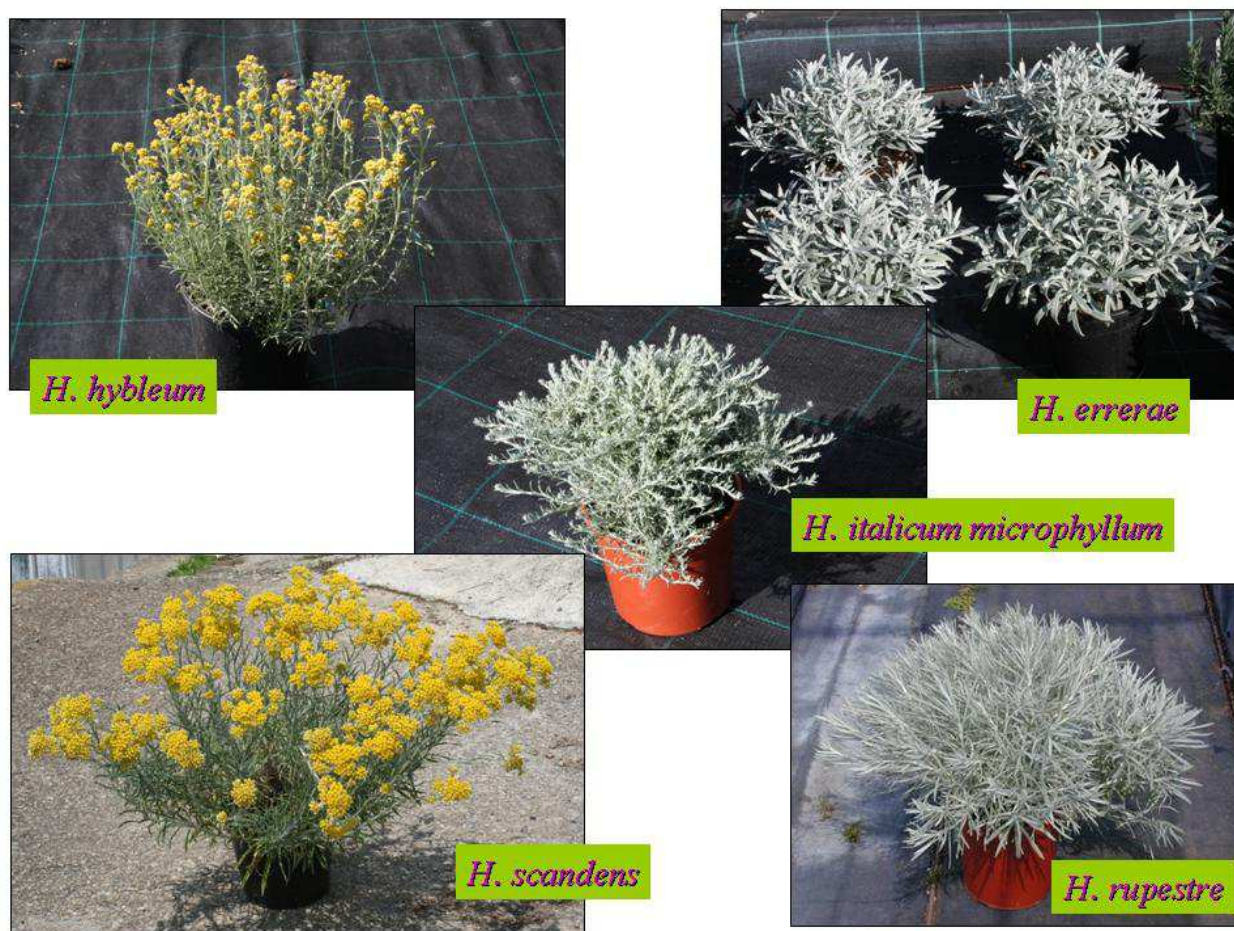


Foto 6 Piante in vaso ottenute con differenti specie di elicriso

1.5 Attività di documentazione e divulgazione

La caratterizzazione e la valorizzazione della collezione di salvie è portata avanti anche attraverso la costituzione di documentazioni (schede descrittive, opuscoli, articoli tecnici e scientifici), l'organizzazione di giornate "porte aperte", la partecipazione a convegni e mostre. E' stato inoltre acquisito ampio materiale fotografico sulle accessioni riguardante le differenti parte della pianta.

1.6 Bibliografia

- Aghababyan M., Greuter W., Mazzola P., Raimondo F.M., 2007. Typification of Sicilian *Helichrysum* (*Compositae*) revisited. *Taxon* 54(4):1285-1288. OK TROVATO
- Anderberg A.A. 1991. Taxonomy and phylogeny of the tribe Gnaphalieae (*Asteraceae*). *Opera Bot* 104:1-195.
- Bacchetta G., Brullo S., Mossa L., 2003. Note tassonomiche sul genere *Helichrysum* Miller (*Asteraceae*) in Sardegna. *Informatore Botanico Italiano*, 35 (1) 217-225.
- Bayer R.J., Breitwieser I, Ward J., Puttock C.F., 2007. Tribe *Gnaphalieae* (Cass.) Lecoq & Juillet (1831). In: Kadereit J.W., Jeffrey C. (eds.), *The families and genera of vascular plants, Asterales*, Vol VIII, pag. 246-284. Springer, Berlin.
- Cervelli C., 2008. Elicriso: nuove ornamentali dalla flora spontanea italiana. *Culture protette*, 10: 63-66.
- Cervelli C., 2009. Introduzione di nuove specie di *Helichrysum* per la coltivazione di piante in vaso. *Flortecnica* 4: 58-65.
- Cervelli C., Giovannini A., Ruffoni B., Scialabba A., Capponi A., Mascarello C., 2010. Caratteristiche agronomiche ed ornamentali di alcune specie selvatiche del genere *Helichrysum*. *Atti del Convegno su "La Biodiversità - Risorsa per sistemi multifunzionali"* (a cura di De Bellis L.; Marchiori S.; Miceli A.), Lecce, 21-23 Aprile 2008, pag. 140-142.

- Galbany-Casals M. , Garcia-Jacas N. , Susanna A. , Sáez L. , Benedí C., 2004. Phylogenetic relationships in the Mediterranean *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) based on nuclear rDNA ITS sequence data. *Australian Systematic Botany* 17, 241–253.
- Galbany-Casals M., Garcia-Jacas N., Sáez Ll., Benedí C., Susanna A., 2009. Phylogeny, Biogeography, and Character Evolution in Mediterranean, Asiatic, and Macaronesian *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) Inferred from Nuclear Phylogenetic Analyses. *International Journal of Plant Sciences*, Vol. 170, No. 3 (March/April 2009), pp. 365-380.
- Galbany-Casals M., Sáez Ll., Benedí C., 2006b. A taxonomic revision of *Helichrysum* sect. *Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae). *Canad. J. Bot.* 84: 1203-1232.
- Galbany-Casals M., Sáez Ll., Benedí C., Jarvis C. E., 2006a. Typification of names in *Gnaphalium* L. and *Helichrysum* Mill. (Asteraceae), and some taxonomic notes. *Taxon* 55: 489-501.
- Giardina G., Raimondo F. M., Spadaro V., 2007. A catalogue of the plants growing in Sicily. *Boccone* 20: 5-584.
- Hilliard O.M., 1983. *Helichrysum* Mill. In: Leistner O.A. (ed.), *Flora of southern Africa*, Vol 33, pt 7, fasc 2, pag. 61–310. Botanical Research Institute, Pretoria.
- Hutchings A., Scott A.H., Lewis G., Cunningham A., 1996. Zulu Medicinal Plants — An Inventory. Pietermaritzburg, Natal University Press, pp. 318–320.
- Knight, John (1990). Golden Everlasting. *Australian Plants* 15 (124): 335–39.
- Lourens A.C.U., Viljoen A.M., Van Heerden F.R., 2008. South African *Helichrysum* species: a review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 630–652.
- Martin A., Puech S., 2001. Interannual and interpopulation variation in *Helichrysum stoechas* (Asteraceae), a species of disturbed habitats in the Mediterranean region. *Plant Species Biology*, Volume 16, Number 1, pp. 29-37(9).
- Meyer J.J.M., Afolayan A.J., Taylor M.B., Erasmus D., 1997. Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 56: 165-169.
- Pietta P.G., Mauri P.L., Cardana C., Maffei Facino R., Carini M., 1991. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoid glucosides from *Helichrysum italicum*. *Journal of Chromatography*, 537: 449-452.
- Pignatti S., 1982. *La Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- Rivera D., Obón C., 1995. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 73–93.
- Roussis V., Tsoukatou M., Petrakis P.V., Chinon I., Skuola M., Harborne J.B., 2000. Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 163-175.
- Scialabba A., Agrimonti c., Abbate G.M., Marmioli N., 2008. Assessment of genetic variation in Sicilian *Helichrysum* (Asteraceae) and implication to germplasm conservation. *Plant Biosystem* 142(2):1-11.
- Tomas-Barberan F., Iniesta-Sanmartin E., Tomas-Lorente F., Rumbero A., 1990. Antimicrobial phenolic compounds from three spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry*, 29: 1093-1095.
- Voltolina G., 2001. *Elicriso: Helichrysum italicum* (Roth) Don. Piante officinali, schede di divulgazione. Veneto Agricoltura.
- Watt J.M., Breyer-Brandwijk M.G., 1962. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, 2nd ed. London, Livingstone, pp. 237–240.

LA COLLEZIONE DI BETA PRESSO IL CRA-CIN DI ROVIGO*

Responsabili Scientifici: Dr. Piergiorgio Stevanato^{1*}, Dr. Enrico Biancardi¹, Dr. Mauro Colombo¹, Dr. Giuseppe Mandolino²

¹CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali, Viale Amendola 82 - 45100 Rovigo

²CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali, Via di Corticella 133 - 40128 Bologna

*attuale indirizzo: DAFNAE-Università degli Studi di Padova Viale dell'Università 16 - 35020 Legnaro

Riassunto

Presso il CRA-CIN di Rovigo sono conservate a bassa temperatura (5°C) e bassa umidità (<10%) 381 accessioni appartenenti al genere *Beta*, ed incroci ssp. *vulgaris* x ssp. *maritima* di potenziale interesse per studi genetici e genomici. La collezione di accessioni del CRA-CIN include materiale adattato alla semina autunnale (resistente alla prefioritura a diversi gradi) e varie fonti di resistenza a rizomania, cercospora, nematodi e rizoctonia. Sono inoltre rappresentati impollinanti, maschiosterili e linee O-type, che derivano dagli ultimi 20 anni di attività di miglioramento genetico del CRA-CIN. Negli ultimi 10 anni, oltre allo sviluppo di materiale per il breeding, il CRA-CIN di Rovigo ha anche svolto, in collaborazione con l'Università di Padova, un'intensa attività di identificazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e di risposta allo stress nutrizionale in diverse popolazioni di *Beta vulgaris* ssp. *maritima* esistenti lungo il litorale adriatico. Tali popolazioni, caratterizzate *in situ*, sono particolarmente importanti perché sono fonte di caratteri di resistenza a stress biotici e abiotici, potenzialmente sfruttabili dal miglioramento genetico della barbabietola da zucchero, e perché rappresentano, più del materiale equivalente conservato presso banche di germoplasma, la variabilità effettiva contenuta nelle popolazioni naturali.

Summary

At CRA-CIN in Rovigo 381 *Beta* accessions are stored under low temperature (5°C) and low humidity (<10%) conditions. Some accessions are hybrids between ssp. *vulgaris* and ssp. *maritima*, and can have potential interest for genetic and genomics studies. The accessions stored include some suited for autumn-sowing (i.e. resistant to bolting) and several sources of resistance to rhizomania, cercospora leaf spot, nematodes and rhizoctonia. Pollinators, male sterile lines and O-type lines are well represented, and have been the bulk of the breeding activity of the last 20 years at CRA-CIN. In the latest years, CRA-CIN was also involved, in collaboration with the University of Padua, in the identification, morphological and molecular characterization and response to the nutritional stress, of several natural populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* of the Adriatic coasts. These populations, characterized *in situ*, are of particular interest because they are potential sources of resistance traits for both biotic and abiotic stresses, and they are therefore potentially exploitable for sugar beet breeding. These populations represent a higher variability of the gene pool of *Beta maritima* compared to the accessions stored in germplasm banks.

Parole chiave

Beta vulgaris, *Beta maritima*, cercosporiosi, rizomania, popolazioni naturali

Keywords

Beta vulgaris, *Beta maritima*, cercospora leaf spot, rhizomania, wild populations

1.1 Premessa

La coltura della bietola da zucchero ha risentito, negli ultimi anni, di un forte decremento di competitività e redditività in seguito all'entrata in vigore nel 2006 della nuova PAC (Politica Agricola Comunitaria). Il prezzo della bietola si è quindi ridotto, e nella sola Emilia Romagna la superficie coltivata è calata del 70% dal 2005 al 2006, liberando circa 50.000 ettari di terreno in una sola stagione. Tuttavia, la barbabietola da zucchero resta tuttora una coltura

* doi:10.4458/0986-59

importante, soprattutto per alcune zone del nord-est d'Italia, meritando attenzione e adeguati interventi di ricerca e sviluppo.

Al quadro economico si aggiungono le difficoltà produttive a cui la coltura va incontro nel nostro paese, anche a causa dei cambiamenti climatici registrati. Fra le avversità più rilevanti, vanno menzionate le elevate temperature, la siccità estiva, le varie carenze nutrizionali, gli stress biotici come la cercospora, la rizomania, per le colture a semina primaverile, e infine le basse temperature per le colture a semina autunnale. Queste ultime, infatti, oltre a subire danni nel corso d'inverni particolarmente rigidi, possono vedere aumentata la percentuale di piante che salgono a fiore in primavera, con conseguenti perdite qualitative e produttive. La consapevolezza che l'agricoltura subisce inesorabilmente i danni provocati dagli stress ambientali induce a ricercare nel germoplasma selvatico, o derivante da vecchi programmi di miglioramento genetico, appropriati caratteri adattativi da trasferire nelle varietà coltivate. Il miglioramento genetico realizzato nel secolo scorso ha comportato il restringimento della base genetica delle attuali cultivar con la conseguente perdita di molti geni coinvolti nell'adattamento all'ambiente. Da qui la necessità di recuperare quelle caratteristiche genetiche che permettono di superare le avverse condizioni ambientali facendo ricorso alle risorse della biodiversità, ovvero al germoplasma selvatico. Questo è possibile anche attraverso il riesame di materiali derivanti da programmi di miglioramento genetico i cui obiettivi erano all'epoca soprattutto di carattere produttivo.

L'esplorazione della biodiversità e la sua utilizzazione sono quindi parte integrante del moderno concetto di sostenibilità dell'agricoltura. L'ideotipo che il breeding deve perseguire anche per la barbabietola da zucchero, comprende oggi quei caratteri della pianta che consentono non tanto l'aumento del potenziale produttivo, quanto, piuttosto, la riduzione delle perdite inflitte dai fattori di stress, ma anche i costi di produzione (Boyer, 1982).

Tutti le specie e sottospecie appartenenti al genere *Beta* hanno 18 cromosomi (2n) e sono diploidi, ma molte varietà commerciali sono triploidi. Gli "ibridi" commerciali di bietola vengono oggi ottenuti dall'incrocio di linee maschiosterili che fungono da portaseme (linee MS), con popolazioni impollinanti diploidi o tetraploidi.

Il mantenimento e la moltiplicazione delle importantissime linee MS avviene tramite l'utilizzo di linee "O-type", che incrociate con le prime, ne "mantengono" nella progenie il carattere di maschiosterilità; per questo motivo le linee O-type sono anche dette "maintainer".

Linee MS e O-type (OT) sono quindi particolarmente importanti in qualunque programma di incrocio e miglioramento genetico della barbabietola da zucchero (Biancardi, 2005a). L'appartenenza a linee MS o OT, o alla categoria degli impollinanti o degli ibridi è una caratteristica importante nell'utilizzazione del germoplasma disponibile, e per questo le informazioni relative a questo "status" dell'accessione sono state inserite nel database della collezione.

Una caratteristica che distingue le varietà di bietola, e che di conseguenza risulta caratterizzante per il germoplasma di *Beta*, è il livello di ploidia (2n, 3n o 4n); per il materiale commerciale, una ulteriore distinzione frequentemente adottata si basa sul rapporto peso/grado polarimetrico della radice; tuttavia questo descrittore non è utilizzato nel database creato per i materiali della collezione di Rovigo per l'evidente variabilità dovuta a fattori ambientali. Un altro descrittore importante per il materiale di *Beta vulgaris* derivante da programmi di miglioramento genetico è invece la definizione del periodo di semina.

1.2 *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*

La collezione di seme in conservazione presso il CRA-CIN di Rovigo comprende 381 accessioni. Centodieci di queste si devono considerare come impollinanti, mentre 271 sono "ibridi", e fra questi sono compresi anche alcuni incroci, di particolare interesse per studi genetici e genomici, fra le due sottospecie interfertili del genere *Beta*, *vulgaris* x *maritima* (vedi paragrafo 1.3). La grande maggioranza delle accessioni della collezione del CRA-CIN di Rovigo sono diploidi (361 contro solo 20 tetraploidi).



Figura 1 Variabilità della forma del fittone radicale nell'ambito del genere Beta.

In molte zone di coltivazione dell'Europa meridionale, fra cui anche l'Italia, si è diffusa la coltura autunnale della bietola. Le piante vengono seminate non nel tardo inverno (fine febbraio o inizio marzo), come normalmente avviene, ma in autunno, intorno alla metà di ottobre. Tale pratica è molto diffusa soprattutto nelle aree bieticole del centro-sud dell'Italia (Marche, Abruzzo, Puglia). Le piante si accrescono in una prima fase, poi, al sopraggiungere del periodo invernale, cessano la crescita, per riprenderla verso febbraio. Lo sviluppo prosegue normalmente, ma risulta anticipato rispetto alla semina primaverile; questo comporta la possibilità di effettuare la raccolta delle radici in anticipo, in giugno, evitando sia i periodi più caldi e secchi dell'estate che gli attacchi di cercosporiosi (malattia fungina endemica in Italia che provoca gravi perdite produttive), che inizia infatti tipicamente la sua fase di maggiore virulenza dopo la metà di giugno.

Le varietà autunnali devono avere alcune caratteristiche particolari. Anzitutto la resistenza alle basse temperature, dal momento che la pianta trascorre tutto l'inverno esposta a climi che possono essere molto rigidi; altra caratteristica di notevole importanza è la ridotta sensibilità alla vernalizzazione, per evitare che la pianta, ripresa la crescita in primavera, sia stata indotta a prefiorire in percentuali anche elevate. La salita a fiore infatti provoca una mobilitazione del saccarosio di riserva dalle radici, con perdita del titolo zuccherino; le radici di piante prefiorite, inoltre, risultano più fibrose e di scarsa qualità tecnologica (Biancardi, 1999). La coltura autunnale, praticata negli areali di coltivazione meridionali, richiede livelli più spinti di resistenza alla prefioritura. La selezione deve essere quindi accurata con il ricorso a metodi più efficaci, fra cui l'inbreeding (Desprez, 1993). Dato che le piante più sviluppate reagiscono meglio all'induzione fototermica invernale, un sistema molto seguito per accentuare la pressione selettiva è, come nel caso della bietola primaverile, la semina anticipata di 2-3 settimane rispetto alla norma. Per scopi analoghi l'area dedicata alla coltivazione e alla moltiplicazione dei materiali di base viene spostata verso nord o in località più elevate rispetto alla zona di effettiva coltivazione. La resistenza alla prefioritura non deve però essere spinta a livelli troppo alti sia per non deprimere la produzione di saccarosio che per non causare problemi nella moltiplicazione del seme.

La collezione del CRA-CIN Rovigo conserva materiale risultante da molti anni di attività di miglioramento genetico volto alla costituzione di materiali adatti alla semina autunnale. Fra questi, 8 impollinanti tetraploidi e 11 ibridi, con diversi livelli di produttività, ma che non hanno caratteri di resistenza a stress biotici identificati, oltre a quella alla prefioritura.

Un altro carattere molto importante per la bietola, ben rappresentato nella collezione del CRA-CIN, è la resistenza alla rizomania.

Questa fitopatia è causata dal BNYVV (*beet necrotic yellow vein virus*) veicolato e inoculato nelle radici dal fungo *Polymyxa betae*.

La malattia è diffusa in tutto l'areale di coltivazione ad esclusione delle zone più fredde. Provoca danni ingenti che possono arrivare all'80% della produzione di saccarosio (De Biaggi, 2005). La selezione ha raggiunto nell'ultimo trentennio notevoli traguardi, consentendo con l'impiego delle varietà resistenti una elevata protezione delle coltivazioni.

La prima fonte di resistenza alla rizomania fu reperita su materiale di origine italiana, ricavato dalla varietà plurigerme Alba P, che dimostrava anche una buona resistenza alla cercospora.

Probabilmente, i campi utilizzati dalla società Alba per la selezione massale erano leggermente infetti dal BNYVV, per cui il germoplasma della società ricevette per molti anni una inconscia ma efficace selezione per la resistenza alla rizomania, anche quando questa possibilità era sconosciuta. Da esperienze svolte a partire dal 1977 presso l'allora ISCI di Rovigo (oggi CRA-CIN), si appurò che su campi rizomani il comportamento dell'Alba P era nettamente superiore alle altre varietà commerciali. Su questa varietà e su quelle derivate, la resistenza alla rizomania è di media intensità, ma è correlata anche ad una buona resistenza alla cercospora e a discrete caratteristiche agronomiche e qualitative. Il comportamento delle F2 e la difficoltà di miglioramento fanno attribuire a questo tipo di resistenza un carattere quantitativo (Lewellen and Biancardi, 1990).

Nel 1983 fu commercializzata, prima col nome di Diplomono e poi di Rizor, una varietà caratterizzata da un livello di resistenza alla rizomania nettamente superiore, poco resistente alla cercospora, con elevata produzione di radici, qualità tecnologica media e prefioritura superiore alla media (De Biaggi, 1987).

La resistenza alla rizomania era, in questo caso, monogenica e dominante (Lewellen e Biancardi, 1990). La varietà Rizor fu distribuita e provata in tutto il mondo, nelle più diverse condizioni pedoclimatiche e di infezione, con ottimi risultati. Nel 1986 venne distribuito ai selezionatori europei un maschiosterile resistente, assieme al relativo O-type, messo a punto dalla Holly Sugar Company; anche in questo caso il carattere risultò dipendere da un gene dominante (Lewellen *et al.*, 1987), indicato in seguito *Rz*. La questione se le due resistenze (tipo Holly e tipo Rizor) siano indotte dallo stesso fattore è tuttora dibattuta (De Biaggi, 2005). Inoltre, nel tempo sono state identificate altre fonti di resistenza (es. la WB42, derivante da un'accessione danese della ssp. *maritima*; Lewellen, 1995), di cui almeno una appare diversa dalle precedenti. Recenti indagini fanno risalire l'origine di queste resistenze agli ibridi con *Beta maritima* ottenuti a Rovigo da Munerati (Biancardi *et al.* 2012).

La collezione di *Beta vulgaris* conservata presso il CRA-CIN comprende, per quel che riguarda la resistenza alla rizomania, 44 impollinanti tetraploidi, e 191 ibridi. Le fonti di resistenza sopra descritte sono disponibili nella collezione.

La malattia prodotta dal fungo *Cercospora beticola* è certamente oggi per l'Italia il principale fattore di perdite produttive e qualitative per la coltura della bietola. La cercosporiosi colpisce la coltura nelle zone temperate umide, e quindi è particolarmente dannosa in Grecia, Italia, Spagna, Francia meridionale, ecc.

Il fungo provoca caratteristiche macchie necrotiche sull'apparato fogliare, che è portato ad un più o meno rapido disseccamento.

Diverse categorie di fungicidi hanno dimostrato la loro parziale efficacia nel limitare l'infezione, specialmente se nei trattamenti viene seguito un preciso calendario.

La difesa chimica dà risultati parziali così come la resistenza genetica, ma queste due forme di lotta si devono integrare per arrivare ad un soddisfacente, anche se non completo, controllo della malattia nella maggior parte delle situazioni (Biancardi e Graf, 1984; Miller *et al.*, 1994).

La resistenza alla cercospora è poligenica e dipende da almeno 4-5 coppie di geni con effetti variabili a seconda del grado d'infezione (Skaracis and Biancardi, 2000; Koch and Jung, 2000).

È stata trovata una sola fonte utilizzabile di resistenza parziale alla cercospora. Essa risale agli incroci che il direttore dell'allora Regia Stazione Sperimentale di Rovigo, Ottavio Munerati effettuò nel periodo fra le due guerre, utilizzando la *B. vulgaris* ssp. *maritima* che cresce lungo gli argini costieri e fluviali del delta del Po. È dunque possibile che la fonte originale di resistenza sia rappresentata fra le accessioni di bietola o fra quelle derivanti da incroci ssp. *vulgaris* x ssp. *maritima* che fanno parte della collezione; certamente la collezione comprende oltre a 17 impollinanti tetraploidi e 16 ibridi resistenti, anche una certa quantità di accessioni (20 impollinanti e 12 ibridi) che cumulano la resistenza alla rizomania con la tolleranza alla cercospora, e sono quindi di particolare interesse nell'ottica del "pyramiding" di geni di interesse agronomico in bietola.

Per concludere questa breve panoramica sui materiali di *Beta vulgaris* conservati presso il CRA-CIN di Rovigo, va segnalata anche la presenza di altre accessioni che cumulano più caratteri di resistenza, in particolare la resistenza alla rizomania con quella ai nematodi (8 impollinanti) e alla rizoclonia (2 impollinanti e 18 ibridi) (Figura 2).

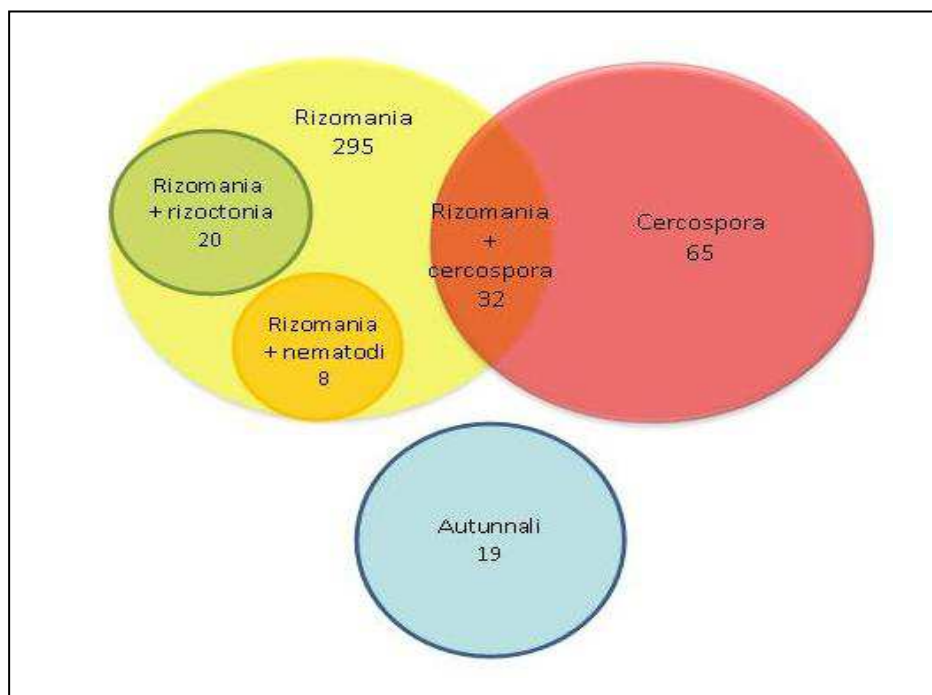


Figura 2 Distribuzione dei caratteri di resistenza nella collezione CRA-CIN di Rovigo (*Beta vulgaris* e ssp. *vulgaris* x ssp. *maritima*)

1.3 *Beta maritima*: risorsa genetica per la barbabietola coltivata

Alcune sottospecie del genere *Beta* rappresentano un modello ideale per esplorare le basi della biodiversità vegetale poiché piante caratterizzate da notevole variabilità genetica e fenotipica ed interesse botanico-naturalistico e agroindustriale.

Il genere *Beta* viene oggi suddiviso in quattro sezioni (Tabella 1; Ford-Lloyd and Williams, 1975; Lange *et al.*, 1999). La sezione *Beta* comprende le specie *Beta vulgaris* L., *Beta macrocarpa* Guss. e *Beta patula* Ait. Le altre sezioni comprendono nove specie senza alcun interesse commerciale, ma spesso adoperate dai selezionatori nel tentativo di trasferire caratteri utili alle varietà coltivate.

Tabella 1 Classificazione delle specie appartenenti al genere *Beta*

<i>Genere: Beta L.</i>	
<i>Sezione I: Beta L. (syn. Vulgares Ulbrich)</i>	
	<i>Beta vulgaris L. subsp: vulgaris (Leaf, Garden, Fodder, Sugar Beet Groups)</i>
	<i>Beta vulgaris L. subsp: maritima (L.) Arcang.</i>
	<i>Beta vulgaris L. subsp: adanensis (Pamuk.) Ford-Lloyd & Will.</i>
	<i>Beta macrocarpa Guss.</i>
	<i>Beta patula Ait.</i>
<i>Sezione II: Corollinae Ulbrich .</i>	
	<i>Beta macrorryza Stev.</i>
	<i>Beta trigyna Wald. & Kit</i>
	<i>Beta foliosa Haussk.</i>
	<i>Beta lomatogona Fish. & Meg.</i>
	<i>Beta corolliflora Zos.</i>
<i>Sezione III: Nanae Ulbrich</i>	
	<i>Beta nana Boiss. & Held</i>
<i>Sezione IV: Procumbentes Ulbrich (syn. patellares Transhel)</i>	
	<i>Beta patellaris Moq.</i>
	<i>Beta procumbens Chr. Sm</i>
	<i>Beta webbiana Moq.</i>

Le barbabietole coltivate (da costa, da foglia, da orto, da foraggio e da zucchero) appartengono alla sezione *Beta* e sono tutte comprese nella specie *vulgaris* sottospecie *vulgaris*. La barbabietola marittima (in Fig. 3, un'accessione fotografata *in situ* in Croazia), considerata specie a sé stante da Linneo ed in precedenti tassonomie, è ora classificata come sottospecie *maritima* (L.) Arcang. (Lange *et al.*, 1999). È considerata la progenitrice ancestrale della barbabietola coltivata. La specie ha il suo centro di origine nelle regioni costiere dell'Asia Minore ed è ancora oggi diffusa specialmente lungo le zone litoranee del Mediterraneo e le coste europee ed africane dell'Atlantico centro-settentrionale (Coons, 1954; Biancardi, 2005b; Biancardi *et al.*, 2012). Lo studio delle popolazioni selvatiche di barbabietola marittima sta ora suscitando un crescente interesse nella ricerca di nuove fonti di resistenza agli stress ambientali, da utilizzare nel miglioramento della specie coltivata.

Contrariamente ad altre specie del genere *Beta*, la vicinanza evolutiva della barbabietola marittima alla barbabietola coltivata ha favorito le ibridazioni tra le due specie (Hjerdin *et al.*, 1994), sia attraverso incroci spontanei che per le selezioni operate dall'uomo. Importanti tratti di resistenza alle fitopatie, oggi presenti nelle varietà coltivate di barbabietola, sono stati isolati dal materiale selvatico. Studi pionieristici in questo senso sono stati prodotti sin dalla fine del XIX secolo, ma è solo nei primi decenni del secolo successivo che l'incessante lavoro di ibridazione e selezione condotto da Ottavio Munerati (1875-1949) ha consentito, come si è già accennato a proposito della tolleranza alla cercosporiosi, di ottenere risultati e materiali ancora



Figura 3 Barbabetola marittima (costa di Dubrovnik, Croazia).

oggi di fondamentale rilevanza e tuttora sfruttati per il miglioramento genetico. A Munerati si deve, infatti, l'isolamento delle resistenze genetiche alla cercospora, che, insieme alla rizomania, costituiscono le principali malattie della barbabietola nelle zone di coltivazione a clima temperato umido, e per le quali a tutt'oggi non sono state selezionate altre fonti di resistenza utili. Si può dunque affermare che tutte le varietà di barbabietola resistenti alla cercospora attualmente utilizzate nel mondo derivano dal materiale selezionato dal Munerati a partire dal seme di barbabietola selvatica raccolto alla foce del Po di Levante nel 1909. Anche l'origine delle resistenze alla rizomania di tipo "Alba", "Rizor" e "Holly" sono riferibili a materiali italiani derivati dai primi incroci di Munerati con la barbabietola marittima (Biancardi *et al.*, 2002).

L'habitat delle accessioni selvatiche è spesso caratterizzato da suoli poco fertili dove sono sottoposte a pressioni selettive del tutto diverse da quelle delle barbabietole coltivate. La superiore variabilità genetica e genotipica tra le popolazioni di barbabietola marittima, rispetto alle varietà coltivate, è stata infatti associata alla capacità di adattamento della specie a condizioni di stress ambientale (Hanson e Wyse, 1982), che le consentono di vegetare in ambienti inospitali spesso caratterizzati da elevata salinità e limitata disponibilità idrica (Stevanato *et al.*, 2001; Bagatta *et al.*, 2008; Vastarelli *et al.*, 2013). La raccolta, conservazione e caratterizzazione di questo germoplasma selvatico appare di fondamentale importanza agronomica, non soltanto come fonte di resistenze genetiche agli stress biotici, ma anche per gli stress abiotici, da utilizzare in futuri programmi di miglioramento genetico (Frese *et al.*, 2001, Luterbacher *et al.*, 2005). In Figura 4, sono elencati caratteri utili per il miglioramento genetico della barbabietola coltivata, precedentemente identificati nella barbabietola marittima (Frese *et al.*, 2001).

Caratteri utili per il miglioramento genetico	Codice taxon																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Annualità	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Monogermia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Maschiosterilità	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Resistenza a stress abiotici</i>																		
Resistenza alla salinità																		
Resistenza al freddo																		
<i>Resistenza a virus</i>																		
Giallume grave della bietola (Beet Yellow Virus)																		
Mosaico della bietola (Beet Mosaic Virus)																		
Rizomania (Beet Necrotic Yellow Vein Virus)																		
<i>Resistenza a funghi</i>																		
Peronospora farinosa																		
Erysiphe betae																		
Rhizoctonia solani																		
Cercospora beticola																		
Polymixa betae																		
Erwinia ssp.																		
<i>Resistenza a nematodi</i>																		
Heterodera schachtii																		
Heterodera trifolii																		
<i>Resistenza a insetti</i>																		
Myzus persicae																		
Pegomya ssp.																		

Figura 4 Caratteri di tolleranza agli stress ambientali identificati nella barbabietola marittima.

In varietà commerciali di barbabietola da zucchero, Stevanato *et al.* (2007) hanno osservato un ridotto accrescimento dell'apparato radicale causato dall'introggressione dal progenitore selvatico di geni di resistenza alla rizomania e alla cercospora. Ciò sembra essere responsabile della loro bassa produttività se allevati in terreno esente da fitopatie. E' dunque prioritaria l'identificazione, mediante lo studio dell'apparato radicale, di accessioni selvatiche che, pur dotate della resistenza alle suddette fitopatie, non penalizzino lo sviluppo e la funzionalità della radice.

1.4 Caratteri adattativi agli stress ambientali dell'apparato radicale nel germoplasma selvatico di Beta

Il miglioramento genetico realizzato nel secolo scorso ha comportato, oltre all'aumento del potenziale produttivo delle specie coltivate, un restringimento della loro base genetica con la conseguente perdita di caratteri responsabili dell'adattamento all'ambiente. Se, da un lato, l'elevato impiego di mezzi tecnici ha consentito di ridurre le perdite produttive in presenza di stress, dall'altro è stato responsabile di una selezione negativa per i caratteri riguardanti l'accrescimento dell'apparato radicale e l'efficienza nell'utilizzo dei nutrienti (Cassman *et al.*, 2002). Ciò trova conferma in recenti studi che hanno evidenziato l'inferiore sviluppo radicale nelle cultivar commerciali di frumento rispetto alle varietà locali (Waines e Ehdai, 2007). Altre ricerche hanno dimostrato la ridotta efficienza nell'utilizzo del fosforo da parte di cultivar commerciali di fagiolo confrontate con varietà indigene (Beebe *et al.*, 1997). Per la diffusione di un'agricoltura eco-compatibile, basata sull'impiego di cultivar molto produttive anche in condizioni ambientali avverse, lo sviluppo dell'apparato radicale è ritenuto il fattore più importante su cui orientare i programmi di miglioramento genetico (Lynch, 2007). Ciò richiede l'identificazione, a livello dell'apparato radicale, di caratteri morfo-fisiologici legati alla capacità di reperire acqua e nutrienti e di fattori genetici da utilizzare nella selezione assistita. Sono stati identificati in mais, frumento e girasole diversi caratteri fisiologici chiave che hanno dimostrato un'ampia variabilità genetica nell'efficienza del sistema di trasporto per ioni mobili, come il solfato ed il nitrato, entrambi soggetti ad ampie fluttuazioni di concentrazione nel suolo (Cacco *et al.*, 1983; Saccomani *et al.*, 2002). Significative correlazioni sono state rilevate tra i parametri di trasporto del solfato e del nitrato e la produttività (Cacco *et al.*, 1980). Tali correlazioni hanno portato all'identificazione di indici utili alla selezione di genotipi caratterizzati da maggiore produttività ed efficienza nell'utilizzo dei nutrienti (Saccomani *et al.*, 1981).

Recenti ricerche hanno messo in evidenza l'importanza di alcuni caratteri morfologici dell'apparato radicale (es. velocità di accrescimento della radice primaria e numero di apici) strettamente legati all'acquisizione dei nutrienti del suolo (Roumet *et al.*, 2006; Sorgonà *et al.*, 2007).

Tali caratteri, che si è visto essere responsabili di una superiore produttività anche in barbabietola da zucchero (Stevanato *et al.*, 2004; Stevanato *et al.*, 2007), sono correlati anche ad una superiore competitività verso le malerbe. In barbabietola da zucchero, è stato dimostrato che la rapida colonizzazione del suolo da parte dell'apparato radicale determina una superiore abilità competitiva verso le specie infestanti (Stevanato *et al.*, 2006; Stevanato *et al.*, 2008). Tali esperienze hanno indicato la possibilità di migliorare non solo la competitività della barbabietola verso le malerbe attraverso l'accresciuto sviluppo dell'apparato radicale, ma anche la produzione di zucchero forse dovuta alla maggiore possibilità di assorbimento di acqua e nutrienti dagli strati profondi del suolo (Stevanato *et al.*, 2010).

La marcatura genetica dei sopraindicati caratteri già riconosciuti come indici dell'adattamento agli stress nutrizionali, e come marcatori della capacità produttiva in alcune specie coltivate (mais e barbabietola), potrebbe consentire nei programmi di miglioramento genetico l'individuazione di genotipi maggiormente adattabili a condizioni sub-ottimali di coltura.

Solo negli ultimi anni, l'introduzione d'innovative tecniche di biologia molecolare basate sulla genomica e sulla genomica funzionale hanno consentito di approfondire notevolmente lo studio dell'apparato radicale e del suo controllo genetico. Approcci di analisi genomica hanno consentito di identificare regioni cromosomiche o loci QTL (*Quantitative Trait Loci*), che ospitano geni responsabili di caratteri quantitativi dell'apparato radicale, in *Arabidopsis thaliana* (Loudet *et al.*, 2005), mais (Tuberosa *et al.*, 2003), riso (Zheng *et al.*, 2003) ed altre specie coltivate. Per l'identificazione di questi marcatori viene spesso impiegata l'approccio della "bulk QTL analysis" (*Quantitative Trait Loci*), che consiste nell'analisi comparativa, mediante marcatori molecolari (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms, AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphisms, ecc.), di progenie segreganti in cui i caratteri di interesse dei parentali risultano ricombinati e, quindi, scomponibili nei diversi contributi genetici (Michelmore *et al.* 1991; Ranalli e Mandolino, 1999; Mandolino, 2007). Presupposto indispensabile per questa analisi è lo studio della diversità biologica relativa alla morfologia e al funzionamento dell'apparato radicale risultanti sia dalla variabilità genetica naturale, sia da quella indotta dalle procedure di miglioramento genetico. In un'ampia collezione di germoplasma di riso, la caratterizzazione fenotipica dell'apparato radicale ha permesso l'identificazione di linee parentali che differiscono per la lunghezza radicale e il rapporto root/shoot e il successivo sviluppo di popolazioni segreganti per questi caratteri fenotipici (Thanh *et al.*, 1999). Queste popolazioni potranno essere utilizzate per l'identificazione di marcatori molecolari implicati nel controllo genetico dell'apparato radicale.

Uno degli autori (P. Stevanato) ha svolto negli anni passati presso il CRA-CIN di Rovigo una serie di osservazioni, prelievi ed analisi morfo-fisiologiche e molecolari su diverse popolazioni di *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, nell'ottica di una valutazione del materiale selvatico presente *in situ* e potenzialmente utilizzabile, e che pur non facendo parte dell'attuale collezione presente presso il CRA-CIN di Rovigo, potrebbe arricchirla per caratteri di notevole importanza potenziale anche per la barbabietola coltivata.

Il materiale vegetale selvatico, reperito *in situ* ed analizzato per la risposta adattativa dello sviluppo dell'apparato radicale in risposta a uno stress abiotico ben specifico (la carenza da solfato), ha incluso 39 accessioni selvatiche di barbabietola campionate nel quadriennio 2005-2009 su siti costieri occidentali e orientali del mare Adriatico (Fig. 5). Il reperimento del materiale selvatico è stato effettuato in accordo con la metodologia descritta da Bartsch *et al.* (1999) e Mùcher *et al.* (2000).

Evidenze ottenute su questo materiale di *Beta vulgaris* ssp. *maritima* reperito lungo diversi siti delle coste adriatiche (Stevanato *et al.*, 2001), aveva evidenziato in 39 diverse accessioni, ampie e significative variazioni per i caratteri morfologici "velocità di accrescimento della radice primaria" (339%), "lunghezza radicale totale" (488%), "superficie radicale totale" (500%), "lunghezza delle radici fini" (815%) e "densità degli apici radicali" (236%) (Tabella 2). Tutti i parametri radicali sono risultati fra loro significativamente ($P < 0.01$) e positivamente correlati (Tabella 3).

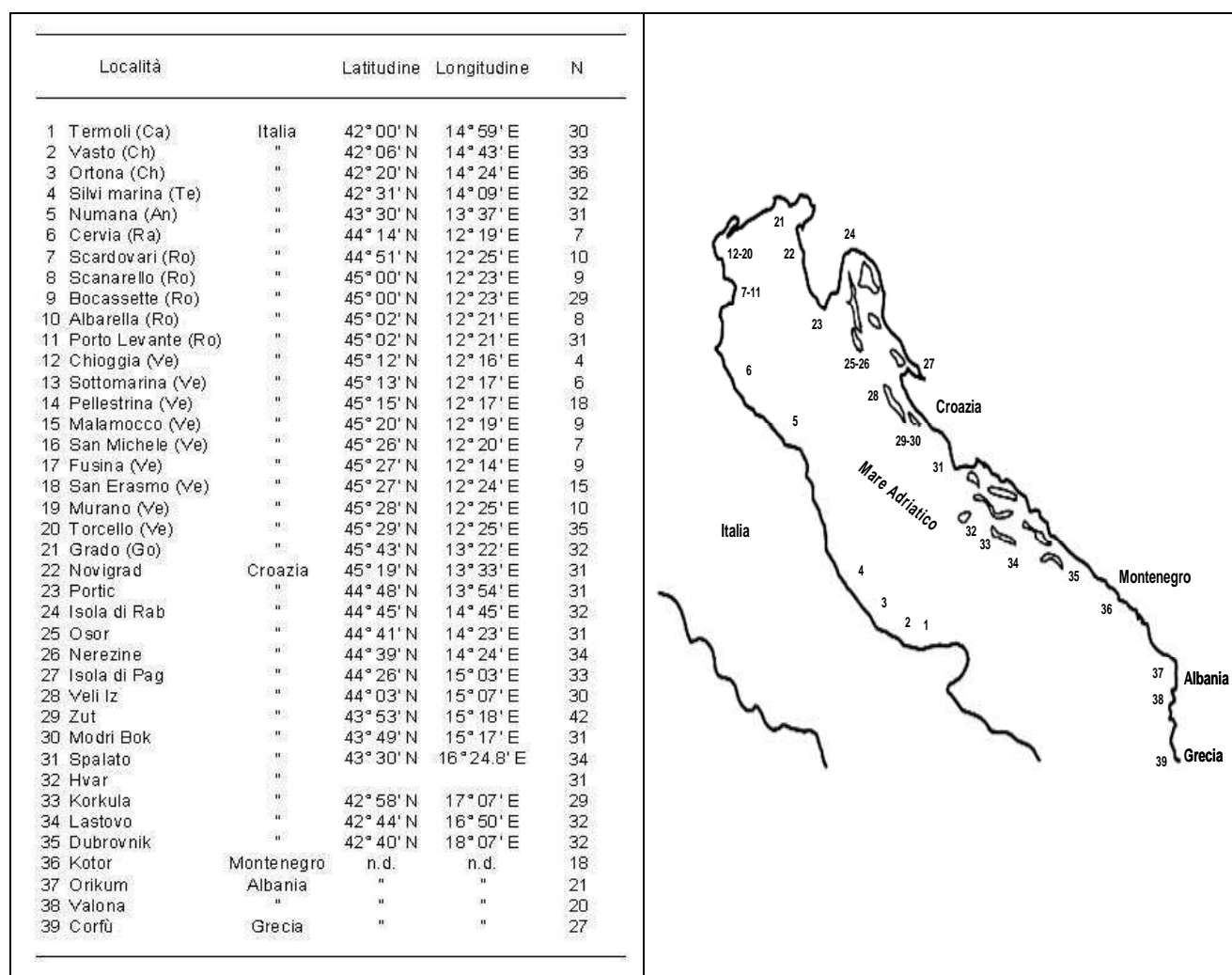


Figura 5 Localizzazione e numero d'individui (N) delle accessioni di barbabietola marittima reperite e caratterizzate.

Di conseguenza, è stato già accertato che per importanti caratteri adattativi legati allo sviluppo radicale, il germoplasma selvatico esistente nel nostro territorio e in territori vicini, mostra ampia variabilità e può pertanto costituire un'importante fonte di tratti interessanti correlati alle caratteristiche della radice.

L'analisi comparativa dei caratteri dell'apparato radicale fra le accessioni selvatiche della costa adriatica e alcune coltivate, ha evidenziato che le accessioni selvatiche sono caratterizzate, rispetto a quelle coltivate, da minore velocità di accrescimento della radice primaria, lunghezza radicale totale e lunghezza delle radici fini e da maggiore densità degli apici radicali (Stevanato *et al*, 2007).

L'analisi molecolare mediante microsatelliti (Stevanato, dati non pubblicati) ha anche permesso di evidenziare 37 alleli polimorfici tra le 44 accessioni analizzate. Il numero di alleli per locus è risultato compreso tra 1 e 3. La diversità genetica evidenziata a questi loci all'interno del gruppo delle accessioni selvatiche del litorale adriatico orientale è mediamente più alta rispettivamente di quella delle accessioni provenienti dal litorale occidentale e di quella delle accessioni coltivate.

Tabella 2 Caratteri dell'apparato radicale determinati in 39 accessioni selvatiche e 5 accessioni coltivate (L01-5) di barbabietola.

ID accessione	Nome accessione	Velocità di accr. della radice primaria	Lunghezza radicale totale	Superficie radicale totale	Lunghezza radici fini (D<0.5 mm)	Densità di apici
		mm giorno ⁻¹	cm	cm ²	cm	n cm ⁻¹
1	Termoli (Ca)	4,3	8,3	2,1	6,3	3,9
2	Vasto (Ch)	3,6	7,9	2,4	5,8	4,2
3	Ortona (Ch)	2,8	5,3	2,0	4,7	2,8
4	Silvi marina (Te)	4,9	8,3	2,2	4,1	4,2
5	Numana (An)	3,6	9,9	2,1	5,6	2,8
6	Cervia (Ra)	4,8	8,1	2,4	5,3	4,6
7	Scardovari (Ro)	2,1	4,4	1,3	3,0	3,4
8	Scanarello (Ro)	2,9	4,2	1,7	2,7	4,0
9	Bocassette (Ro)	2,5	6,9	1,7	3,2	3,0
10	Albarella (Ro)	2,5	6,4	1,2	3,9	3,6
11	Porto Levante (Ro)	3,0	5,1	2,0	3,6	4,2
12	Chioggia (Ve)	2,9	9,3	2,1	4,2	2,7
13	Sottomarina (Ve)	4,1	8,9	2,5	4,7	3,6
14	Pellestrina (Ve)	3,2	7,7	2,0	3,7	3,1
15	Malamocco (Ve)	3,1	9,3	2,1	4,6	3,0
16	San Michele (Ve)	3,3	8,4	2,1	5,2	3,6
17	Fusina (Ve)	3,4	4,1	2,1	3,1	4,8
18	San Erasmo (Ve)	3,7	7,7	2,4	5,6	4,2
19	Murano (Ve)	3,5	9,8	2,0	2,2	2,8
20	Torcello (Ve)	3,2	5,9	1,9	3,8	3,7
21	Grado (Go)	3,6	4,6	2,6	3,5	7,3
22	Novigrad	3,6	9,2	2,2	6,8	3,6
23	Portic	3,6	5,4	2,0	5,2	6,6
24	Isola di Rab	2,9	3,6	2,3	2,7	5,0
25	Osor	2,4	5,5	1,6	4,6	3,6
26	Nerezine	2,5	5,1	1,3	3,2	4,4
27	Isola di Pag	4,4	7,2	2,3	5,9	4,8
28	Veli Iz	5,8	8,6	2,1	4,8	3,7
29	Zut	5,2	11,0	2,7	7,4	3,3
30	Modri Bok	3,6	7,1	2,2	3,0	3,8
31	Spalato	4,1	9,6	1,7	5,2	3,7
32	Hvar	3,5	6,7	2,5	4,0	4,6
33	Korkula	2,6	7,4	1,8	5,4	3,0
34	Lastovo	6,6	11,6	3,4	10,8	3,6
35	Dubrovnik	3,3	6,2	2,2	4,6	4,5
36	Kotor	3,2	6,7	1,9	5,2	3,7
37	Orikum	3,2	6,8	2,5	3,8	3,4
38	Valona	1,8	3,1	0,6	1,6	2,8
39	Corfù	2,8	7,6	1,8	5,2	2,8
40	L01	6,2	12,5	3,2	9,4	3,3
41	L02	6,3	16,2	3,3	12,6	2,4
42	L03	6,7	15,3	3,7	12,1	2,7
43	L04	7,1	17,7	3,6	12,3	2,6
44	L05	7,9	18,1	3,7	14,7	2,8
DMS (P<0.01)		0,82	3,2	0,92	2,5	1,1

Tabella 3 Coefficienti di correlazione di Pearson tra i parametri radicali esaminati. I coefficienti riportati sono significativi per P<0,01.

Carattere	Velocità di accr. della radice primaria	Lunghezza radicale totale	Superficie radicale totale	Lunghezza radici fini
Lunghezza radicale totale	0,863			
Superficie radicale totale	0,878	0,798		
Lunghezza radici fini	0,875	0,902	0,832	
Numero di apici	0,890	0,817	0,831	0,803

Dal dendrogramma di similarità genetica, ottenuto tramite analisi UPGMA, erano stati individuati per queste accessioni identificate *in situ* tre gruppi geneticamente distinti: 1) accessioni del litorale adriatico occidentale; 2) accessioni del litorale adriatico orientale; 3) accessioni coltivate (Figura 6).

L'uso dei marcatori microsatelliti ha consentito di accertare la diversità genetica delle accessioni di barbabietola in accordo con Schmidt e Heslop-Harrison (1996). Le accessioni selvatiche distribuite *in situ* hanno mostrato una base genetica più ampia rispetto a quelle coltivate, come già descritto da McGrath e Derrico (1999) che hanno evidenziato il restringimento della base genetica delle barbabietole coltivate. e da Bartsch *et al.* (2002), che hanno osservato il superiore polimorfismo genetico delle accessioni selvatiche rispetto a quelle domestiche; questi dati ottenuti mediante micro satelliti sono anche in accordo con dati precedenti ottenuti mediante marcatori AFLP (Bartsch *et al.*, 2002) con i quali si evidenziava che la variabilità presente nelle popolazioni di *Beta maritima* identificate *in situ* nella zona del delta del Po era superiore non solo a quella del pool coltivato di *Beta vulgaris* (Figura 6a e 6c) ma anche a quella di popolazioni di *Beta maritima* di altre aree, il cui seme era stato ottenuto da una banca di germoplasma. Questo dato sembrerebbe essere una ulteriore testimonianza della utilità della osservazione e conservazione *in situ* delle risorse genetiche, rispetto alla collezioni *ex situ*, per l'effettiva più completa conservazione del pool genico di una specie.

L'elevata diversità genetica delle accessioni selvatiche potrebbe dipendere dalla pressione di selezione esercitata dai diversi habitat naturali, cui il materiale delle banche di germoplasma e quello coltivato è di fatto sottratto. Ciò è in accordo con precedenti studi che hanno evidenziato come il polimorfismo allelico sia mantenuto più facilmente negli ecosistemi naturali rispetto a quelli agricoli (Hamrick e Holden, 1979) e che la variabilità genetica delle specie vegetali aumenta proporzionalmente all'aumentare dell'eterogeneità delle condizioni ambientali (Hedrick, 2006).

1.4 Conclusioni

L'elevata diversità genetica e funzionale osservata all'interno delle accessioni selvatiche del genere *Beta* può essere utile al miglioramento genetico della barbabietola da zucchero (Stevanato *et al.*, 2001; Biancardi *et al.*, 2002). L'identificazione di accessioni che aumentano lo sviluppo dell'apparato radicale in risposta allo stress nutrizionale è di grande interesse ecologico perché questa strategia adattativa permette alle piante di produrre in condizioni ambientali avverse senza il ricorso a elevati apporti di input tecnici. L'identificazione, sul nostro territorio e la caratterizzazione morfo-fisiologica e genomico-funzionale di popolazioni di *Beta vulgaris* ssp. *maritima* potenziali fonti di caratteri agronomicamente utili, è una strategia che può validamente affiancare l'esistenza di collezioni di lotti di seme in banche di germoplasma. Non a caso negli ultimi anni l'accento della conservazione di germoplasma si è particolarmente spostato verso la conservazione *in situ*.

La collezione presente presso il CRA-CIN, pur non contenendo accessioni selvatiche, rappresenta adeguatamente materiale maschio sterile, O-types ed impollinanti derivanti dagli ultimi 20 anni di attività di miglioramento genetico; inoltre, sono rappresentati alcuni ibridi fra le due sottospecie di *Beta vulgaris* (ssp. *vulgaris* e ssp. *maritima*) che possono essere di particolare utilità per studi di genetica, per attività di mappaggio di geni utili e per eventuale risequenziamento di genotipi che cumulano caratteristiche sia del pool coltivato che di quello selvatico.

Ai tradizionali strumenti per il mantenimento del germoplasma, le collezioni *ex situ* e la conservazione *in situ*, si è affiancato negli ultimi anni un potente strumento di identificazione e analisi dei caratteri utili all'interno dei vari pool genici: la genomica e la genomica funzionale dei tratti rappresentati nel pool coltivato e selvatico, sono oggi molto sviluppate anche per le specie del genere *Beta*, e la prima sequenza genomica completa della barbabietola da zucchero, (Weisshaar *et al.*, 2011), accelererà ulteriormente le capacità di analisi del materiale in conservazione e delle popolazioni naturali, fornendo un forte impulso alla scoperta di nuovi geni.

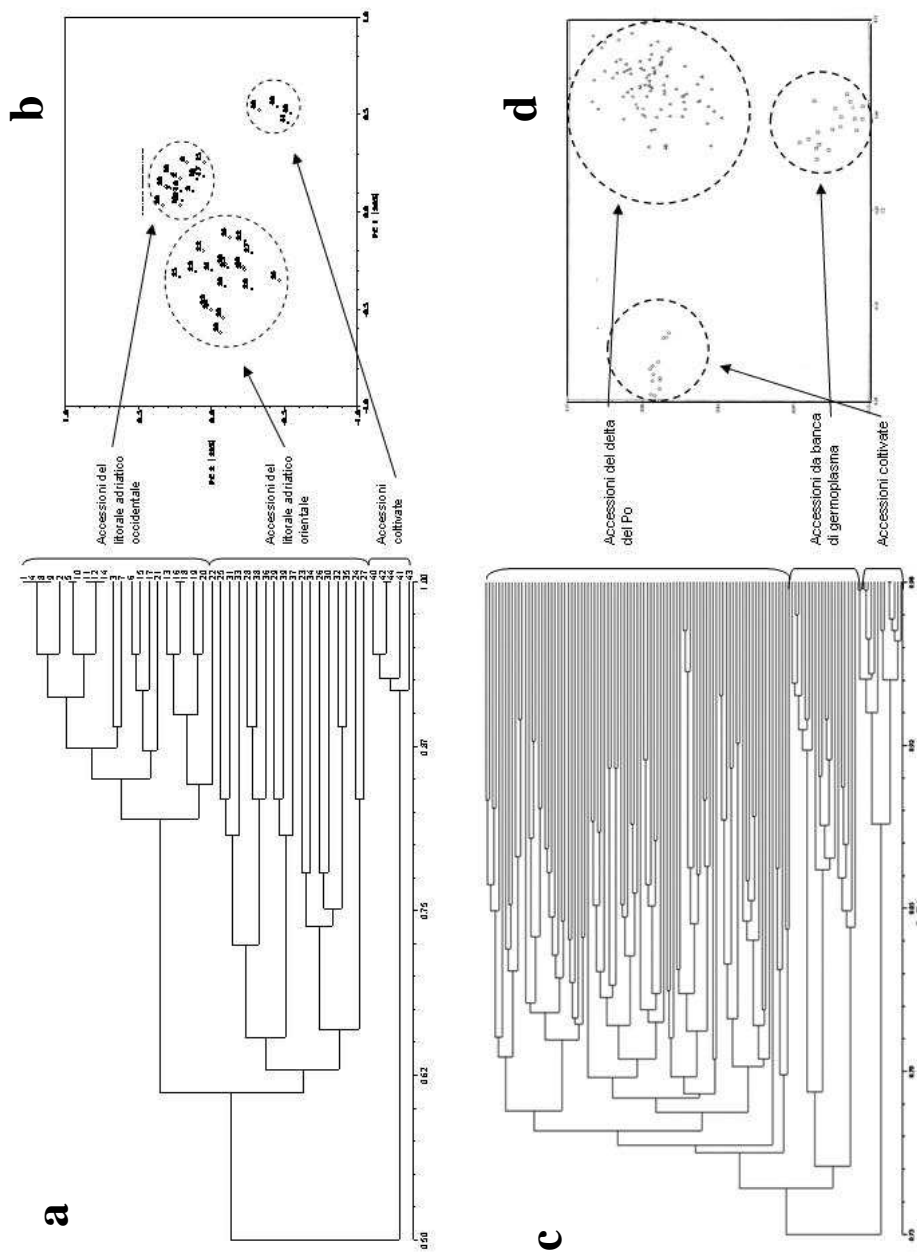


Figura 6 Analisi cluster e PCA dei dati da microsatelliti delle popolazioni di *Beta maritima* identificate delle diverse località del litorale adriatico (6a e 6b), e di un sottinsieme di queste popolazioni (Delta del Po) confrontate con accessioni di *Beta maritima* da banca di germoplasma e accessioni coltivate (6c e 6d).

1.5 Bibliografia

- Bagatta M., Pacifico D., Mandolino G., 2008. Evaluation of the osmotic adjustment response within the genus *Beta*. *J. Sugar Beet Res.* 45: 119-133.
- Bartsch D., Lehnen M., Clegg J., Pohl-Orf M., Schuphan I., Ellstrand N.C. 1999. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Molecular Ecology* 8:1733-1741.
- Bartsch D., Stevanato P., Lehnen M., Mainolfi A., Mùcher T., Morchella A., Driessen S., Mandolino G., Hoffmann A., De Biaggi M., Wehres U., Biancardi E. 2002. Biodiversity of sea beet in northern Italy. *Proc of the 65th International Institute for Beet Research Congress*, pp. 171-180.
- Beebe S., Lynch J., Galwey N., Tohme J., Ochoa I. 1997. A geographical approach to identify phosphorous-efficient genotypes among landraces and wild ancestors of common bean. *Euphytica* 95:325-336.
- Biancardi E. e Graf A. 1984. Cercospora e varietà. *Sementi Elette* 1-2: 31-38.
- Biancardi E. 1999. La trasformazione industriale e la qualità estrattiva. In: Casarini B., Biancardi E., Ranalli P. (eds.), *La barbabietola negli ambienti mediterranei*. Edagricole, pp. 627-666.
- Biancardi E., Lewellen R.T., De Biaggi M., Erichsen A.W., Stevanato P. 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 127:383-397.
- Biancardi E. 2005a. Objectives of sugar beet breeding. In: Biancardi E., Campbell L.G., Skaracis G.N., De Biaggi M. (eds.), *Genetics and breeding of sugar beet*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp. 53-62.
- Biancardi E. 2005b. Brief history of sugar beet cultivation. In: Biancardi E., Campbell L.G., Skaracis G.N., De Biaggi M. (eds.), *Genetics and breeding of sugar beet*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp. 3-9.
- Biancardi E., Panella L.W., Lewellen R.T. (2012) *Beta maritima: the origin of beets*. Springer, New York, pp.297.
- Boyer J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448.
- Cacco G., Ferrari G., Saccomani M. 1980. Pattern of sulfate uptake during root elongation in maize: its correlation with productivity. *Physiologia Plantarum* 48:375-378.
- Cacco G., Saccomani M., Ferrari G. 1983. Changes in the uptake and assimilation efficiency for sulfate and nitrate in maize hybrids selected during the period of 1930 through 1975. *Physiologia Plantarum* 58:171-174.
- Cassman K.G., Dobermann A., Walters D.T. 2002. Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. 2002. Royal Swedish Academy of Sciences. *Ambio* 31:132-140.
- Coons G.H. 1954. The wild species of *Beta*. *Proc. of the American Society of Sugar Beet Technologists* 8:142-147.
- De Biaggi M. 1987. Methodes de selection – un cas concret. *Proc. of the 50th Congress of the International Institute for Beet Research*, pp. 157-161.
- De Biaggi M. 2005. Rhizomania. In: Biancardi E., Campbell L.G., Skaracis G.N., De Biaggi M. (eds.), *Genetics and breeding of sugar beet*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp. 80-85.
- Desprez M., 1993. Evolution des methods de selection de la betterave sucrière des origins à nos jours. *C.R. Acad. Agric. France* 79: 71-84.
- Frese L., Desprez B., Ziegler D. 2001. Potential of genetic resources and breeding strategies for base-broadening in *Beta*. In Cooper H.D., Spillane C., Hodgkin T. (eds.), *Broadening the Genetic Base of Crop Production*. IPGRI/FAO, Rome, pp. 295-309.
- Ford-Lloyd B. V., Williams J. T. 1975. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71:89-102.
- Hamrick J.L., Holden L.R. 1979. The influence of microhabitat heterogeneity on gene frequency distribution and gametic phase disequilibrium in *Avena barbata*. *Evolution* 33:521-533.
- Hanson A.D., Wyse R. 1982. Biosynthesis, translocation and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity. *Plant Physiology* 70:1191-1198.
- Hedrick P.W. 2006. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: the age of genomics. *Ann. Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37:67-93.
- Hjerdin A., Sall T., Nilsson N.O., Bornman C.H., Hallden C. 1994. Genetic variation among wild and cultivated beets of the section *Beta* as revealed by RFLP analysis. *Journal of Sugar Beet Research* 31:59-67.
- Koch G. and Jung C., 2000. Genetic localization of Cercospora resistance genes. *Adv. In Sugar*

- Beet Res., IIRB, vol. 2: 197-210.
- Lange W., Brandenburg W.A., De Bock T.S.M. 1999. Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). Botanical Journal of the Linnean Society 130:81-96.
- Lewellen R.T., 1995. Performance of near-isolines of sugarbeet with resistance to rhizomania from different sources. Proc of the 58th Congress of the International Institute for Beet Research, pp. 83-89.
- Lewellen R.T., Skoyen I.O., Erichsen A.W., 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: evaluation of host-plant reaction and selection for inheritance of resistance. Proc of the 50th Congress of the International Institute for Beet Research, pp. 139-156.
- Lewellen R.T. and Biancardi E. 1990. Breeding and performance of of rhizomania resistant sugar beet. Proc of the 53th Congress of the International Institute for Beet Research, pp. 69-87.
- Luterbacher M.C., Asher M.J.C., Beyer W., Mandolino G., Scholten O.E., Frese L., Biancardi E., Stevanato P., Mechelke W., Slyvchenko O., 2005. Sources of resistance to diseases of sugar beet in related *Beta* germplasm: II. Soil-borne diseases. Euphytica 141: 49-63.
- Loudet O., Gaudon V., Trubuil A., Daniel-Vedele F. 2005. Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. Theor. Appl. Genetics 110:742-753.
- Lynch J.P. 2007. Roots of the Second Green Revolution. Australian Journal of Botany 55:493-512.
- Mandolino G., 2007. Marker assisted selection and genomics of industrial plants. In: Ranalli P. (ed.), Improvement of crop plants for industrial end uses. Springer, pp. 59-82.
- McGrath J.M., Derrico C.A., Yu Y. 1999. Genetic diversity in selected, historical US sugarbeet germplasm and *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. Theor. Appl. Genetics 98:968-976.
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: in specific genomic regions by using segregating populations. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA 88: 9828-9832.
- Miller J., Rekoske M., Quinn A., 1994. Genetic resistance, fungicide protection and variety approval policies for controlling yield losses from cercospora leaf spot infections. J. Sugar Beet Res. 31: 7-12.
- Mücher T., Hesse P., Pohl-Orf M., Ellstrand N.C., Bartsch D. 2000. Characterization of weed beet in Germany and Italy. J. Sugar Beet Res. 37: 19-38.
- Ranalli P., Mandolino G. 1999. Il contributo delle biotecnologie al miglioramento genetico della barbabietola da zucchero. In: Casarini B., Biancardi E., Ranalli P. (eds.), La barbabietola negli ambienti mediterranei. Edagricole, Bologna, pp. 183-239.
- Roumet C., Urcelay C., Díaz S. 2006. Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. New Phytologist 170:357-368.
- Saccomani M., Cacco G., Ferrari G. 1981. Efficiency of the first steps of sulfate utilization by maize hybrids in relation to their productivity. Physiologia Plantarum 53:101-104.
- Saccomani M., Stevanato P., Cagnin M., Biancardi E. 2002. Genetic variation of sulfate uptake in sugar beet. Proc. of the 65th Congress of the International Institute for Beet Research Congress, 255-260.
- Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. 1996. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. Proc. of the Natl. Acad. of Sci. U.S.A. 93:8761-8765.
- Skaracis G.N. and Biancardi E., 2000. Breeding for Cercospora resistance in sugar beet. Adv. In Sugar Beet Res., IIRB, vol. 2: 177-196.
- Sorgonà A., Abenavoli M.R., Gringeri P.G., Cacco G. 2007. Comparing morphological plasticity of root orders in slow-and fast-growing citrus rootstocks supplied with different nitrate levels. Annals of Botany 100:1287-1296.
- Stevanato P., De Biaggi M., Skaracis G.N., Colombo M., Mandolino G., Biancardi E. 2001. The sea beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima*) of the Adriatic coast as source of resistance for sugar beet. Sugar Tech 3:77-82.
- Stevanato P., Saccomani M., Bertaggia M., Bottacin A., Cagnin M., De Biaggi M., Biancardi E. 2004. Nutrient uptake traits related to sugarbeet yield. J. of Sugar Beet Res. 41:89-99.
- Stevanato P., Biancardi E., Bertaggia M., Tamino G., Saccomani M. 2006. Competizione fra barbabietola da zucchero e specie infestanti in agricoltura biologica: ruolo del sistema radicale. Agroindustria 5:37-42.

- Stevanato P., Cagnin M., Saccomani M. 2007. Meccanismi morfofisiologici di adattamento allo stress idrico-nutrizionale in barbabietola da zucchero. *Agroindustria* 5:131-136.
- Stevanato P., Trebbi D., Bertaggia M., Biancardi E., Saccomani M. 2008. Apparato radicale e competitività della barbabietola da zucchero verso le malerbe. *Agroindustria* 6:107-112.
- Stevanato P., Trebbi D., Saccomani M. 2010. Root traits and yield in sugar beet: identification of AFLP markers associated with root elongation rate. *Euphytica* 173: 289-298.
- Thanh N.D., Zheng H.G., Dong, N.V., Trinh L.N., Ali M.L., Nguyen H.T. 1999. Genetic variation in root morphology and microsatellite DNA loci in upland rice (*Oryza sativa* L.) from Vietnam. *Euphytica* 105:43-51.
- Tuberosa R., Salvi S., Sanguineti M.C., Maccaferri M., Giuliani S., Landi P. 2003. Searching for QTLs controlling root traits in maize: a critical appraisal. *Plant and Soil* 255:35-54.
- Vastarelli P., Moschella A., Pacifico D. and Mandolino G. 2013. Water stress in *Beta vulgaris*: osmotic adjustment response and gene expression analysis in ssp. *vulgaris* and *maritima*. *Am. J. Plant Sciences* 4: 11-16.
- Waines J.G., Ehdaie B. 2007. Domestication and crop physiology : roots of green-evolution wheat. *Annals of Botany* 100:991-998.
- Weisshaar B., Dohm J.C., Minoche A., Schulz B., Kraft T., Wolf M., Holtgraeve D., Himmelbauer H., 2011. The draft genome sequence of sugar beet (*Beta vulgaris*). Abstracts of the Plants and Animals Genome XIX Conference, San Diego (CA), January 15-19: W563.
- Zheng B.S., Yang L., Zhang W.P., Mao C.Z., Wu Y.R., Yi K.K., Liu F.Y., Wu P. 2003. Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water supply conditions and comparative analysis across three populations. *Theoretical and Applied Genetics* 107:1505-1515.

PASSIFLORE ORNAMENTALI*

Responsabile Scientifico: Dott.ssa Annalisa Giovannini e collaboratori Dott.ssa Laura De Benedetti, Dott.ssa Federica Nicoletti, Dott. Fulvio Dente, Sig. Pasquale Casella, Sig. Sergio Ariano

CRA-FSO Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali
Corso Inglesi, 508 – 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

Il genere *Passiflora* (Tribù Passiflorae, Famiglia Passifloraceae) comprende più di 560 specie di piante rampicanti legnose, distribuite principalmente in Centro e Sud America. Alcune specie erano già note alla cultura Azteca per le loro proprietà curative, mentre altre erano diffuse fra le popolazioni native americane per il dolce sapore dei loro frutti (frutto della passione). I primi missionari in Sud America riconobbero nella morfologia del fiore delle passiflore i segni della Passione di Cristo, che per questa ragione venne chiamato dagli spagnoli 'La flor del las cinco llagas' (il fiore delle cinque piaghe). Il fiore è caratterizzato da una corona formata da una serie di filamenti dai colori brillanti, cinque sepali dai colori vivaci nella pagina superiore, con il margine che termina con uno sperone appuntito, cinque petali ed un prominente androginofo. Arrivate in Europa solo dopo la scoperta dell'America, le passiflore sono state oggetto di un'intensa attività di miglioramento genetico, grazie soprattutto alla loro elevata attitudine all'incrocio interspecifico. Presso l'Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, a partire dal 2007 è stata allestita una collezione comprendente 41 specie, varietà ed ibridi registrati. Le piante sono coltivate in vaso, in una serra riscaldata con lo scopo di costituire una collezione di germoplasma che sia fonte di materiale propagativo per il mondo produttivo e per la ricerca di base ed applicata. Le accessioni sono state caratterizzate utilizzando 19 descrittori morfologici e fenologici, alcuni genotipi sono stati moltiplicati *in vitro* e una prima analisi molecolare è stata intrapresa utilizzando marcatori molecolari.

Summary

The genus *Passiflora* (Tribe Passiflorae, Family Passifloraceae) consists of more than 560 species of vines, lianas and small trees widespread in Central and South America. Some species were already known in the Aztec culture for their medicinal properties, other species were diffused among the Native Americans for the sweet taste of their fruits (passion fruits). The European missionaries recognised the symbols of the Christ Passion in the striking flower and called it "La flor del las cinco llagas". Passion flowers exhibits several unique floral features including multiple series of brightly coloured corona filaments, diverse operculum morphology, a prominent androgynophore and elaborate nectary structures. Moreover, flowers are surrounded by coloured sepals and variegated bracts. Due to their exotic features and the wide inter and intraspecific variability, passion flowers have a great commercial potential in the floriculture market. A "Passion flower collection" including twenty-six wild species, belonging to the subgenera *Passiflora* and *Decaloba*, and fifteen registered hybrids, was established at Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Sanremo (NW-Italy). The plants were cultivated in pots in a warm greenhouse with the aim of collecting genetic resources available both for researchers and for flower growers. Each species or hybrid was classified according to nineteen morphological and phenological descriptors. Micropropagation was established for elite genotypes and a molecular characterization using molecular markers was attempted. Crossbreeding among accessions was performed as well to produce new hybrids with improved ornamental value as pot plants.

Parole chiave: Fiore della passione, colture *in vitro*, marcatori molecolari, ibridi interspecifici, descrittori morfologici, numero cromosomico

Keywords: Passionflower, *in vitro* culture, molecular markers, interspecific hybrids, morphological descriptors, chromosome number

* doi:10.4458/0986-60

1.1 Breve descrizione del genere botanico

Il genere *Passiflora* è relativamente poco conosciuto nella sua complessità e varietà di specie presenti in natura. La pianta che nel linguaggio comune è chiamata 'passiflora' appartiene al Regno Plantae, Ordine Violales, Classe Magnoliopsida, Famiglia Passifloraceae. Quest'ultima è a sua volta suddivisa in tre Tribù: Passifloreae, Paropsiae e Abatieae. Nella Tribù Passifloreae sono presenti 10 generi: *Adenia* (97 specie), *Ancistrothyrsus* (2 specie), *Basanthé* (33 specie), *Crossostemma* (1 specie), *Deidamia* (5 specie), *Dilkea* (3 specie), *Efulensia* (2 specie), *Hollrungia* (1 specie), *Mitostemma* (3 specie), *Passiflora* (563 specie), *Schlechterina* (1 specie) (Vecchia e Giovannini, 2011).

1.1.1 Caratteristiche morfologiche

Le passiflore sono piante rampicanti legnose o erbacee perenni, caratterizzate da foglie dalle forme e colori diversi e da eleganti viticci ascellari, che si protendono verso l'alto per poi avvolgersi a spirale attorno ad un supporto adatto. Il fusto ha sezione cilindrica o poligonale a tre o più lati. Le piante possono essere glabre, oppure tutte o in parte, coperte da una fitta peluria. Lungo il fusto, ai nodi, sono presenti delle stipule, che si differenziano a seconda del gruppo di appartenenza della pianta: possono essere a margine intero o dentato ed avere forma intera o lobata. Le foglie sempre alterne, sono uno degli elementi di maggior interesse e di grande valore decorativo. La superficie può essere glabra vellutata o tomentosa. Il peduncolo florale nasce dall'ascella fogliare e porta generalmente un unico fiore, tranne rare eccezioni, come la *P. racemosa*, in cui i fiori sono disposti a grappolo (Sgaravatti e Zardini, 1997). Le brattee sono presenti in quasi tutte le specie ed hanno forme molto diverse: nella *P. palmeri* var. *sublanceolata* hanno l'aspetto di un pizzico. La posizione delle brattee sul peduncolo, la loro forma e la loro dimensione sono importanti per la classificazione. La morfologia del fiore è particolare: il calice può essere piatto, a coppa, campanulato o cilindrico, la corolla è costituita da cinque sepali, che nella pagina inferiore hanno lo stesso colore del calice, mentre presentano colori vivaci in quella superiore, il margine spesso presenta un bordo carenato che termina con uno sperone più o meno lungo e appuntito; anche i petali sono cinque, ma spesso sono più piccoli dei sepali e hanno uno spessore inferiore. La corolla si può disporre perpendicolarmente o parallelamente al peduncolo, a seconda delle specie. All'interno del perianzio (insieme di calice e corolla) si trova la corona formata da una serie di filamenti, da cortissimi a più lunghi dei petali, striati o bandeggiati, disposti ad anelli circolari concentrici o fusi fra loro a formare un tubo, la cui forma e colore sono in relazione al sottogenere di appartenenza della specie (Foto 1.1). Tale struttura è unica nel regno vegetale e rende la



fioritura particolarmente appariscente e vistosa. Gli accostamenti cromatici sono molto contrastati, con tinte complementari poste sulla corona e sulla corolla, gradazioni di violetto e di blu sfumanti verso il bianco puro, alternanze di rosa e di viola, di rosso e di bianco, di bianco e di cupo violetto e petali che si vestono di un bianco purissimo, come di un rosso scarlatto. Si tratta sicuramente di uno dei fiori più belli del mondo vegetale (Vecchia, 2009).

Foto 1.1 Fiore della *Passiflora mayarum* J.M. Mac Dougal, originaria del Belize (America centrale istmica).

1.1.2 Distribuzione geografica

Il genere *Passiflora* è distribuito in gran parte nel continente americano, dal sud degli Stati Uniti al nord del Cile ed Argentina. Vi sono poche specie di passiflore in Australia, una in Nuova Zelanda ed una ventina nell'estremo oriente (Cina, Cambogia, Vietnam, ecc.). Alcune specie sono utilizzate nell'industria degli alimenti per il sapore dolce dei frutti (*P. edulis* 'granadilla' o 'maracuja' o 'yellow passionfruit'; *P. alata* 'sweet passionfruit'; *P. mollissima* 'banana passion flower'). Su una giara di ceramica appartenente alla cultura Moche, del nord del Perù, esposta al museo Larco a Lima, datata intorno al quinto secolo d.C., è rappresentato il frutto della *P. mollissima*. Altre sono conosciute per le proprietà medicinali, sedative ed antidepressive (*P. incarnata* 'passion vine'; *P. caerulea* 'blue passionflower'). Sono stati ritrovati semi di *Passiflora* in siti archeologici in Virginia e Nord America, avvalorando l'ipotesi dell'uso del frutto fra i pellerossa d'America (Dhawan *et al.*, 2004).

1.1.3 Note storiche

Le Passiflore sono state scoperte dagli Europei in Sud America durante i viaggi successivi alla spedizione di Cristoforo Colombo. Nel 1553 Pedro Cieza de León in "Parte Primera de la Crònica del Perù" descrive la profumata 'granadilla' (piccola melagrana), situata vicino al villaggio di Lile in Colombia. Nicolas Monardes nel 1554 pubblica un manoscritto sulle proprietà medicinali delle Indie Occidentali con una piccola sezione sulla 'granadilla'. Francisco Hernández, fisico personale del Re Filippo II di Spagna, dal 1570 al 1577 viaggia nelle Americhe alla ricerca di nuovi medicinali. Nel 1651 nel suo manoscritto descrive una pianta della supersezione *Cieca*, la *Passiflora sexocellata* Schldl., alla quale assegna il nome Azteco "Tzinacanatlapatli" e riporta che gli Aztechi usavano il succo delle foglie per curare patologie agli occhi. Charles Plumier nel 1693 descrive e illustra quattro specie della supersezione *Cieca* la *P. suberosa* e la *P. pallida*. Joseph Pitton de Tournefort nel 1719 crea due nuovi generi: *Granadilla* con 23 specie e *Murucuja* con una specie dai filamenti della corona fusi fra loro. Nel 1753 nel libro *Species Plantarum* di Linneo è per la prima volta descritto il genere *Passiflora* con 24 specie (Porter-Utley, 2003). I primi missionari intravidero nella morfologia di questo fiore i segni della Passione di Cristo e per questa ragione venne chiamato dagli spagnoli 'La flor del las cinco llagas' (il fiore delle cinque piaghe). Il Cavaliere e Commendatore dell'Ordine di Malta Giacomo Bosio (1544-1627) ha descritto questa simbologia nel trattato "La trionfante e gloriosa croce Trattato di Iacomo Bosio Lettione varia, e divota; Ad ogni buon Cristiano utile, e gioconda", pubblicato a Roma nel 1610 (Bosio, 1610). I caratteristici filamenti "a modo d'una frangia, di color di sangue" simboleggiano le sferze utilizzate contro Gesù Cristo. L'androginofo, che sorregge l'ovario, diventa la colonna della flagellazione, i tre stigmi a forma di chiodo i chiodi della crocifissione, mentre le cinque antere intrecciate fra loro richiamano la corona di spine. Le macchiette di color sanguigno presenti nell'operculum (calice) accennano alle cinque ferite inferte al Cristo sulla croce e la forma della foglia appuntita come "un ferro di Picca" ricorda la lancia con la quale è stato trafitto il costato di Gesù Cristo (Vecchia e Giovannini, 2011).

1.1.4 Riproduzione

L'apparato riproduttivo è situato in cima al lungo androginofo e sporge molto al di sopra della corolla. Le cinque antere, spesso basculanti, sono sorrette da cinque filamenti, l'ovario è di forma tondeggiante e generalmente si trovano tre stili e tre stimmi (Foto 1.2).

Le passiflore sono impollinate da numerose specie di insetti. Alcune passiflore a fioritura notturna, sempre di colore bianco puro, sono impollinate invece da piccoli pipistrelli. Le loro antere sono rivolte tutte nella stessa direzione per poter deporre il polline sulla schiena di questi mammiferi volanti (Buzato e Franco, 1992). Alcune passiflore, dal calice lunghissimo, hanno instaurato proficue relazioni con i colibrì dal lungo becco. Altre peculiari strutture morfologiche delle passiflore sono le piccole ghiandole, dette nettari, che secernono nettare per attirare gli insetti. Le ghiandole si possono trovare sul picciolo, in coppie, sul margine delle brattee, sulle stipole o sulla pagina inferiore della foglia. La diversa disposizione e forma delle ghiandole serve a distinguere i sottogeneri e le specie. Molte specie, appartenenti al sottogenere *Decaloba*, hanno numerosi nettari anche sulle foglie, allineati lungo le nervature principali in file ordinate. A volte sono di colore contrastante, giallo o verde chiaro così da mimare uova di farfalla appena deposte. L'ovario dopo essere stato fecondato produce una bacca globosa, che racchiude i semi immersi in un arillo gelatinoso, in genere commestibile. Le dimensioni dei frutti oviformi e colorati vanno da pochi millimetri di diametro (*P. suberosa*,

sottogenere *Decaloba*), fino a 15 cm (*P. macrocarpa*, sottogenere *Passiflora*). I semi di passiflora hanno forma appiattita con una estremità appuntita contrapposta ad un'altra più tondeggiante. Ve ne sono di più o meno ellittici, oppure cuoriformi. Sono rivestiti da un



tegumento durissimo, nero e lucido, che ha quasi sempre rilievi caratteristici, trasversali, reticolati, punteggiati o butterati (Foto 1.3). Hanno una buona resistenza ed il periodo di vitalità è sempre piuttosto lungo, poiché sopportano bene situazioni di disseccamento. Si può dire che ogni specie abbia semi di forma caratteristica e che dal seme si possa intuire quale è la specie di provenienza. Le loro dimensioni sono sempre contenute e variano da meno di 1 millimetro a 5-6 mm in quelli più grandi (Vecchia, 2006).

Foto 1.2 Fiore di *P. ametistina* J. C. Mikan, coltivata in serra.

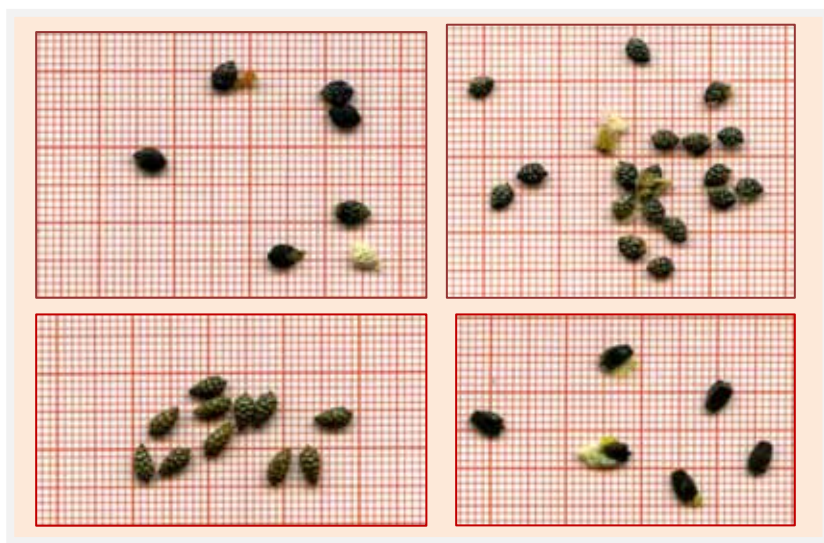


Foto 1.3 Semi di passiflora. Partendo dall'alto a sinistra: *P. 'Clara Luna'* x *P. edmundoi*, *P. cinnabarrina* open; *P. 'La Veneziana'* x *P. watsoniana* e *P. foetida* var. *hastata* x *P. 'Hybrid n.2'*.

1.1.5 Classificazione

Ellsworth P. Killip, nel 1938 pubblicò un testo fondamentale *'The American Species of Passifloraceae'* raggruppando nel genere *Passiflora* anche piante allora ascritte a generi diversi come *Decaloba*, *Tacsonia*, *Tetrapathea*, *Dysosmia* ed altri. Rendendosi conto tuttavia della sua complessità e vastità, suddivise il genere in 22 *'Sottogeneri'*, a loro volta ulteriormente suddivisi in *'Sezioni'* e *'Serie'* in base a caratteristiche morfologiche simili. Questa classificazione rimase in vigore fino al 2004 quando Feuillet e MacDougal operarono una revisione completa del genere *Passiflora*. In questa classificazione, basata su caratteri morfologici, i sottogeneri sono stati ridotti a 4: *Astrophea* (57 specie), *Deidamioides* (13 specie), *Decaloba* (214 specie) e *Passiflora* (236 specie), accorpando in 16 supersezioni alcuni sottogeneri di Killip. Le supersezioni *Astrophea* e *Pseudoastrophea* sono comprese nel sottogenere *Astrophea* (DC) Masters, *Pterosperma*, *Haniopathanthus*, *Disemma*, *Multiflora*, *Auriculata*, *Cieca*, *Bryonioides* e *Decaloba* sono presenti nel sottogenere *Decaloba* (DC) Rchb. e le supersezioni *Passiflora*, *Stipulata*, *Laurifolia*, *Coccinea*, *Distephana* e *Tacsonia* rientrano nel sottogenere *Passiflora*. La prima caratterizzazione molecolare del genere *Passiflora* (Muschner et al., 2003), ha utilizzato i marcatori ribosomiali nucleari ITS-1 e ITS-2 ed il marcatore

plastidico *trnLF* ed ha in parte confermato la divisione nei sottogeneri proposta da Feuillet e MacDougal. Anche il lavoro di Yockteng e Nadot (2004) supporta l'origine monofiletica dei quattro sottogeneri, ma gli autori propongono di includere in *Passiflora* anche i tre sottogeneri *Polyanthea* (DC.) Killip, *Dysosmia* (DC.) Killip e *Tetrapathaea* (DC.) Rchb.

1.2 Collezione di passiflore ornamentali allestita presso il CRA-FSO

Presso l'Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, a partire dal 2007, è stata allestita una collezione comprendente specie di *Passiflora* e ibridi interspecifici, provenienti da diverse aree geografiche e dal collezionista privato Dott. Maurizio Vecchia (Vecchia M., 2012). La collezione si colloca nell'ambito del progetto 'Risorse Genetiche vegetali', finanziato dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, derivante dall'attuazione del trattato internazionale della FAO sulla conservazione di germoplasma vegetale di interesse agrario. Scopo del progetto è la costituzione e/o l'ampliamento di collezioni di piante ornamentali volte a costituire sia una risorsa di germoplasma per la ricerca di base e applicata (tra cui il miglioramento genetico), sia una fonte di materiale propagativo disponibile per il mondo produttivo e per scambi tra istituti di ricerca anche in ambito internazionale.

1.2.1 Modalità di mantenimento

Piante di un anno, ottenute da seme o da talea, sono state coltivate in una serra ombreggiata nel periodo estivo e con una temperatura minima in inverno di $9 \pm 2^\circ\text{C}$, in vasi di 30 cm, contenenti terriccio pomicino. Ai vasi veniva applicato un supporto in plastica per consentire l'avvolgimento dei viticci. Le piante sono state concimate tramite fertirrigazione (NPK 15:5:25 e Mg 2) quindicinale, mentre i trattamenti contro il ragno rosso sono stati effettuati utilizzando l'antagonista *Amblyseius californicus* e una miscela di acaricidi (Floramite 240 e Borneo).

1.2.2 Coltura *in vitro*

Le colture *in vitro* sono state applicate a quelle accessioni particolarmente pregiate e delicate. L'utilizzo di segmenti nodali, come espunti di partenza per la coltura *in vitro*, si è mostrato problematico dal punto di vista della sterilizzazione in quasi tutte le passiflore saggiate, con elevata percentuale di contaminazione ed è stato perciò scartato. La rigenerazione è avvenuta direttamente a partire da viticci in *P. trifasciata*, *P. 'Guglielmo Betto'* e *P. 'Manta'*. Per queste passiflore la messa in coltura di fiori immaturi ha invece prodotto solo callo. I germogli di *P. foetida* var. *hastata* sono rigenerati sporadicamente da callo organogenico ottenuto a partire da fiori immaturi. Nella passiflora *P. 'Allardii'* si sono ottenuti rigeneranti sia a partire da viticci che da fiori immaturi, nel caso di quest'ultimi, si è passati tramite una fase di abbondante produzione di callo organogenico. Tra i diversi mezzi di rigenerazione utilizzati, il migliore è risultato il terreno MS (Murashige e Skoog, 1962) arricchito con acido 3-indoloacetico (IAA) $11.41 \mu\text{M}$ e 6-benzilaminopurina (BAP) $4.43 \mu\text{M}$, sia per percentuale che per la qualità dei rigeneranti (Pipino *et al.*, 2008, 2010). Le condizioni di moltiplicazione e radicazione *in vitro* ed il successivo ambientamento di *P. foetida* var. *hastata*, *P. trifasciata*, *P. 'Guglielmo Betto'* e *P. 'Manta'* sono stati descritti in Braglia *et al.* (2010).



Foto 1.4 Micropropagazione di *P. foetida* var. *hastata* (Bertol.) Mast.

Per quanto riguarda *P. x allardii*, l'allungamento e la radicazione dei germogli sono stati ottenuti sul terreno di coltura MS - Shoot multiplication medium B (Duchefa), addizionato di BAP $1,33 \mu\text{M}$ (De Benedetti *et al.*, 2011a). La messa a punto dei protocolli *in vitro* per alcune specie e ibridi di *Passiflora* ha permesso di stabilire le condizioni per il mantenimento delle

qualità specifiche delle piante madri, utilizzabili nella propagazione di ibridi sterili e/o genotipi superiori.


1.3 Caratterizzazione e valorizzazione della collezione

In Italia, le passiflore sono ancora poco conosciute e sfruttate nell'ambito floricolo, pur avendo caratteristiche uniche e molto appetibili per il settore ornamentale: l'enorme quantità di specie, spesso incrociabili fra di loro, la peculiarità di un apparato riproduttivo appariscente fra i più belli del mondo vegetale, la varietà di forme e di colori delle foglie e dei fiori che si possono osservare negli ibridi, la rusticità e la capacità di rapida crescita delle piante. Le passiflore risultano quindi di particolare interesse per un utilizzo ornamentale sia come prodotti da vaso fiorito che da giardino (Giovannini e Vecchia, 2011).

1.3.1 Descrittori morfo-fisiologici

Per la caratterizzazione delle accessioni, sono stati scelti ed utilizzati i seguenti 19 descrittori morfologici e fenologici: forma, lunghezza e variegatura delle foglie; numero di ghiandole del picciolo fogliare; presenza e colore delle brattee; presenza dei peli ghiandolari sulle brattee; lunghezza dell'androginofo; colore pagina superiore ed inferiore dei sepali; dimensione corolla; colore pagina superiore ed inferiore dei petali; portamento dei petali; colore e forma della corona dei filamenti; periodo di fioritura; dimensione, forma e colore dei frutti. La caratterizzazione delle accessioni di *Passiflora*, effettuata tramite i descrittori morfo-fisiologici, ha permesso il chiaro riconoscimento delle specie e degli ibridi. L'elenco dei descrittori ha inoltre reso possibile riassumere le principali caratteristiche biologiche della pianta, fornendo indicazioni di base per un possibile sfruttamento economico (De Benedetti et al., 2011b). Nelle tabelle sono riportate la foto del fiore, il nome, il sottogenere, il Paese di origine, la temperatura minima di coltivazione, la fioritura e il diametro della corolla di alcune specie (Tab. 1.1) e ibridi (Tab. 1.2) presenti in collezione. Per gli ibridi sono indicate il nome, l'autore, la specie utilizzata come madre e la sua temperatura minima di coltivazione, la specie utilizzata come padre e la sua temperatura minima di coltivazione, la temperatura minima di coltivazione dell'ibrido, l'epoca della fioritura ed il diametro della corolla in antesi.

Tabella 1.1 Per alcune specie presenti nella collezione del CRA-FSO sono indicate il nome, il sottogenere secondo la classificazione MacDougal (2004), il paese di origine, la temperatura minima di coltivazione, l'epoca della fioritura ed il diametro della corolla in antesi.

	Nome	Classificazione MacDougal 2004 (Sottogenere)	Paese di origine	Temperatura minima di coltivazione	Fioritura	Corolla (diametro in cm)
	<i>P. coccinea</i> Aubl.	<i>Passiflora</i>	Bolivia	12°C	fioritura tardiva (autunno-inverno)	molto larga (ø > 10 cm)

Passiflore ornamentali



P. edmundoi
Sacco

Passiflora

Brasile

10°C

fioritura
precoce
(primavera)

larga (ø =
7-9 cm)



P. elegans
Mast.

Passiflora

Argentina

7°C

fioritura
precoce
(primavera)

media (ø =
4-6 cm)



P. manicata
(Juss.) Pers.

Passiflora

Equador

5°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

molto larga
(ø > 10
cm)



P. mucronata
Lam.

Passiflora

Brasile

10°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

larga (ø =
7-9 cm)



P.
sublancheolata
J.M.
MacDougal

Passiflora

Messico,
Guatemala

4°C

fioritura
precoce
(primavera)

larga (ø =
7-9 cm)



P. phoenicea
Lindl. (o *P.*
alata 'Ruby
Glow')

Passiflora

Perù

10°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

molto larga
(ø > 10
cm)

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura



P. watsoniana
Mast

Passiflora

Brasile

10°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

larga (ø =
7-9 cm)



P. boenderi
J.M.
MacDougal

Decaloba

Costa Rica

10°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

piccola (ø
< 4 cm)



P. cinnabarina
Lindl.

Decaloba

Australia

7°C

fioritura
media
(estate)

media (ø =
4-6 cm)



P. citrina J.
M.
MacDougal

Decaloba

Honduras

5°C

fioritura
media
(estate)

media (ø =
4-6 cm)



P. coriacea
Juss.

Decaloba

Colombia

5°C

fioritura
precoce
(primavera)

piccola (ø
< 4 cm)



P. costaricensis
Killip

Decaloba

Costa Rica,
Guatemala

10°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

piccola (ø
< 4 cm)

Passiflore ornamentali



P. murucuja
L.

Decaloba

Repubblica
Domenicana

12°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

media (Ø =
4-6 cm)



P. trifasciata
Lem.

Decaloba

Perù

5°C

fioritura
precoce
(primavera)

media (Ø =
4-6 cm)



P. tulae Urb.

Decaloba



Porto Rico,
Antille

10°C

fioritura
tardiva
(autunno-
inverno)

media (Ø =
4-6 cm)

Tabella 1.2 Per gli ibridi interspecifici presenti nella collezione del CRA-FSO sono indicate il nome, l'autore, la specie utilizzata come madre e la sua temperatura minima di coltivazione, la specie utilizzata come padre e la sua temperatura minima di coltivazione, la temperatura minima di coltivazione dell'ibrido, l'epoca della fioritura ed il diametro della corolla in antesi.

	Nome	Autore	Madre	Padre	T minima di coltivazione	Fioritura	Corolla (diametro in cm)
	<i>P.</i> 'Amethyst'	Autore sconosciuto	<i>P. caerulea</i> -15°C	<i>P. kermesina</i> 10°C	0/1°C	fioritura media (estate)	molto larga (Ø > 10 cm)
	<i>P.</i> 'Caprice'	M. Vecchia	<i>P. kermesina</i> 10 °C	<i>P. tucumanensis</i> -10°C	0°C	fioritura media (estate)	media (Ø = 4-6 cm)

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura



P. 'Clara Luna'

M. Vecchia

P. caerulea
'Constance Elliott'
-15°C

P. eichleriana
7°C

- 6°C

fioritura precoce (primavera)

larga (Ø = 7-9 cm)



P. 'Coral sea'

P. Worley

P. manicata
5°C

P. manicata
5°C

1°C

fioritura tardiva (autunno-inverno)

molto larga (Ø > 10 cm)



P. 'Fata Confetto'

M. Vecchia

P. 'Guglielmo Betto'
7°C

?
-15°C

-10°C

fioritura media (estate)

larga (Ø = 7-9 cm)



P. 'Guglielmo Betto'

M. Vecchia

P. incarnata
-15°C

P. tucumanensis
-10°C

-7°C

fioritura precoce (primavera)

media (Ø = 4-6 cm)



P. 'La Venexiana'

M. Vecchia

P. edmundoi
10°C

P. caerulea
'Pierre Pomié'
-15°C

0°C

fioritura precoce (primavera)

larga (Ø = 7-9 cm)



P. 'La Lucchese'

M. Vecchia

P. 'Fata Confetto'
-10°C

P. kermesina
10 °C

2°C

fioritura precoce (primavera)

molto larga (Ø > 10 cm)

Passiflore ornamentali



P. 'Manta'

M. Vecchia

P. xii kzodz
15°C

P. coriacea
5°C

8°C

fioritura
precoce
(primav
era)

piccola (ø
< 4 cm)



P. 'Thuraia'

M. Peixoto

P.
kermesina
10 °C

P. miersii
10°C

5°C

fioritura
media
(estate)

larga (ø
= 7-9
cm)



P.
'Vivacemente'

M. Vecchia

P.
incarnata
f. alba
-15°C

P.
cincinnata
'Dark
Pollen'
12°C?

- 6°C
Rustica

fioritura
precoce
(primav
era)

molto
larga (ø
> 10 cm)



P. 'Hybrid
n.2'

A.
Giovannini

P.
*sublanceol
ata*
4 °C

P. foetida
var.
hastata
10°C

5°C

fioritura
precoce
(primav
era)

larga (ø
= 7-9
cm)



P. x allardii

Lynch

P.
*quadrangul
aris*
12 °C

P. caerulea
'Constance
Elliott'
-15°C

7°C

fioritura
precoce
(primav
era)

molto
larga (ø
> 10 cm)



P. x belotii

Pèpin

P. alata
5°C

P. caerulea
-15°C

10°C

fioritura
precoce
(primav
era)

molto
larga (ø
> 10 cm)



<i>P. x colvillii</i>	Sweet	<i>P. incarnata</i> -15°C	<i>P. caerulea</i> -15°C	-12°C	fioritura precoce (primavera)	larga (Ø = 7-9 cm)
<i>P. x colvillii</i> 'Clara'	M. Vecchia	<i>P. incarnata</i> -15°C	<i>P. caerulea</i> 'Constance Elliott' -15°C	-15°C	fioritura precoce (primavera)	larga (Ø = 7-9 cm)

1.3.2 Caratterizzazione molecolare

Per la caratterizzazione del germoplasma vegetale, oltre all'analisi del fenotipo mediante descrittori morfologici e fisiologici, si può affiancare quella della "impronta genetica" con l'analisi del DNA. Si tratta di utilizzare marcatori molecolari che producono un profilo molecolare specifico e che, per poter essere convenientemente utilizzati, devono avere alto grado di polimorfismo, facilità d'uso, ripetibilità del sistema ed economicità dello stesso (Powell *et al.*, 1996). È stata verificata l'efficacia della tecnica ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) per la caratterizzazione molecolare di alcune accessioni di passiflore presenti nella collezione del CRA-FSO (Nicoletti *et al.*, 2012). I marcatori ISSR consistono nell'amplificazione di regioni genomiche comprese tra sequenze di DNA microsatellite ripetute e invertite mediante l'uso di un singolo primer (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Essi presentano diversi vantaggi rispetto ad tipi di analisi molecolari: non sono richieste informazioni sulla sequenza del genoma, la tecnica è abbastanza semplice, i prodotti ottenuti mostrano solitamente profili elettroforetici multilocus polimorfici. Gli ISSR si sono già mostrati strumenti efficaci per la risoluzione di problemi di sistematica e di ibridazione in numerose specie, nonché per la determinazione delle distanze genetiche in *Passiflora edulis* e *Passiflora alata* (dos Santos *et al.*, 2011). I marcatori ottenuti hanno permesso di discriminare 23 su 26 specie totali analizzate. La *Passiflora coccinea* non ha fornito alcun prodotto di amplificazione mentre per le specie *P. luzmarina* e *P. manicata* è stata ottenuta un'unica banda di uguale peso molecolare. Per tutti i rimanenti campioni il numero di bande conteggiate variava da 2 a 5. Bandeggi differenti sono stati osservati tra la specie *P. caerulea* e la sua varietà *P. caerulea* 'Constance Elliott'. È stato possibile inoltre discriminare tutti i 14 ibridi interspecifici presi in esame. In particolare, per quanto riguarda i tre ibridi *P. x belotii*, *P. x colvillii* e *P. x colvillii* 'Clara', di cui è stato analizzato contemporaneamente il profilo ISSR dei genitori, è stato possibile confermare la condizione ibrida: essi hanno infatti mostrato bande caratteristiche di entrambi i genitori.

I risultati ottenuti possono già essere utilizzati per una prima caratterizzazione molecolare della collezione di passiflore del CRA-FSO, come integrazione dei descrittori fenotipici e come riferimento in programmi di miglioramento genetico.

1.3.3 Valorizzazione per il miglioramento genetico

Nella realizzazione di un programma di miglioramento genetico che prevede la tecnica dell'ibridazione interspecifica è importante conoscere il numero cromosomico delle specie da incrociare fra di loro. Il numero cromosomico di alcune accessioni è stato analizzato utilizzando il protocollo di analisi citologica messo a punto dalla Prof.ssa Sonja Siliak Yakolvlev (2012). Il tessuto migliore è rappresentato da apici radicali di giovani radici in attiva crescita (1-2 cm). Le radici sono prelevate dalle piante alle undici del mattino e sottoposte ad un pretrattamento in 8-idrossichinolina (0,002 M) a 16°C per 3 ore o in colchicina (0,05%) a temperatura

ambiente per circa 2 ore e 30 minuti. I tessuti pretrattati sono fissati in Carnoy (etanolo: acido acetico, 3:1 v/v), fatto al momento dell'uso e riposti in frigorifero per almeno una notte. Segue la colorazione in reattivo di Schiff delle radici fissate ed idrolizzate in HCL 1 N a 60°C. Il tempo di idrolisi (da 10 a 30 minuti) è ottimizzato per ogni specie. Lo schiacciamento degli apici è effettuato in una goccia di acido carminio acetico sul vetrino portaoggetti, utilizzando la parte posteriore di un fiammifero di legno. Gli apici si osservano al microscopio ottico (100x) per la localizzazione delle piastre metafasiche. Il numero cromosomico dell'incrocio *P. 'Clara Luna* x *P. 'Thuraia'* è risultato essere quello atteso di 18.

Per il successo di un incrocio è utile conoscere la vitalità del polline della specie utilizzata come padre. La morfologia e le dimensioni dei granuli pollinici di alcune accessioni sono stati osservati al microscopio ottico (100x). La vitalità del polline è stata determinata al microscopio ottico con luce fluorescente (eccitazione con luce blu, lampada al mercurio 100W) in una goccia con 100 µl di FDA (5 mg di diacetato di fluoresceina sciolti in 1 ml di acetone, in 5 ml in acqua distillata) o con calceina AM (Uggeri et al., 2004), conservata in DMSO (500 µM) ed utilizzata alla concentrazione finale di 10µM. Se il granulo pollinico è vitale, gli enzimi presenti nel citoplasma liberano le molecole fluorescenti, colorando il polline (Shivanna e Heslop-Harrison, 1981). La capacità germinativa del polline è stata analizzata su un substrato artificiale costituito da H₃BO₃ 40 mg/l, CaCl₂(H₂O) 152 mg/l, saccarosio 150 g/l e agar 7 g/l con un pH di 5.6. Il polline si sparge sulla piastra Petri contenente il terreno con un pennello. La germinazione si valuta al microscopio ottico dopo 24h alla temperatura di 22-24°C, al buio. Il polline si considera germinato quando il tubetto pollinico è lungo una volta e mezzo il suo diametro. Applicando questa tecnica alle piante presenti in collezione è stato possibile identificare alcune specie 'molto fertili' (*P. caerulea*, *P. watsoniana*, *P. 'Thuraia'*, *P. sublancoolata*, *P. foetida* var. *hastata*, *P. elegans*, *P. trifasciata*, *P. 'Clara Luna'*).

I dati acquisiti hanno permesso la realizzazione di un certo numero di incroci interspecifici fra specie appartenenti al sottogenere *Passiflora*. In particolare dall'incrocio *P. sublancoolata* x *P. foetida* var. *hastata* è stato ottenuto un ibrido vigoroso, con il fiore profumato di vaniglia e la corolla di 7 cm, denominato *P. 'Hybrid n.2'* (Giovannini et al., 2012).

1.4 Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Maurizio Vecchia per la preziosa collaborazione ed il materiale vegetale e la Dott.ssa Valeria Maria Leonardi, della Biblioteca Magistrale del Sovrano Militare Ordine Ospedaliero di San Giovanni di Gerusalemme di Rodi e di Malta, per averci fatto consultare la pubblicazione originale del 1610 del Cavaliere Giacomo Bosio.

1.5 Bibliografia

- Bosio G., 1610. La trionfante e gloriosa croce Trattato di Iacomo Bosio Lettione varia, e divota; Ad ogni buon Cristiano utile, e gioconda. Roma, Libro secondo, capitolo sesto, pp. 163-164.
- Braglia L., De Benedetti L., Giovannini A., Nicoletti F., Bianchini C., Pipino L., Mercuri A., 2010. *In vitro* plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. *Acta Horticulturae*, 855: 47-52.
- Buzato S., Franco A.L.M., 1992. *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 181:261-267.
- De Benedetti L., Giovannini A., Nicoletti F., Ballardini M., Bianchini C., Mercuri A., 2011a. Variabilità somaclonale in specie ed ibridi appartenenti al genere *Passiflora*. *Flortecnica* 5: 49-54.
- De Benedetti L., Nicoletti F., Ballardini M., Mercuri A., Giovannini A., 2011b. Le passiflore: risorse genetiche e ricerca applicata. *Informatore Botanico Italiano* 43, 1: 51-54.
- Dhawan K., Dhawan S., Sharma A., 2004. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 1-23.
- Dos Santos L.F., De Oliveira E.J., Dos Santos Silva A., De Carvalho F.M., Costa J.L., Padua J.G., 2011. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochem. Genet.*, 49(7-8):540-54.
- Killip E. P., 1938. The American species of Passifloraceae, Field Museum of Natural History, 19, Chicago (USA).
- Feuillet C., MacDougal. J. M., 2004. A new infrageneric classification of *Passiflora*. *Passiflora* 13: 34-38.

- Giovannini A., Vecchia M., 2011. *Ornamental passion flowers*. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, 73:107.
- Giovannini A., Dente F., De Benedetti L., Nicoletti F., Braglia L., Gavazzi F., Mercuri A., 2012. Interspecific hybridization in ornamental passion flowers. *Acta Horticulturae*, 953: 111-118.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*: 15:473-497.
- Muschner V. C., Lorenz A. P., Cervi A. C., Bonatto S. L., Souza-Chies T. I., Salzano F. M., Freitas L. B., 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 90: 1229-1238.
- Nicoletti F., Braglia L., De Benedetti L., Dente F., Ballardini M., Mercuri A., Giovannini A., 2012. Caratterizzazione molecolare di passiflore ornamentali. *Acta Italus Hortus*, Atti del 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione. Sanremo 7-9 novembre 2011, Numero 6: 241-244.
- Pipino L., Braglia L., Giovannini A., Fascella G., Mercuri A., 2008. *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. *Propagation of ornamental plants*, 8(1): 47-49.
- Pipino L., Braglia L., Giovannini A., Fascella G., Mercuri A., 2010. *In vitro* regeneration and multiplication of *Passiflora* hybrid 'Guglielmo Betto'. In: *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. S. Mohan Jain (ed.). ISBN: 9781603273909
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S.V., Rafalski A., 1996. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellites) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.*, 2:225-238.
- Porter-Utley K.E., 2003. Revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* supersection *Cieca* (Passifloraceae). A dissertation presented to the graduate school of the University of Florida for the Degree of Doctor of Philosophy, University of Florida.
- Sgaravatti M., Zardini P., 1997. *Passiflore*. (ed.) Edagricole Calderini, Coll. Le Gemme Verdi.
- Shivanna K. R., Heslop - Harrison J., 1981. Membrane state and pollen viability. *Annals of Botany* 47:759-770.
- Siljak-Yakovlev S., Peruzzi L., 2012. Cytogenetic characterization of the endemics: past and future. *Plant Biosystems*, 146(3): 694-702.
- Uggeri J., Gatti R., Belletti S., Scandroglio R., Corradini R., Rotoli B.M., Orlandini G., 2004. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochemical Cell Biology* 122:499-505.
- Vecchia M., 2006. Le passiflore amano un clima caldo, ma alcune resistono al gelo. *Vita in Campagna*, 7-8: 12-16.
- Vecchia M., 2009. Una collezione botanica cremasca: le passiflore. *Insula Fulcheria*, rivista annuale del museo di Crema, pp.162-191.
- Vecchia M., Giovannini A., 2011. Le passiflore: aspetti botanici. *Informatore Botanico Italiano* 43, 1: 47-50.
- Vecchia M., 2012. www.passiflora.it; online access.
- Yockteng R., Nadot S., 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*npsGS*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 379-396.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.

CARATTERIZZAZIONE BIOAGRONOMICA DI GERMOPLASMA DI AVENA (*AVENA SATIVA* L.) PER USI FORAGGERI*

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Anna Iannucci, e Pasquale Codianni

CRA–CER Centro di ricerca per la cerealicoltura
S.S. 16 Km 675 – 71122 Foggia

Riassunto

L'avena (*Avena sativa* L.) è una specie cerealicola ampiamente usata per l'alimentazione umana e animale. È ricca in metaboliti primari (es. proteine, carboidrati e fibre), come pure in molti composti secondari (es. frutto-oligosaccaridi). Una valutazione del germoplasma è stata effettuata per determinare la diversità genetica, utilizzando analisi uni- e multivariata, e per definire un ideotipo di avena per la produzione di granella e foraggio, adattato all'ambiente mediterraneo. Un totale di 109 genotipi sono stati studiati in condizioni di campo a Foggia (Sud Italia) in due stagioni di crescita (2008-2009 e 2009-2010). Le accessioni, caratterizzate per 13 caratteri bioagronomici, sono risultate molto diverse per i caratteri valutati. Una variabilità molto elevata è stata trovata per la produzione di seme e per la concentrazione di frutto-oligosaccaridi nella biomassa (CV = 37%). L'analisi delle componenti principali ha mostrato che i primi sei assi spiegano l'81% della variabilità. Le caratteristiche produttive e l'epoca di spigatura sono le principali fonti di diversità tra queste popolazioni di avena. L'analisi cluster ha identificato nove gruppi in base alle loro proprietà morfologiche e agronomiche. Le relazioni rilevate tra i caratteri esaminati possono aiutare a determinare quali gruppi di genotipi sono meglio adattati a specifiche condizioni ambientali e a identificare ideotipi per la costituzione di varietà per scopi diversi (cultivar per produrre seme o foraggio).

Summary

Oat (*Avena sativa* L.) is a cereal species widely used for human food and livestock feed. It is rich in primary metabolites (e.g., protein, carbohydrate, and fibre) as well as in many secondary compounds (e.g., fructo-oligosaccharides). A germplasm evaluation was carried out to determine the genetic diversity, using univariate and multivariate analyses, and to define an oat ideotype for grain and fodder production adapted to the Mediterranean environment. A total of 109 genotypes were studied under field conditions in Foggia (southern Italy) over two growing seasons (2008-2009 and 2009-2010). All of the accessions were characterised according to 13 bioagronomic traits. Accessions were very different for these evaluated traits, with wide variabilities found particularly for seed yield and fructo-oligosaccharide concentration (CV = 37%). Principal component analysis showed that the first six axes accounted for 81% of the variability. Productivity characteristics and heading time were the major sources of diversity among these oat populations. Clustering entries identified nine groups based on their morphological and agronomic properties. The relationships found among traits can help to determine which groups of genotypes are better adapted to specific environmental conditions and to identify ideotypes for developing varieties for different purposes such as for food or forage.

Parole chiave

Accessioni, analisi multivariata, *Avena sativa* L., ideotipo, variabilità

Keywords

Accessions, *Avena sativa* L., ideotype, multivariate analysis, variability

1 Introduzione

L'avena comune (*Avena sativa* L.) è utilizzata in tutto il mondo per la produzione umana ed animale, ed è frequentemente coltivata come coltura con duplice uso (raccolta della granella dopo il pascolamento o lo sfalcio a foraggio) (Suttie e Reynolds, 2004). Come coltura pura, o

* doi:10.4458/0986-64

anche associata con le più comuni leguminose annuali, l'avena è una delle principali foraggere e un componente importante nelle rotazioni agronomiche nei sistemi aziendali mediterranei (Corleto, 1987). Negli anni recenti vi è stato un rinnovato interesse verso questa coltura dovuto al suo valore agronomico e nutritivo, insieme all'aumento di popolarità nell'agricoltura biologica dovuta alla sua attitudine come coltura di copertura invernale nelle rotazioni no-till. Inoltre, la domanda di avena per il consumo umano è aumentata a causa dei benefici dietetici dimostrati dai prodotti integrali di avena (Food and Drug Administration, 1997). L'avena è considerata una fonte nutritiva di proteine, carboidrati, fibre, vitamine e minerali come pure di composti con effetti benefici sulla salute (es. polimeri del fruttosio e molecole antiossidanti) (Peterson e al., 2005).

In particolare, la granella di avena ha un'alta concentrazione di frutto-oligosaccaridi (FOS), carboidrati solubili costituiti da brevi catene di molecole di fruttosio (Redaelli e al., 2003). I FOS sono stati definiti "prebiotici" perché possono stimolare selettivamente la crescita e/o l'attività di un numero di batteri intestinali potenzialmente benefici per la salute e perché esplicano un ruolo essenziale in molti processi molecolari che hanno un impatto sulla biologia cellulare e sulla salute (Saksena e al., 1999). Recentemente, un nuovo approccio nella filiera foraggero-zootecnica ha suggerito che la composizione e la produzione di latte può essere influenzata dalla disponibilità e dalle caratteristiche dei carboidrati solubili nell'alimentazione degli animali (Leiva e al., 2000). Tuttavia, poco si sa circa la variabilità delle concentrazioni di FOS nella biomassa di cereali foraggeri.

Allo stato attuale, le stesse varietà di avena che vengono di solito utilizzate come foraggi sono utilizzate anche per la produzione di granella. I genotipi di avena sono stati selezionati per lo più per produzione elevata di seme e alto indice di raccolta, per resistenza ai parassiti e/o per tolleranza agli stress ambientali (Martinez e al., 2010). Tuttavia, le piante foraggere devono produrre grandi quantità di biomassa verde altamente digeribile per gli animali, devono avere elevata capacità di ricrescita dopo il taglio e devono essere resistenti alle malattie che possono limitare il rendimento nelle zone di produzione (Stevens e al., 2009). In questo contesto, è necessario definire un ideotipo d'avena che può essere coltivato in modo affidabile per la produzione di foraggio o di seme nelle aree mediterranee.

Il primo passo di un programma di miglioramento genetico è quello di determinare la quantità di variazione che è presente nei caratteri di importanza agronomica all'interno di una grande collezione di materiali al fine di selezionare le popolazioni utili per futuri programmi di breeding. La valutazione della variabilità genetica può essere saggiata utilizzando le misure morfologiche e la caratterizzazione fenotipica (Greene e al., 2008). La caratterizzazione bioagronomica, effettuata utilizzando metodi statistici appropriati, continua ad essere uno strumento utile per la descrizione iniziale e la classificazione delle collezioni di avena. Essa permette ai costitutori di identificare e selezionare risorse genetiche utili per un uso diretto da parte degli agricoltori, in programmi di breeding o per pianificare l'uso e la conservazione del germoplasma in modo efficiente (Achleitner e al., 2008; Rezai e Frey, 1990). La variazione genetica nel germoplasma per caratteri agronomici può essere sottoposta all'analisi multivariata (analisi delle componenti principali (PCA) e analisi cluster) per stabilire le relazioni tra le diverse accessioni.

Gli obiettivi di questo studio sono stati: (i) esplorare e quantificare la variazione genetica dei principali caratteri bioagronomici, (ii) analizzare il grado di somiglianza/dissomiglianza tra 109 accessioni di avena, utilizzando un approccio di statistica multivariata e (iii) definire gli ideotipi di avena per la produzione di granella o di foraggio adatti all'ambiente mediterraneo.

1.1 Materiali e metodi

Gli esperimenti sono stati effettuati durante le stagioni di crescita 2008-2009 e 2009-2010 presso il Centro di Ricerca per la Cerealicoltura di Foggia (Italia) (41°28' N, 15°34' E, 76 m s.l.m.). Le prove sono state eseguite su terreno argilloso (classificazione USDA) con le seguenti caratteristiche: 21% argilla, 43% limo, 36% sabbia, pH 8 (in H₂O), 15 mg kg⁻¹ di fosforo disponibile (metodo Olsen), 800 mg kg⁻¹ di potassio scambiabile (NH₄Ac) e 21 g kg⁻¹ di sostanza organica (metodo Walkey-Black). Le temperature massime e minime giornaliere, come le precipitazioni delle due stagioni di crescita sono state confrontate con le serie storiche (1955-2006). Tutti i dati climatici sono stati ottenuti da una stazione meteo in situ. Le

temperature massime e minime giornaliere sono state utilizzate per calcolare i gradi giorno (GDD) con una temperatura di base di 0°C.

Sono stati valutati un totale di 109 genotipi di diversa origine geografica appartenenti a cultivars antiche e moderne e a linee avanzate di breeding. È stato utilizzato un disegno sperimentale con un blocco completo randomizzato replicato una volta in ciascuno dei due anni di prova. Ciascuna parcella era di 10 m², con 8 righe di 7,5 m di lunghezza distanti 0,17 m; la semina è stata effettuata durante la seconda metà di novembre, con una densità di 350 semi m⁻². Una dose di 200 kg ha⁻¹ di fertilizzante 18/46 (18% N, 46% P₂O₅, in peso) è stata applicata alla semina. Durante l'accestimento le parcelle sono state concimate con 200 kg ha⁻¹ di NH₄NO₃ (26% N). Per il controllo delle infestanti, un erbicida è stato applicato ogni anno allo stadio di accestimento.

Nel corso del 2009, cinque piante per ciascun genotipo sono state raccolte, per la determinazione dei FOS, quando le prime due o tre spighe del 50% dei panicoli in ogni parcella erano emersi dalla guaina (stadio di crescita di Feekes, 10.1). Le piante sono state tagliate in piccoli pezzi e conservate immediatamente a -80°C fino al momento dell'analisi chimica. Un sub-campione di circa 100 g è stato essiccato in stufa sotto vuoto a 40°C per 48 h, pesato e macinato con un mulino (setaccio da 1 mm). Per la determinazione del contenuto di FOS (% peso secco) è stato utilizzato un metodo enzimatico (Megazyme, metodi AOAC 999.03 e 32,32 AACC). Per ciascuna parcella, in entrambi gli anni, sono stati determinati i seguenti caratteri: epoca di spigatura (HT; giorni dal 1° aprile), epoca di maturazione (MT; giorni dal 1° aprile) e periodo di riempimento (FP; giorni), come differenza tra la maturazione e la spigatura. La maturità fisiologica è stata rilevata quando il 50% dei panicoli di una parcella aveva perso l'80% della clorofilla (stadio di crescita di Feekes, 11.4).

Inoltre, alla maturazione, circa 210 giorni dopo la semina, è stata determinata la produzione di seme (SY; g m⁻²) sulle sei file interne di ciascuna parcella. L'altezza della pianta (PH; cm), il peso ettolitrico (ST; hL⁻¹ kg) e il peso 1000 semi (TSW; g) sono stati misurati in entrambi gli anni di valutazione. Nel corso del 2009, sono state determinate le componenti della produzione di seme su un metro lineare precedentemente rimosso dal centro di ogni parcella; le caratteristiche relative alle infiorescenze sono state determinate su 30 panicoli rappresentativi. I seguenti caratteri agronomici sono stati rilevati: densità delle piante (NP/m⁻²; no. m⁻²), densità di panicoli (NPa/ m⁻²; no. m⁻²), peso del seme per panico (SW/Pa; g) e numero di semi per panico (NS/Pa; no.). L'indice di raccolta (HI; %) è stato calcolato come il rapporto tra la produzione del seme e quella della pianta totale.

1.1.1 Analisi statistica

Le medie, l'errore standard, il coefficiente di variazione (CV; %) e il range per tutti i caratteri bioagronomici sono stati calcolati nelle due stagioni di crescita per l'intera collezione. Per ogni carattere, è stata effettuata un'analisi della varianza che include i genotipi come fattore fisso e gli anni come fattore casuale, l'interazione genotipo × anno è stata usata come termine di errore per l'effetto principale del genotipo. Inoltre, sono stati calcolati tutti i possibili coefficienti di correlazione tra i caratteri rilevati nel corso del 2009. Per studiare l'importanza dei diversi caratteri nel polimorfismo multivariato dei genotipi di avena, un'analisi PCA è stata sviluppata con il software STATISTICA (StatSoft versione 7.1 StatSoft, Inc., Tulsa, Okla, USA). I dati dei singoli caratteri sono stati standardizzati con una media pari a zero e la varianza di uno, per eliminare le differenze nella dimensione delle variabili (Sneath e Sokal, 1973).

Sei componenti principali sono state estratte determinando i relativi valori. L'analisi cluster è stata eseguita per misurare la somiglianza gerarchica tra i genotipi. Dai valori della PCA, è stata ricavata una matrice di distanza euclidea (Flores e al., 1997) per ottenere un relativo dendrogramma. Le accessioni sono state raggruppate secondo il metodo della varianza minima di Ward. La linea di soglia per il dendrogramma è stata tracciata dove il numero di cluster è pari a circa il 20% della distanza totale. I valori degli assi delle prime due componenti principali sono stati messi in grafico per facilitare la visualizzazione delle differenze delle accessioni. Inoltre, le popolazioni di avena sono state raggruppate arbitrariamente per produzione potenziale di seme come: alte (SY ≥ media + deviazione standard (SD)), medie (media - SD < SY < media + SD) o basse (SY ≤ media - SD) e per l'epoca di spigatura come: precoci (HT < tempo medio) o tardive (HT ≥ tempo medio).

1.2 Risultati

1.2.1 Dati meteorologici

Le condizioni meteorologiche per le due stagioni di crescita e le medie storiche, rilevate nella locale stazione meteo di Foggia, sono indicate nella Tabella 1. Gli anni di prova sono risultati molto simili per le temperatura medie massime e minime, per le precipitazioni totali e per i valori di GDD. Una differenza massima di 1.3°C è stata registrata dalla media di 52 anni, mentre entrambe le stagioni di crescita sono risultate più piovose rispetto ai dati di lungo periodo.

1.2.2 Statistiche descrittive

Le statistiche descrittive (media, range, CV), per i 13 caratteri quantitativi sono riportate nella Tabella 2. I caratteri più variabili sono risultati la produzione di seme, HI, contenuto in FOS, peso del seme e numero di semi per panicolo. La variazione più bassa è stata stimata per l'epoca di maturazione e l'altezza della pianta; tutti gli altri caratteri hanno mostrato valori intermedi. La produzione di seme variava da 118 gm⁻² (cv. Plata) a 606 gm⁻² (cv. Alcudia), ma anche altri caratteri importanti mostravano un alto grado di divergenza. Infatti, l'epoca di spigatura variava da 18 a 45 giorni. L'avena è generalmente una pianta alta e le accessioni analizzate mostravano un'altezza media di 133 cm, la linea BD 118 è la più bassa (107.5 cm) mentre la linea Vir 2301 la più alta (162,5 cm). Anche per il numero di panicoli per m² si è avuto un range ampio, da 246 a 918, con una media di 495 panicoli per m², mentre il contenuto di FOS nella biomassa variava da 1.12% a 6.70%. Tra i caratteri relativi al seme, il peso ettolitrico, importante per la qualità agronomica, variava da 33.9 kg hL⁻¹ (cv. Pluco) a hL⁻¹ 53.5 kg (Rhea × Peniarth). Il peso 1000 semi, importante per indicare le dimensioni del seme, variava da 13.7 g (cv. Roar Se Jet) a 36.5 g (linea PC 59). Inoltre, le differenze tra genotipi erano statisticamente significative per la maggior parte dei caratteri rilevati in entrambi gli anni.

1.2.3 Correlazioni

La matrice di correlazione ha mostrato alcune correlazioni significative tra i caratteri della pianta (Tabella 3). L'epoca di spigatura e di maturazione erano negativamente correlate con la resa del seme, HI e TSW. La produzione di seme aumentava con più alti valori di HI, SW/Pa e TSW. Infine, HI è risultato positivamente correlato con NPa/m², NS/Pa, SW/Pa e TSW. Nessuna correlazione significativa è stata osservata tra il contenuto di FOS nella biomassa e gli altri caratteri.

Tabella 1 Temperature massime e minime mensili, precipitazioni totali e accumulo di gradi-giorno (GDD) a Foggia durante la stagione di crescita nel 2008-2009 e 2009-2010 e valori medi di lungo periodo (52 anni).

	Temperatura massima		Temperatura minima		Precipitazioni totali		GDD				
	2008-09	2009-10	2008-09	2009-10	2008-09	2009-10	2008-09	2009-10			
	media	media	media	media	media	media	media	media			
	52 anni	52 anni	52 anni	52 anni	52 anni	52 anni	52 anni	52 anni			
	°C		°C		mm		°Cd				
Novembre	16.2	16.5	17.1	7.1	6.9	7.3	63.0	46.8	59.4	348.4	342.4
Dicembre	11.8	12.5	13.2	4.2	4.7	4.4	86.3	73.0	62.9	242.1	267.8
Gennaio	10.0	9.9	11.7	3.1	2.8	2.9	82.6	69.8	49.8	219.5	195.7
Febbraio	11.6	12.1	13.0	2.9	3.6	3.0	64.8	75.3	42.3	166.7	214.4
Marzo	14.3	14.8	15.8	3.9	3.7	4.4	54.3	48.3	45.0	282.3	290.2
Aprile	18.4	17.9	19.4	7.4	6.7	6.6	68.5	52.3	46.7	402.0	368.6
Maggio	24.4	23.8	25.2	11.8	11.3	10.9	46.8	41.3	36.9	594.8	535.9
Giugno	28.4	28.2	30.0	15.1	14.6	14.9	45.2	39.3	42.3	651.5	641.6
Media	16.9	17.0	18.2	6.9	6.8	6.8	511.5	445.8	385.3	2907.3	2856.5
Somma											

Tabella 2 Statistiche descrittive per 13 caratteri di 109 genotipi di avena.

Carattere[†]	Media ±SE	Range	CV (%)
HT (giorni dal 1° Aprile)	38.3 ±0.5	18.0 – 45.0*	13.3
MT (giorni dal 1° Aprile)	79.6 ±0.5	67.0 – 87.0*	6.7
FP (giorni)	0.3 ±0.9	18.0 – 64.0**	24.2
FOS (% s.s.)	2.40 ±0.09	1.12 – 6.70	36.5
PH (cm)	133.0 ±1.0	107.5 – 162.5**	7.7
SY (g m⁻²)	304.0 ±10.8	118.0 – 606.0**	37.1
HI (%)	22.4 ±0.7	5.1 – 42.6	31.2
ST (kg hL⁻¹)	42.4 ±0.4	33.9 – 53.5**	9.1
NP/m² (no. m⁻²)	52.0 ±0.9	36.0 – 84.0	17.3
NPa/m² (no. m⁻²)	494.9 ±13.2	246.0 – 918.0	27.8
SW/Pa (g)	1.46 ±0.05	0.26 – 2.99	32.8
NS/Pa (no.)	64.9 ±2.0	19.7 – 133.8	32.2
TSW (g)	25.0 ±0.4	13.7 – 36.5**	18.3

[†] HT: Epoca di spigatura, MT: Epoca di maturazione, FP: Periodo di riempimento, FOS: contenuto di FOS, PH: Altezza della pianta, SY: Produzione di seme, HI: Harvest index, ST: Peso ettolitrico, NP/m²: Numero di piante per m², NPa/m²: Numero di panicoli per m², SW/Pa: Peso del seme per panicolo, NS/Pa: Numero di semi per panicolo, TSW: Peso 1000 semi.

*, ** Indica che la varianza tra genotipi è statisticamente significativa al livello di significatività del 5% e dell'1% , rispettivamente.

Tabella 3 Coefficienti di correlazione tra i 13 caratteri dei 109 genotipi di avena.

Carattere ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. HT (giorni dall'1/04)	—											
2. MT (giorni dall'1/04)	0.06											
3. FP (giorni)	-0.84**	0.49**										
4. FOS (% s.s.)	-0.02	-0.05	-0.01									
5. PH (cm)	0.13	0.19*	-0.01	0.12								
6. SY (g m ⁻²)	-0.30**	-0.57**	-0.05	-0.10	-0.27**							
7. HI (%)	-0.21*	-0.29**	0.02	-0.11	-0.26**	0.61**						
8. ST (kg hL ⁻¹)	-0.01	-0.01	0.01	-0.03	0.22*	-0.05	-0.19					
9. NP/m ² (no. m ⁻²)	0.07	0.41**	0.17	0.05	-0.01	-0.17	-0.22*	-0.06				
10. NPa/m ² (no. m ⁻²)	-0.11	0.37**	0.30**	-0.09	-0.13	0.04	0.25**	0.10	0.32**			
11. SW/Pa (g)	-0.08	-0.07	0.04	-0.04	-0.12	0.33**	0.54**	-0.16	0.01	0.05		
12. NS/Pa (no.)	0.09	0.02	-0.07	-0.03	-0.15	0.12	0.24*	-0.17	0.12	-0.05	0.84**	
13. TSW (g)	-0.34**	-0.23*	0.17	0.10	0.02	0.38**	0.48**	-0.20*	-0.14	0.12	0.32**	-0.03

¹ HT: Epoca di spigatura, MT: Epoca di maturazione, FP: Periodo di riempimento, FOS: contenuto di FOS, PH: Altezza della pianta, SY: Produzione di seme, HI: Harvest index, ST: Peso ettoltrico, NP/m²: Numero di piante per m², NPa/m²: Numero di panicoli per m², SW/Pa: Peso del seme per panicolo, NS/Pa: Numero di semi per panicolo, TSW: Peso 1000 semi.
*, ** significativo per P ≤ 0.05 e P ≤ 0.01.

1.2.4 Analisi delle Componenti Principali

Per determinare il modello di variazione e rilevare la struttura delle relazioni tra i caratteri, è stata effettuata un'analisi PCA considerando tutte le 13 variabili simultaneamente (Tabella 4). Gli autovalori che rappresentano la varianza delle componenti principali, le percentuali cumulative degli autovalori che indicano il contributo percentuale alla varianza totale attribuibile a ogni componente principale e gli autovettori che indicano il grado di associazione tra i dati originali e ciascuna componente principale sono riportati nella Tabella 4. Le prime sei componenti principali (PC1 - PC6) spiegavano più dell'81% della variazione totale stimata, con PC1 che spiegava il 23.4%, PC2 17.5%, PC3 14.5%, PC4 9.3%, PC5 8.9% e PC6 7.5%. Le caratteristiche di ciascuna componente principale sono state determinate sulla base dei carichi dei fattori stimati. PC1 era correlato a SY, HI, SW/Pa e TSW; PC2 a HT, MT, periodo di riempimento (FP) e NPa/m²; PC3 a SW/Pa e NS/Pa; PC4 al contenuto di FOS e NPa/m²; PC5 a PH e ST; e PC6 al contenuto di FOS. Considerando i carichi relativi alla prima e alla seconda componente principale, si può dedurre che i caratteri legati alla produttività, cioè SY, HI e TSW (con autovettori positivi), insieme con l'epoca di spigatura (con autovettore negativo) sono le principali fonti di diversità tra queste popolazioni di avena.

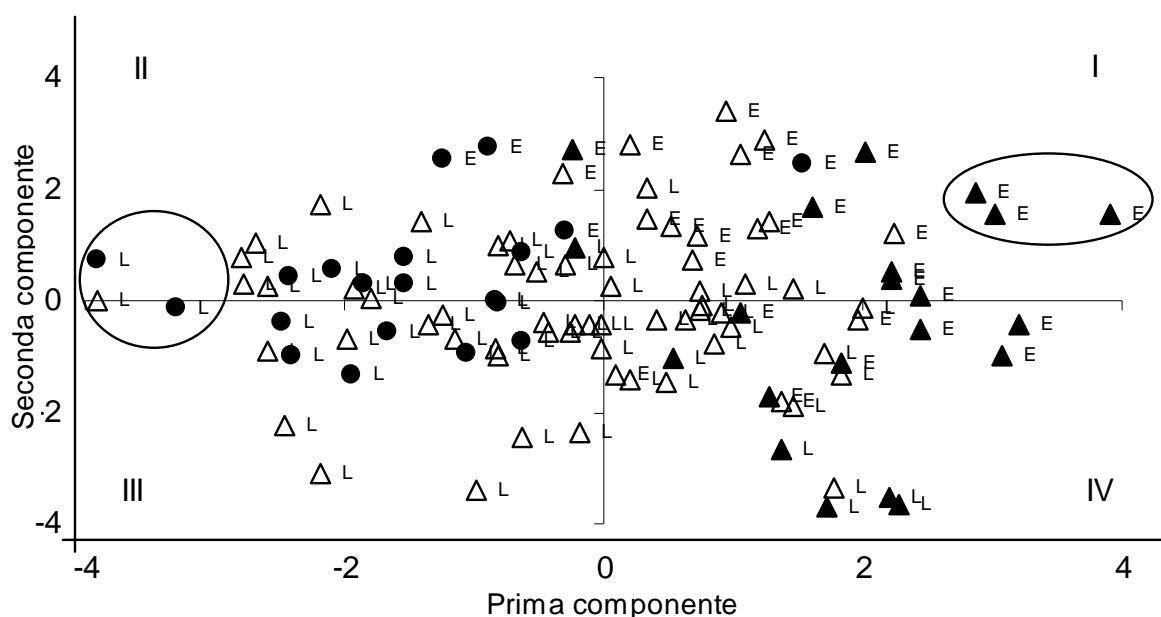


Figura 1 Score plot delle prime due componenti principali di 109 genotipi di avena nel 2009: gruppo della produzione di seme [alta (♦), media (Δ), bassa (●)] e gruppo dell'epoca di spigatura [precoce (E) e tardiva (L)].

A causa dei bassi valori dei carichi fattoriali, il diagramma di dispersione delle prime due componenti principali non mostra evidenti e significativi gruppi di genotipi (Figura 1). Tuttavia, la variazione fenotipica tra queste accessioni di avena per produzione di seme e epoca di spigatura era grande, e la dispersione lungo entrambi gli assi delle componenti principali suggeriva una delimitazione dei genotipi basata sulle osservazioni di questi due caratteri. Le accessioni con potenziale produttivo più alto erano sul lato destro del diagramma, e un gradiente fenologico distinto era formato da 'tardivo' a 'precoce'. Ciascun gruppo relativo all'epoca di spigatura ha una posizione distinta, anche se si verificano alcune sovrapposizioni. Le tre accessioni con i più alti coefficienti positivi e negativi della prima componente (primo e secondo quadrante, rispettivamente) sono sia cultivars che linee di breeding.

Queste accessioni più divergenti, secondo la dispersione lungo i due assi principali, sono riportate nella Tabella 5. È interessante notare che le popolazioni con la stessa alta potenzialità per produzione di seme differivano per più di 2 settimane per l'epoca di spigatura. In particolare, Genziana ha mostrato un più alto HI, mentre la linea CW 0002/58 risultava più bassa e più precoce, con un FP lungo, un HI più basso e un alto contenuto di FOS.

Inoltre, queste accessioni differivano per altre importanti caratteristiche quali il peso ettolitrico e la densità dei panicoli. Le tre popolazioni con bassa potenzialità per produzione di seme differivano principalmente per l'altezza della pianta, HI e il numero di semi per panicolo.

Tabella 4 Risultati dell'analisi delle componenti principali dei 13 caratteri associati con i 109 genotipi di avena per i primi sei assi.

	Asse della componente principale					
	1	2	3	4	5	6
Autovalori	3.04	2.28	1.89	1.21	1.15	0.98
Varianza cumulativa (%)	23	41	56	65	74	81
Carattere [†]	Autovettori					
HT (giorni dall'1/04)	-0.2327	-0.4186	-0.2834	0.3489	-0.2195	-0.1977
MT (giorni dall'1/04)	-0.2695	0.4333	-0.2725	0.0460	-0.1254	0.0072
FP (giorni)	0.0562	0.6020	0.0988	-0.2796	0.1232	0.1765
FOS (% s.s.)	-0.0770	-0.0286	0.0288	-0.5005	-0.0252	-0.7065
PH (cm)	-0.2176	0.0072	0.1010	-0.2823	-0.6572	-0.0406
SY (g m⁻²)	0.4534	-0.0912	0.1485	0.1082	0.0597	-0.0213
HI (%)	0.4948	0.0171	-0.0147	0.1663	-0.1274	-0.1637
ST (kg hL⁻¹)	-0.1208	0.0332	0.2190	0.1169	-0.5004	0.3775
NP/m² (no. m⁻²)	-0.1543	0.2745	-0.3462	0.1789	0.0740	-0.2773
NPa/m² (no. m⁻²)	0.0615	0.4011	-0.1019	0.5224	-0.1422	-0.2289
SW/Pa (g)	0.3902	0.0073	-0.4369	-0.2101	-0.2655	0.0868
NS/Pa (no.)	0.2103	-0.0769	-0.6016	-0.2488	-0.0728	0.2345
TSW (g)	0.3575	0.1477	0.2671	0.0614	-0.3417	-0.2597

[†] HT: Epoca di spigatura, MT: Epoca di maturazione, FP: Periodo di riempimento, FOS: contenuto di FOS, PH: Altezza della pianta, SY: Produzione di seme, HI: Harvest index, ST: Peso ettolitrico, NP/m²: Numero di piante per m², NPa/m²: Numero di panicoli per m², SW/Pa: Peso del seme per panicolo, NS/Pa: Numero di semi per panicolo, TSW: Peso 1000 semi.

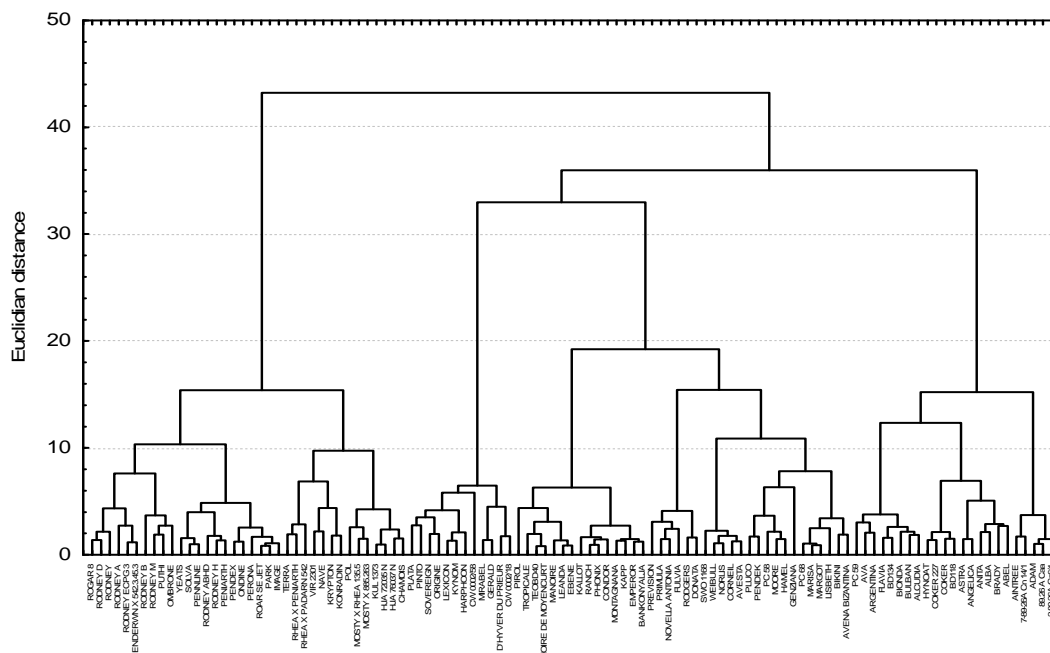
Tabella 5 Popolazioni divergenti in accordo alla variazione lungo gli assi delle prime due componenti principali.

Carattere [†]	Popolazioni con alta produzione di seme			Popolazioni con bassa produzione di seme		
	CW 0002/58	Fulvia	Genziana	Mosty × 885.263	Rhea × Peniarth	Terra
HT (giorni dall'1/04)	18	34	30	45	45	44
MT (giorni dall'1/04)	78	78	78	84	84	84
FP (giorni)	60	44	48	39	39	40
FOS (% s.s.)	5.2	2.4	1.3	2.1	3.3	1.7
PH (cm)	120	130	130	140	150	140
SY (g m⁻²)	520	470	554	150	244	184
HI (%)	29	38	43	13	8	5
ST (kg hL⁻¹)	38	41	46	48	52	50
NP/m² (no. m⁻²)	54	54	48	60	60	60
NPa/m² (no. m⁻²)	540	882	768	456	438	570
SW/Pa (g)	2.0	2.0	3.0	1.0	0.3	0.4
NS/Pa (no.)	91	75	100	81	20	22
TSW (g)	31	28	31	14	14	15

[†] HT: Epoca di spigatura, MT: Epoca di maturazione, FP: Periodo di riempimento, FOS: contenuto di FOS, PH: Altezza della pianta, SY: Produzione di seme, HI: Harvest index, ST: Peso ettolitrico, NP/m²: Numero di piante per m², NPa/m²: Numero di panicoli per m², SW/Pa: Peso del seme per panicolo, NS/Pa: Numero di semi per panicolo, TSW: Peso 1000 semi.

1.2.5 Analisi Cluster

A causa della difficoltà di raggruppare i genotipi utilizzando solo l'analisi PCA, è stata eseguita un'analisi cluster. Popolazioni simili sono state raggruppate secondo l'analisi della distanza minima sulla base dei valori medi delle sei componenti principali. I 109 genotipi esaminati possono essere raggruppati in nove clusters alla distanza euclidea del 22% (Figura 2). L'analisi cluster, in accordo ai risultati ottenuti dalla PCA, ha rivelato una grande variazione tra i genotipi. Inoltre, nella figura sono mostrati i valori più alti e più bassi dei caratteri originali per ogni cluster. I clusters contenevano da 5 a 22 accessioni simili per specifici caratteri. In particolare, i clusters da I a IX comprendevano 22 popolazioni (con più alti valori di epoca di maturazione, piante più alte e maggiore contenuto di FOS), 14 (con più alto peso ettolitrico, e minore SY, HI e TSW), 12 (con più lungo FP e minore HT), 15 (con più alto NP/m²), 6 (con maggiore HI e NPa/m²), 17 (con maggiore SW/Pa e NS/Pa), 8 (con più alto SY, HI e TSW), 10 (con minore NP/m², NPa/m² e NS/Pa) e 5 (con lungo HT), rispettivamente. In particolare, i clusters III e VII risultano coerenti con i risultati delle prime due PC, poiché includono le accessioni più precoci e più produttive, rispettivamente.



Cluster	N° di accessioni	Carattere [†]	
		Valori alti	Valori bassi
I	22	MT, FOS, PH	
II	14	ST	SY, HI, SW/Pa , TSW
III	12	FP	HT
IV	15	NP/m ²	ST
V	6	HI, NPa/m ²	FOS
VI	17	SW/Pa, NS/Pa	
VII	8	SY, HI, TSW	
VIII	10		NP/m ² , NPa/m ² , NS/Pa
IX	5	HT	MT, FP, PH

[†] HT: Epoca di spigatura, MT: Epoca di maturazione, FP: Periodo di riempimento, FOS: contenuto di FOS, PH: Altezza della pianta, SY: Produzione di seme, HI: Harvest index, ST: Peso ettolitrico, NP/m²: Numero di piante per m², NPa/m²: Numero di panicoli per m², SW/Pa: Peso del seme per panicolo, NS/Pa: Numero di semi per panicolo, TSW: Peso 1000 semi.

Figura 2 Dendrogramma secondo il metodo di Ward dell'analisi cluster che spiega l'81% della variazione fenotipica tra le 109 accessioni di avena, e numero e caratteristiche delle accessioni entro ciascun gruppo.

1.3 Discussione

Secondo Richards (1989) e Shorter e al. (1991), il primo passo verso la massimizzazione della produzione delle colture per mezzo dell'agronomia o del miglioramento genetico è quello di garantire che la fenologia delle piante sia coerente con le risorse disponibili dell'ambiente di produzione. Nel presente studio, l'analisi dei caratteri bioagronomici mostra una alta variazione

tra le 109 popolazioni di avena che potrebbe essere utilizzata per una serie di programmi di miglioramento. I dati mostrano che i genotipi valutati erano molto eterogenei per la produzione di seme e per contenuto in FOS. Una grande variazione nella concentrazione di FOS è stata trovata da Livingston e al. (1993) in più di 200 linee di avena, valutate allo stadio di accostamento. La variabilità genetica per la concentrazione di FOS era abbastanza alta per consentire studi fisiologici più dettagliati con un minor numero di accessioni che hanno un range ampio di contenuto di FOS.

L'epoca di spigatura è una caratteristica importante per la produzione di seme negli ambienti mediterranei, dove sono frequenti temperature elevate anche in primavera. Generalmente, l'epoca di spigatura dell'avena nelle condizioni climatiche dell'Italia meridionale si verifica nei primi dieci giorni di maggio. La fioritura precoce permette un periodo lungo di riempimento del seme, durante il quale le foglie rimangono verdi e il trasferimento degli assimilati al seme è migliorato. Di conseguenza, alti rendimenti di seme in avena potrebbero essere legati alle caratteristiche di un rapido ed efficiente riempimento del seme, e così l'adattamento all'ambiente potrebbe essere migliorato attraverso la selezione di genotipi con fioritura precoce (Redaelli e al., 2008). L'importanza del carattere precocità, come meccanismo di risposta agli stress abiotici nella fase finale del ciclo biologico, è stata confermata dalla correlazione negativa significativa trovata tra l'epoca di spigatura e la produzione di seme. Il range più alto e la variazione misurata per l'epoca di spigatura, in confronto con l'epoca di maturazione, indicano che non c'è buon potenziale per migliorare le accessioni di avena per quest'ultimo carattere.

Inoltre, secondo Redaelli et al. (2008), un'alta produzione di seme in avena è negativamente correlata con l'altezza della pianta e positivamente correlata con il peso del seme. L'altezza della pianta è molto importante in termini di resistenza all'allettamento e per l'HI. Una graduale riduzione nell'altezza della pianta associata ad un incremento dell'HI ha rappresentato l'obiettivo principale del breeding nei cereali, con un effetto sulla capacità di accumulo e la ripartizione della biomassa (De Vita e al., 2007). Inoltre, nel presente studio, la produzione di seme era positivamente correlata con il peso del seme per panicolo, un carattere che è stato considerato da Peltonen-Sainio (1991) come un parametro utile per definire l'ideotipo produttivo di avena.

Secondo Peterson e al. (2005), la conoscenza delle relazioni tra i diversi caratteri può aiutare i breeders ad ottimizzare alcune caratteristiche simultaneamente. Poiché l'analisi della correlazione può mostrare soltanto l'associazione tra singoli caratteri, è stata utilizzata un'analisi multivariata per quantificare le analogie e le differenze, nonché per valutare i contributi relativi dei vari caratteri alla variabilità totale nelle collezioni di germoplasma (Rezai e Frey, 1990; Flores e al., 1997; Peltonen-Sainio, 1991; Panthee e al., 2006). Inoltre, la classificazione effettuata usando molteplici caratteristiche agronomiche aiuta a identificare in modo più preciso l'adattamento di una cultivar e potrebbe migliorare la valutazione di una cultivar per adattamento potenziale (Souza e Sorrells, 1991). I nostri dati dimostrano che ogni carattere è una fonte importante di variazione in almeno un asse delle componenti principali anche se non c'è un singolo carattere che potrebbe spiegare una quantità molto alta della variazione. Tuttavia, considerando i valori relativi a PC1 e PC2, si può dedurre che le caratteristiche produttive insieme alla fenologia sono le principali fonti di diversità.

Come riportato da Firincioglu e al. (2009), il diagramma biplot può essere usato per selezionare genotipi che potrebbero avere combinazioni favorevoli dei caratteri da utilizzare in un progetto di breeding. Ad esempio, se l'obiettivo è quello di aumentare la produzione del seme, i genotipi che rientrano nei quadranti di destra sono generalmente sopra la media per questo carattere specifico. In questo studio, la distribuzione delle accessioni lungo gli assi delle prime due componenti principali ha rivelato due gruppi distinti in base all'epoca di spigatura e alla produzione di seme. Tuttavia, diversi genotipi possono essere considerati come fonti potenziali di precocità, sebbene non siano utili per incrementare la produzione di seme.

I risultati hanno rivelato l'esistenza di diverse associazioni tra i caratteri dei materiali studiati. Questo suggerisce che attraverso la selezione c'è la possibilità di ottenere genotipi utili, in grado di combinare un'elevata potenzialità produttiva con altri caratteri desiderabili, da impiegare in programmi futuri di selezione. Poiché popolazioni con lo stesso potenziale produttivo sembrano essere notevolmente diverse per altre caratteristiche, la loro elevata resa in SY può essere una conseguenza di diversi pool genici. Se questo è vero, mediante l'incrocio è possibile ottenere una variazione genetica molto ampia nelle generazioni segreganti

(Veronesi e Falcinelli, 2008). Questo ci dà l'opportunità di costituire varietà di avena caratterizzate da differenti epoche di spigatura, altezza della pianta e/o elevato contenuto di FOS.

Tra i genotipi più produttivi, Genziana e CW 0002/58 hanno mostrato alti e bassi valori di HI, rispettivamente. In accordo a Peltonen-Sainio e al. (2008), questo conferma la natura complessa dell'HI e la sua dipendenza dalle sue componenti (biomassa vegetativa e granella). Inoltre, gli stessi Autori hanno rilevato che per avena, la resa in seme aveva un'influenza elevata e contrastante sulla biomassa. Nel nostro caso, sembra che in CW 0002/58 l'elevata produzione di seme non è stata ottenuta a scapito della biomassa vegetativa. In altre parole, sembra che Genziana e CW 0002/58 rappresentino dei buoni ideotipi per produzione di seme e produzione di biomassa foraggera in ambiente mediterraneo.

L'analisi cluster calcolata sulla base delle prime sei componenti principali, ha mostrato una notevole diversità sia tra gruppi che all'interno dei gruppi. Il dendrogramma ottenuto è costituito da nove gruppi e un certo numero di sottogruppi che derivano da diversi caratteri agronomici e morfologici. È stato ipotizzato che questi gruppi potrebbero predire somiglianze genetiche tra cultivars (Souza e Sorrels, 1991). L'approccio multivariato sembra essere quindi un valido sistema per la valutazione del germoplasma in avena, poiché permette la caratterizzazione dettagliata delle popolazioni in termini di adattamento e di produttività con una maggiore capacità discriminatoria in confronto all'analisi separata di singoli caratteri. Dal punto di vista del breeding, in accordo a Veronesi e Falcinelli (1988), la presenza di una notevole diversità all'interno di una collezione di germoplasma sembra essere di grande interesse nel fornire materiali validi per programmi di incrocio che mirano al miglioramento dell'avena nell'ambiente studiato, che è rappresentativo del clima mediterraneo.

1.4 Conclusioni

L'analisi della variazione di queste 109 accessioni ha fornito informazioni interessanti sulle associazioni dei caratteri che sono utili per la formulazione di ipotesi per il breeding. Infatti, l'assenza di forti associazioni tra i caratteri studiati permette di ottenere ricombinanti utili. Inoltre, i risultati mostrano chiaramente una variazione indipendente del contenuto di FOS, il che suggerisce che in un programma di breeding su base ampia, sarebbe possibile manipolare in modo indipendente questo carattere qualitativo del foraggio e le componenti produttive del seme. L'incremento della produzione di seme in cultivars di avena dovrebbe derivare da cambiamenti genetici nella capacità di produrre granella a spese della biomassa vegetativa (alto HI) e nel realizzare un elevato peso del seme e peso ellolitrico. I genotipi dei clusters V, VI e VII mostrano queste caratteristiche desiderabili. Al contrario, una pianta di avena con attitudine alla produzione foraggera dovrebbe essere alta e fogliosa, con una fase vegetativa più lunga e una maggiore biomassa (basso HI). I genotipi dei clusters I, II e IX hanno la maggior parte di queste caratteristiche, insieme ad un alto contenuto di FOS nella biomassa, il che li rende adatti come colture da foraggio.

Il presente studio, pertanto, ha contribuito ad aumentare le conoscenze sul germoplasma di avena disponibile e, sulla base della definizione di ideotipi, evidenzia il potenziale per lo sviluppo di varietà per scopi diversi, ad esempio per l'alimentazione umana o animale. Tuttavia, ulteriori studi devono essere effettuati per confermare questi dati.

1.5 Bibliografia

- Achleitner A., Tinker N.A., Zechner E., Buerstmayer H., 2008. Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theoretical and Applied Genetics* 117 (7): 1041–1053.
- Corleto A., 1987. Gli erbai in Italia meridionale. *L'Italia Agricola* 2: 99–109.
- De Vita P., Li Destri Nicosia O., Nigro F., Platani C., Riefolo C., Di Fonzo N., Cattivelli L., 2007. Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. *European Journal of Agronomy* 26 (1): 39–53.
- Firincioğlu H. K., Erbektaş E., Doğruyol L., Mutlu Z., Ünal S., Karakurt E., 2009. Phenotypic variation of autumn and springsown vetch (*Vicia sativa* ssp.) populations in central Turkey. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7 (3): 596–606.

- Flores F., Gutierrez J.C., Lopez J., Moreno M.T., Cubero J.I., 1997. Multivariate analysis approach to evaluate a germplasm collection of *Hedysarum coronarium* L, Genetic Resources and Crop Evolution 44 (6): 545–555.
- Food and Drug Administration, 1997. Food labeling: health claims; oats and coronary heart disease; final rule. Federal Register 62: 3583–3601.
- Greene N.V., Kenworthy K.E., Quesenberry K.H., Unruh J.B., Sartain J.B., 2008. Diversity and relatedness of common carpetgrass germplasm. Crop Science 48 (6): 2298–2304.
- Leiva E., Hall M.B., Van Horn H.H., 2000. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. Journal of Dairy Science 83 (12): 2866–2875.
- Livingston III D.P., Elwinger G.F., Weaver J.C., 1993. Fructan and sugars in 273 oat accessions. Crop Science 33: 525–529.
- Martinez M.F., Arelovich H.M., Wehrhahne L.N., 2010. Grain yield, nutrient content and lipid profile of oat genotypes grown in a semiarid environment. Field Crops Research 116 (1-2): 92–100.
- Panthee D.R., Kc R.B., Regmi H.N., Subedi P.P., Bhattarai S., Dhakal J., 2006. Diversity analysis of garlic (*Allium sativum* L.) germplasms available in Nepal based on morphological Characters. Genetic Resources and Crop Evolution 53 (1): 205–212.
- Peltonen-Sainio P., 1991. Productive oat ideotype for northern growing conditions. Euphytica 54 (1): 27–32.
- Peltonen-Sainio P., Muurinen S., Rajala A., Jauhiainen L., 2008. Variation in harvest index of modern spring barley, oat and wheat cultivars adapted to northern growing conditions. Journal of Agricultural Science 146 (1): 35–47.
- Peterson D.M., Wesenberg D.M., Burrup D.E., Erickson C.A., 2005. Relationships among agronomic traits and grain composition in oat genotypes grown in different environments. Crop Science 45 (4): 1249–1255.
- Pezzotti M., Tomassini C., Falcinelli M., Veronesi F., 1994. Evaluation of an Italian germplasm collection of *Dactylis glomerata* L. using a multivariate approach. Journal of Genetics and Breeding 48 (1): 17–24.
- Redaelli R., Laganà P., Rizza F., Li Destri Nicosia O., Cattivelli L., 2008. Genetic progress of oats in Italy. Euphytica 164 (3): 679–687.
- Redaelli R., Sgrulletta D., De Stefanis E., 2003. Genetic variability for chemical components in sixty European oat (*Avena sativa* L.) cultivars. Cereal Research Communications 31 (1-2): 185–192.
- Rezai A., Frey K.J., 1990. Multivariate analysis of variation among wild oat accessions—seed traits. Euphytica 49 (2): 111–119.
- Richards R.A., 1989. Breeding for drought resistance physiological approaches. In: Baker F.W.G. (ed.). Drought Resistance in Cereals, pp. 65. CAB International, Wallingford, UK.
- Saksena R., Deepak D., Khare A., Sahai R., Tripathi L.M., Srivas V.M.L., 1999. A novel pentasaccharide from immunostimulant oligosaccharide fraction of buffalomilk. Biochimica et Biophysica Acta 1428: 433–445.
- Shorter R., Lawn R.J., Hammer G.L., 1991. Improving genotypic adaptation in crops. A role for breeders, physiologists and modellers. Experimental Agriculture 27 (2): 155–175.
- Sneath P. H. A., Sokal R.R., 1973. Numerical Taxonomy: The Principle and Practice of Numerical Classification, W.H. Freeman, San Francisco, Calif, USA.
- Souza E., Sorrells M.E., 1991. Relationships among 70 North American oat germplasms: I. Cluster analysis using quantitative characters. Crop Science 31: 599–605.
- Stevens E.J., Armstrong K.W., Bezar H.J., Griffin W.B., Hampton J.B., 2004. Fodder oats: an overview. In: Suttie J.M., Reynolds S.G. (eds.). Fodder Oats: A World Overview. Plant Production and Protection Series, No. 33, pp. 11–18, FAO, Rome, Italy.
- Suttie J.M., Reynolds S.G., 2004. Fodder Oats: A World Overview. FAO, Rome, Italy. <http://www.fao.org/docrep/008/y5765e/y5765e00.htm>.
- Veronesi F., Falcinelli M., 1988. Evaluation of an Italian germplasm collection of *Festuca arundinacea* Schreb. through a multivariate analysis. Euphytica 38 (3): 211–220.

1.6 Collezione di avena del CRA – CER

In Italia l'avena viene coltivata su una superficie che corrisponde a circa il 4% dell'intera superficie dedicata ai cereali (dati Istat), e questo valore è rimasto pressoché invariato negli ultimi anni. Uno dei motivi dello scarso successo dell'avena, al di là della sua destinazione d'uso prevalentemente zootecnica, è la produttività, che tradizionalmente viene ritenuta troppo bassa perché la coltura sia redditizia. L'utilizzo di nuovi genotipi, molto produttivi e di buona qualità, contribuirebbe certamente ad innalzare le rese e a rivalutare la coltura anche agli occhi degli agricoltori.

Tuttavia, l'attività di miglioramento genetico dell'avena è stata focalizzata prevalentemente sull'incremento delle rese e sul miglioramento della qualità della granella per il consumo alimentare umano e per l'industria cosmetico-farmaceutica, trascurando gli aspetti relativi alle potenzialità foraggere della coltura. Negli ambienti meridionali, al contrario, l'avena è ancora oggi ampiamente utilizzata in sistemi cerealicoli-foraggeri per la costituzione di erbai mono o oligofiti e per la doppia utilizzazione pascolo-granella. Pertanto, si è ritenuto opportuno avviare una ricerca finalizzata a raccogliere, caratterizzare e valutare le potenzialità produttive (al variare anche della destinazione d'uso) di un ampio numero di genotipi di *Avena sativa*.

La collezione di avena attualmente presente presso il Centro di ricerca per la cerealicoltura è composta da 122 accessioni appartenenti a cultivars italiane e straniere sia di recente che di più antica costituzione, nonché di alcune linee di breeding in fase avanzata di valutazione. La collezione proviene da una raccolta ex-situ ed è stata iniziata nel 2007.

I genotipi vengono caratterizzati annualmente per alcuni caratteri bioagronomici, quali la data di spigatura, l'altezza della pianta, la produzione di seme, il peso ettolitrico ed il peso di 1000 semi, in vista di possibili programmi di selezione e incrocio. I dati acquisiti indicano che vi è un'alta variabilità nei caratteri morfologici come l'altezza della pianta, biologici (epoca di spigatura) e agronomici (capacità produttiva).

Una valutazione più approfondita, cui si riferiscono i risultati descritti in precedenza, è stata eseguita su 109 accessioni nel 2009 e 2010.

Tabella A Lista dei genotipi di avena presenti nella collezione del CRA-CER.

Accessione	Paese di origine	Anno di rilascio	Accessione	Paese di origine	Anno di rilascio	Accessione	Paese di origine	Anno di rilascio
2-89.26A Cn6/1			Hamel	ITA	2000	Pennline	USA	1982
7-89.26A Cn14/1			Harphoon			Perona	ITA	1980
89.26 A Caa			HJA 72035 N			Phoenix	DEU	1955
Abel	CZE	1994	HJA 76037 N			Pinto	GBR	
Adam	CZE	1988	Hynoat			Pirol	DEU	1980
Aintree	FRA	1987	Image	GBR	1987	Plata	USA	
Alba	ITA	1965	Kallot	SWE	1973	Pluco	NDL	
Alcudia	FRA	2005	Kapp	NOR	1986	Pol	NOR	1970
Angelica	ITA	1969	Kinon	GBR		Poncho	FRA	1992
Anita	BEL	1973	Konradin			Prevision	ITA	1995
Argentina	ITA	1969	Krypton	GBR	2001	Primula	ITA	2002
Astra	ITA	1969	Kul 1373			Puthi	FIN	
Ava	ITA	1969	Kynom			Ranch	FRA	1999
Avena Bizantina			Leanda	NDL	1974	Rhea x Pad. 542		
Avesta	AUT	1985	Lexicon	GBR		Rhea x Peniarth		
Bankonyalja			Lidia	ITA	1982	Roar Sejet	DNK	
BD 118			Lisbeth	FIN	1995	Rodgers	USA	1997
BD 134			Manoire	FRA	1979	Rodney	CAN	1943
Bikini		1997	Margot			Rodney A	CAN	
Bionda	ITA	2003	Marisa	ITA	1996	Rodney ABHD	CAN	
Brady	IRL	1992	Mirabel	FRA	1995	Rodney B	CAN	
Bulban	AUS	1981	Montagnana	ITA	1979	Rodney D	CAN	
Chamois	FRA	1995	Moore	USA	1972	Rodney ECPG 3	CAN	
Coker	USA	1973	Mosty x 885.263	FRA		Rodney H	CAN	
Coker 227	USA	1973	Mosty x Rhea 135.5	FRA	1979	Rodney M	CAN	
Condor	NDL	1970	Nave	ITA	1983	Rodney O	CAN	
Croara	ITA	1998	Nigra	ITA	2000	Rogar 8	ITA	1969
Cory			Noire de Moyencourt	FRA		Saia	ITA	2001
Corneil		2008	Norlis	GBR	1993	Sole II		
CW 0002/18	GBR		Novella Antonia	ITA	2000	Sonar	ITA	1987
CW 0002/58	GBR		Ombrone	ITA	1972	Solva	DEU	1976
Dakar			Ondine	FRA		Sovereign	GBR	1955
D'Hiver Du Prieuré	FRA	1982	Origine	FRA	1996	SWO 1168		
Donata	ITA	1999	Park	GBR	1953	Tenebra	FRA	
Ebene	FRA	1997	PC 58	FAO		Teo BD 40	ITA	2003
Emperor	GBR	1995	PC 59	FAO		Terra	CAN	1968
Flavia	ITA	1996	PC 68	FAO		Tropicale	FRA	1994
Fringante			Pendek	NDL	1962	Vir 2301		
Fulvia	ITA	2000	Pend x 542.3.45.3	NDL		Weibull	SWE	1986
Genziana	ITA	2004	Pendex	NDL	1962	Yeats	USA	1993
Gerald	GBR	1993	Peniarth	GBR	1965			

Tabella B Parametri di variabilità dei caratteri bioagronomici rilevati sui genotipi di avena presenti nella collezione del CRA-CER in due anni di valutazione a Foggia (n=122).

Carattere	Media \pm SE	Range		CV (%)
		Min.	Max.	
Epoca di spigatura (giorni dall'1/4)	38.2 \pm 0.46	25.0	46.5	13.4
Altezza (cm)	133.0 \pm 0.91	107.5	162.5	7.6
Peso ettolitrico (kg hL ⁻¹)	42.6 \pm 0.35	33.9	53.5	9.1
Produzione di seme (g m ⁻²)	309.1 \pm 10.09	118.0	606.0	36.1
Peso 1000 semi (g)	25.0 \pm 0.42	13.0	36.5	18.5

MANTENIMENTO E VALORIZZAZIONE DEL GERMOPLASMA DI MAIS (*Zea mays* L.)*

Carlotta Balconi, Rita Redaelli, Sabrina Locatelli, Chiara Lanzasova, Paolo Valoti, Gianfranco Mazzinelli, Hans Hartings, Alberto Verderio, Nicola Berardo

CRA–MAC Unità di ricerca per la maiscoltura
Via Stezzano 24 – 24126 Bergamo

Riassunto

Il mais è stato utilizzato per lungo tempo per usi specificamente zootecnici; negli ultimi anni, però, i nuovi orientamenti del mercato alimentare e lo sviluppo di processi industriali innovativi hanno suggerito nuovi possibili utilizzi, sollecitando l'attivazione di programmi di miglioramento genetici finalizzati. A questo proposito, risulta importante la caratterizzazione del germoplasma disponibile, per l'identificazione dei genotipi con caratteristiche chimiche e fisiologiche adatte alle nuove trasformazioni. La collezione di germoplasma di mais conservata presso l'Unità di ricerca per la Maiscoltura (CRA-MAC) è la più ricca in Italia per numero e varietà di accessioni (oltre 5.000). In questo capitolo vengono descritte le attività di ricerca, finanziate da numerosi progetti mirati, che hanno consentito di mantenere e caratterizzare il germoplasma di mais per parametri fisiologici, morfologici, genetici o nutrizionali e con elevata salubrità.

Summary

Maize was used for a long time specifically as a feed; recently, however, the new guidelines of the food market and the development of innovative industrial processes have suggested new possible uses, urging the activation of genetic breeding programs. For this purpose, the characterization of available germplasm is important for the identification of genotypes with physiological and chemical characteristics suited to the new transformations. The maize germplasm collection stored at Unità di ricerca per la Maiscoltura (CRA-MAC) is the richest in Italy for the number of accessions (over 5,000). This chapter describes the research, funded by a number of specific projects, which have enabled to maintain and characterize maize germplasm for physiological, morphological, genetic, nutritional parameters and high safety.

Parole chiave

Germoplasma, valorizzazione, mais, resistenza, metodi di inoculo

Keywords

Germplasm, valorization, maize, resistance, inoculation methods

1 MAIS

1.1 Introduzione

Negli anni '50, l'introduzione in Europa dei mais ibridi americani, caratterizzati da una superiore capacità produttiva e una maggiore resistenza alle malattie, sostituì progressivamente e completamente le popolazioni di mais che fino a quel momento erano state coltivate in molte aree del nostro Paese. Per impedire la perdita di un materiale genetico così variabile e interessante, la Stazione Sperimentale per la Maiscoltura organizzò nel 1954 la raccolta di queste popolazioni, che da allora vengono mantenute nella collezione di germoplasma del CRA-MAC. Si tratta di un patrimonio genetico di valore inestimabile, in quanto non più presente sul territorio italiano, che contribuisce a fare del germoplasma del CRA-MAC la collezione di mais più ampia in Italia. A queste popolazioni si sono aggiunte nel corso degli anni, attraverso una rete di contatti e di scambi, altre popolazioni locali (*landraces*) provenienti da molti Paesi. A questo nucleo di popolazioni open–pollinated tradizionali si devono aggiungere le linee inbred, pubbliche e non, che vengono ugualmente conservate nel germoplasma, e le

* doi:10.4458/0986-65

popolazioni sintetiche, molte delle quali sviluppate in Italia. Infine, esiste presso il CRA-MAC una collezione di linee che portano mutazioni a carico della pianta o della granella, un materiale di grande interesse potenziale per gli studi di genetica (Tabella 1 e Figura 1).

Il mantenimento di una collezione così importante richiede uno sforzo notevole. I materiali devono infatti essere periodicamente rigenerati in campo, mediante impollinazione controllata, quindi conservati in cella a 5°C. Diversi parametri morfologici e fisiologici vengono raccolti durante la fase di riproduzione del materiale, allo scopo di caratterizzare i genotipi.

Tabella 1. Accessioni di mais presenti nella collezione di germoplasma del CRA-MAC

Tipo di materiale	N. accessioni
Varietà tradizionali	696 italiane 566 da altri Paesi
Linee inbred	2160 italiane 1430 da altri Paesi
Popolazioni sintetiche	288 italiane 188 da altri Paesi
Linee con mutazioni	388



Figura 1 Spighe con cariossidi che mostrano segregazione del colore

1.2 Caratterizzazione della qualità nutrizionale

Il germoplasma italiano di mais (*Zea mays* L.) è uno dei più ricchi in Europa per numero di popolazioni ed ecotipi e rappresenta perciò una buona fonte di variabilità genetica da esplorare. Poiché il mais costituisce una rilevante fonte alimentare, la quantificazione dei componenti della cariosside che hanno un significato nutrizionale è un passaggio importante per un efficiente utilizzo dei diversi genotipi. In questo contesto, la caratterizzazione biochimica del germoplasma tradizionale italiano può servire a identificare i materiali più adatti per lo sviluppo di alimenti a base di mais con più elevato valore nutrizionale. Recentemente, un ampio gruppo di popolazioni open-pollinated (oltre 1.200), sia italiane che provenienti da Paesi esteri, sono state descritte in termini di composizione chimica della granella (proteine totali, lipidi totali, percentuale di amido) e di parametri tecnologici (tessitura dell'endosperma, indicata come valore di area di flottazione) (Berardo *et al.* 2009).

Altri composti presenti nella cariosside di mais rivestono un grande interesse, in quanto svolgono un ruolo importante nel mantenere un buono stato di salute e nella prevenzione di patologie croniche e/o degenerative. I carotenoidi, ad esempio, svolgono un ruolo come molecole antiossidanti; alcuni di questi, i composti pro-vitamina A, sono anche fondamentali nell'alimentazione umana per proteggere la vista da patologie degenerative. I componenti dei carotenoidi sono stati quantificati in linee appartenenti al germoplasma tradizionale italiano, rivelando un'ampia variabilità e contenuti medi superiori a quelli osservati in popolazioni e linee inbred di altri Paesi (Berardo *et al.* 2004; Berardo *et al.* 2009; Alfieri *et al.* 2012).

1.3 Recupero, selezione e valorizzazione germoplasma per uso alimentare

Negli ultimi anni si è assistito ad un rinnovato interesse da parte di diversi soggetti operanti nel campo della salvaguardia e valorizzazione delle risorse agroalimentari locali (Province, comunità montane, consorzi di tutela ecc.), verso il recupero delle vecchie varietà di mais per la produzione di farina da polenta (Figura 2). Le principali varietà di mais utilizzate

anticamente a tale scopo nel Nord Italia erano il Nostrano dell'Isola, il Marano, il Rostrato e lo Scagliolo, ognuna di esse con numerose varianti selezionate nel corso degli anni dagli agricoltori delle diverse zone di produzione. Tutte queste varietà erano ottime dal punto di vista qualitativo, permettendo di ottenere farine con elevate caratteristiche organolettiche, ma



presentavano enormi limitazioni agronomiche (elevata suscettibilità alle malattie, debolezza dell'apparato radicale e dello stocco, scarsa produttività). Negli anni '60 del secolo scorso il CRA-MAC, partendo da queste varietà come base di selezione, ha iniziato dei programmi di miglioramento genetico volti all'ottenimento di linee inbred per la costituzione di ibridi che avessero le stesse caratteristiche qualitative ma che consentissero anche di superare le suddette limitazioni agronomiche. Le linee più importanti ottenute da questi programmi sono state Lo863, derivata dal Nostrano dell'Isola, Lo1374, secondo ciclo della precedente, L1057, L1058 e Lo592, derivate dal Marano. Queste linee hanno avuto negli anni un discreto successo commerciale, essendo state licenziate alle società sementiere operanti sul mercato italiano, che le hanno utilizzate per la produzione di ibridi destinati all'uso alimentare.

Figura 2 Vecchie varietà di mais

1.4 Salubrità della granella

Un aspetto importante è la questione della salubrità delle produzioni maidicole. Alcune specie fungine sono infatti responsabili dell'accumulo di micotossine nel mais in pre- e post- raccolta, e queste molecole possono risultare tossiche per l'uomo e per gli animali (CAST, 2003).

Il monitoraggio delle produzioni maidicole italiane, relativamente alla contaminazione da micotossine, mostra che una quota significativa del prodotto nazionale supera i limiti di tolleranza previsti dalle norme vigenti per l'alimentazione umana (EC, 2006, 2007). Le micotossine che si riscontrano con maggior frequenza nella granella di mais sono le aflatoossine, prodotte da *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, e le fumonisine, prodotte da *Fusarium verticillioides* (Figura 3). Le fumonisine costituiscono un problema diffuso nel nord Italia quasi tutti gli anni (Berardo *et al.*, 2011), mentre la contaminazione da aflatoossine è più sporadica e legata a condizioni ambientali particolarmente siccitose (Piva e Pietri, 2004).

Un importante strumento nei programmi di miglioramento genetico volti ad aumentare la resistenza del mais all'infezione di *Fusarium* ed *Aspergillus* consiste nella disponibilità di un metodo affidabile di selezione e valutazione dei vari genotipi, come recentemente riportato da Mesterhazy *et al.*, (2012). A tale scopo ricerche sono state condotte al fine di identificare un metodo efficiente e riproducibile di inoculo della pianta, dimostrando che il protocollo adottato è utile nell'evidenziare differenze nella



Figura 3 Spiga di mais contaminata da *Fusarium*

risposta dei diversi genotipi all'attacco di patogeni fungini ed al conseguente accumulo di micotossine (Zummo e Scott, 1989; Reid *et al.*, 1996; Ferrari e Balconi, 2008).

In condizioni ambientali favorevoli, l'infezione del fungo può avvenire attraverso due vie di ingresso indipendenti: le setole emergenti ("infezione primaria") e le cariossidi danneggiate ("infezione secondaria") da stress biotici (insetti, uccelli) o abiotici (agenti atmosferici, grandine). L'infezione primaria è una via di ingresso aperta al patogeno fungino per un periodo limitato di tempo, dall'emergenza delle setole sino a circa dieci giorni dopo l'impollinazione, momento in cui le setole iniziano ad essiccarsi; l'infezione secondaria consente al fungo di insediarsi nelle cariossidi danneggiate durante tutto il periodo di riempimento della cariosside, sino alla maturazione fisiologica della granella. L'eventuale resistenza di un genotipo di mais ad una delle modalità di infezione del patogeno fungino, non implica necessariamente resistenza all'altra modalità di infestazione. Pertanto, nell'ambito della valutazione di genotipi di mais per resistenza a patogeni fungini, devono essere contemplate entrambe le modalità di infezione. In condizioni di scarsa incidenza della patologia fungina, risulta difficile poter evidenziare una variabilità nella risposta dei genotipi sotto studio, quindi l'approccio utilizzato nella nostra ricerca prevede di forzare artificialmente l'inoculo fungino, mimando entrambe le modalità di attacco del fungo, descritte precedentemente.

Lo scopo della nostra ricerca è quindi quello di valutare e confrontare genotipi di mais attraverso tecniche di inoculo artificiale di due patogeni tossigeni (*A. flavus* e *F. verticillioides*), per evidenziare una resistenza o viceversa una suscettibilità all'infezione fungina e alla conseguente produzione di micotossine.

Le tecniche di inoculo artificiale adottate sono le seguenti (Figura 4):

- **tramite SETE – NON INVASIVA-SPRAY** -: Silk Channel Inoculation Assay (SCIA) (Zummo e Scott, 1989): la sospensione di spore viene vaporizzata sulle setole della spiga primaria, 4-8 giorni dopo l'impollinazione (DAP)

- **tramite SETE – INVASIVA-SIRINGA** -: Silk Channel Inoculation Assay (SCIA) (Reid *et al.*, 1996): la sospensione di spore viene iniettata nel canale delle setole della spiga primaria, 4-8 giorni dopo l'impollinazione (DAP)

- **tramite CARIOSIDI- INVASIVA**: Kernel Inoculation Assay (KIA) (Reid *et al.*, 1996): la sospensione di spore viene veicolata alla spiga primaria (zona centro-basale) tramite un'incisione di tre cariossidi, 15-20 giorni dopo l'impollinazione (DAP)

La tecnica di inoculo, tramite SETE (sia invasiva, che non invasiva), ripercorre la via di "infezione primaria," mentre la tecnica di inoculo tramite CARIOSIDI, mima la via di ingresso del fungo, descritta precedentemente come "infezione secondaria".

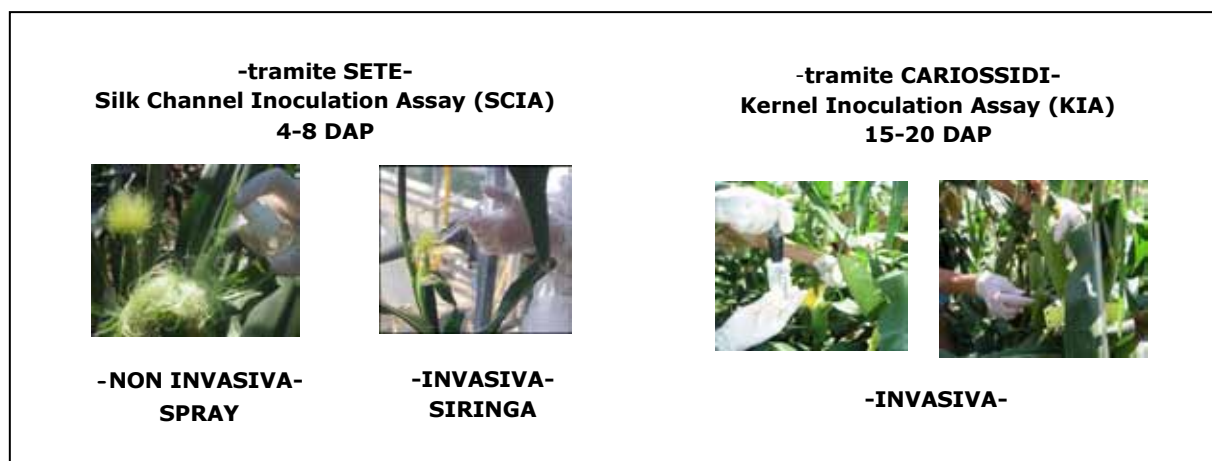


Figura 4 Applicazione dei metodi di inoculo (modificata da Ferrari e Balconi, 2008)

Il grado di attacco fungino viene registrato alla raccolta, tramite scala di valutazione basata sulla percentuale di cariossidi con segni visibili di infezione, assegnando un punteggio da 1 (0% no infezione) a 7 (76-100% cariossidi/spiga con infezione visibile), come riportato da Reid *et al.* (1996).

Una ricerca recente presso CRA-MAC è stata indirizzata a ridurre l'accumulo di aflatossine nella granella di mais mediante l'impiego e la valutazione di genotipi resistenti all'attacco da *Aspergillus*; a tale scopo 24 ibridi commerciali di mais sono stati valutati e confrontati per la

resistenza ad *A. flavus* e per l'accumulo di aflatossine, dopo inoculo artificiale di una sospensione di spore fungine appartenenti a cinque ceppi isolati nell'areale maidicolo italiano, tramite SCIA. I risultati evidenziano l'implicazione di alcuni caratteri morfo-fisiologici della spiga di mais nel determinare resistenza all'accumulo di aflatossine: la lunghezza del canale delle setole alla fioritura è risultato negativamente correlato all'accumulo di aflatossine; viceversa, un ridotto grado di copertura della spiga alla maturazione fisiologica è risultato positivamente correlato all'accumulo di aflatossine (Balconi *et al.*, 2010).

Un'ulteriore linea di ricerca è stata sviluppata da CRA-MAC, nell'ambito di un biennio, applicando la tecnica di inoculo artificiale (*Kernel Inoculation Assay-KIA*) in campo, al fine di identificare nuove fonti di variabilità genetica utili in programmi di breeding per resistenza a *F. verticillioides* (Balconi *et al.*, 2011). A tale scopo, indagini fitopatologiche sono state condotte valutando 41 linee inbred e 27 varietà mediante: i) inoculo artificiale KIA in campo, con spore fungine appartenenti a due ceppi di *F. verticillioides* isolati nell'areale maidicolo italiano, ii) valutazione visiva dell'estensione del micelio sulla spiga, iii) valutazione del contenuto di fumonisine. In corrispondenza del punto di inoculo sono state contate le cariossidi con segni visibili d'infezione da parte di *F. verticillioides*, definendo tre classi in base al numero di cariossidi contaminate (BASSO, MEDIO, ALTO). L'analisi quantitativa del contenuto in fumonisine totale (FB₁, FB₂, FB₃) è stata effettuata mediante immunodosaggio enzimatico competitivo con kit RIDASCREEN® Fumonisin della R-biopharm (Berardo *et al.* 2011). Anche per quanto riguarda il contenuto in fumonisine dei materiali inoculati, i genotipi sotto studio sono stati suddivisi in tre classi in base ad un contenuto BASSO, MEDIO, ALTO. La ricerca in corso prevede ulteriore selezione dei materiali, allo scopo di sviluppare linee di buon valore agronomico, nutrizionale e con elevata salubrità.

1.5 Analisi filogenetiche molecolari

Sono state oggetto di analisi molecolari diverse accessioni di mais, conservate nella banca del germoplasma di CRA-MAC. Una prima analisi, basata sulla tecnica AFLP ed eseguita su 71 linee italiane, considerate rappresentative della variabilità esistente nel germoplasma (Tabella 2) ha permesso di calcolare le distanze genetiche tra le accessioni e di determinare il grado di omologia molecolare tra le linee analizzate (Chittò *et al.*, 2000).

Tabella 2. Linee analizzate con relativa genealogia

Linee italiane			Linee italiane		
Linea	Background	BG ^a	Linea	Background	BG
Lo3	Nostrano d'Isola	I	Lo1125	P3374	B
Lo863	Nostrano d'Isola	L	Lo1126	Lo993xLo1063	L
Lo876	Lo876o2xBSSS	B	Lo1127	BSSSxP3551	B
Lo881	Syn C103 - BG	L	Lo1128	P3374	B
Lo902	Mo17 ² xP3780A	L	Lo1137	P3343	B
Lo903	(B73xB37) B73	B	Lo1140	Syn WF9 - BG	L
Lo904	(B73xB37) B73	B	Lo1141	Syn B37 ECB - BG	B
Lo924	(H99xMo17) H99	L	Lo1142	Lo983xLo1063	L
Lo932	Syn BS5	I	Lo1156	P3245	B
Lo933	Syn BS5xSyn GD	I	Lo1157	P3245	B
Lo937	Syn BS5	I	Lo1158	P3245	B
Lo944	Syn BS5	I	Lo1159	P3245	B
Lo950	P3183	B	Lo1160	Lo1061xLo1090	L
Lo951	P3183	B	Lo1162	Lo1061xLo1090	L
Lo960	P3183	B	Lo1166	(Lo924xLo1063) Lo924	L
Lo964	P3183	B	Lo1167	Lo904xLA47677	B
Lo976	(Mo17xLA4317) Mo17	L	Lo1168	Lo1063xP3374	B
Lo986	Syn Ostrinia	I	Lo1169	Lo904xLo1067	B
Lo999	(B37xTeosinte) B37	B	Lo1170	(Lo1063xLo1041) Lo1041	B
Lo1010	(B37xVA885) B37	I	Lo1171	LA47678xMarta	B
Lo1016	P3369AxLo876o2	B	Lo1172	Lo863xLo1059	L
Lo1035	P3183xVa59	L	Lo1173	Recovered Lo1094	B
Lo1038	P3183xVa93	L	Lo1176	Late Syn BG	B
Lo1053	Lo950xLo951	B	Lo1180	Lo1074xP3539	L

Lo1054	Lo950xLo951	B	Lo1182	Lo1059xLo1077	L
Lo1055	Lo950xLo951	B	Linee internazionali		
Lo1056	(Lo881xLo964) Lo881	L	A632	(Mt42xB14) B14 ³	B
Lo1059	P3297	L	A69Y	Plata Argentina	I
Lo1061	P3297	L	A71	Funk Yellow Dent	I
Lo1063	P3297	L	B37	BSSS	B
Lo1064	Lo8762o2xN7A	B	B57	Midland	I
Lo1066	(Lo876o2xA641) Lo876o2	B	B73	BSSS	B
Lo1067	P3780AxLo876o2	B	C103	Lancaster Sure Crop	L
Lo1074	Syn MP - BG	L	CI187-2	Krug	I
Lo1076	P3297	L	FR5	O7 Sister	I
Lo1077	P3540	L	H55	(HyxMo21A) Hy2 ²	I
Lo1086	(Lo904xLo951) Lo904	B	Mo17	CI187-2xC103	L
Lo1087	(Lo951xLo904) Lo951	B	N6	Hays Golden	I
Lo1090	(Lo881xLo964) Lo881	L	Oh07	C1540xIIIL	I
Lo1094	Syn BGSF - BG	B	Oh43	Oh40BxW8	I
Lo1095	P3189	B	Os420	Osterland Yellow Dent	I
Lo1096	P3540	L	T8	Jarvis Golden Prolific	I
Lo1101	Lo904xI26847	B	Va59	[(C103xT8 ²)x(K4xC103 ²)]	L
Lo1106	Syn BSSS - BG	B	W153	(Ia153xW8) Ia153	I
Lo1123	A632xP3540	B	W64A	WF9xCI187-2	I
Lo1124	Lo924xLo1063	L	WF9	Wilson Farm Reid	I

Recentemente, queste analisi sono state estese a un campione più ampio di 144 accessioni (Losa *et al*, 2011). Tali analisi hanno evidenziato le relative correlazioni molecolari tra i gruppi di breeding rappresentati dalle linee prese in considerazione come visualizzato nella Figura 5. La figura evidenzia come i tre principali gruppi presenti nel germoplasma considerato si distribuiscono nello spazio raffigurante la variabilità genetica presente nelle linee. È ben visibile come le accessioni appartenenti al gruppo delle "Iowa Stiff Stalk Synthetic", rappresentate in rosso, si posizionano nella parte bassa del grafico in modo ben separato dalle altre linee. Le accessioni evidenziate in verde appartenenti al gruppo di breeding "Lancaster Sure Crop", a loro volta formano gruppi separati dai materiali di origine indipendente, evidenziati in azzurro.

Nell'albero filogenetico ottenuto dalle correlazioni molecolari tra singole linee, sono ancora ben evidenti le

associazioni tra i tre principali gruppi di breeding (I, II e III, Figura 6).

Recentemente, sono state eseguite analisi molecolari su un gruppo di 54 varietà lombarde, inserite nella collezione del CRA-MAC a partire degli anni '50 (Hartings *et al*, 2008). Le analisi statistiche, eseguite sui dati derivati dai profili AFLP ottenuti per ciascuna delle varietà considerate, hanno permesso di determinare il grado di consanguineità tra le accessioni. Inoltre, è stato possibile

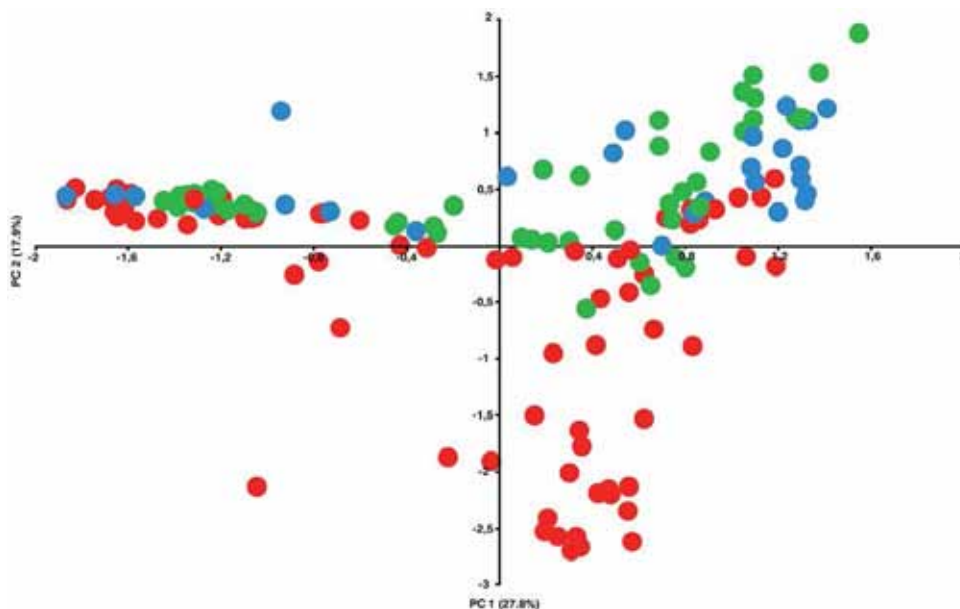


Figura 5 Analisi delle componenti principali eseguito su dati AFLP. I gruppi di breeding sono codificati con i seguenti colori: rosso - Iowa Stiff Stalk Synthetic; verde - Lancaster Sure Crop; azzurro - indipendente.

associare la variabilità rilevata tra le accessioni lombarde mediante l'utilizzo di 20 parametri morfologici con i gradi di parentela desunti con le tecnologie molecolari.

1.6 Prospettive future

Data l'esistenza di basi genetiche in grado di conferire resistenza o tolleranza alle patologie causate da funghi tossigeni, limitando fortemente il rischio di contaminazioni dei prodotti cerealicoli con micotossine, le ricerche in atto mirano a: I) introgredire accumulando (piramidazione) geni di resistenza tramite marcatori molecolari; II) identificare marcatori strettamente associati ai loci di resistenza tramite saturazione con marcatori molecolari dei loci genetici interessati dagli effetti di resistenza; III) identificare geni coinvolti nella risposta di resistenza che potranno essere sfruttati come marcatori funzionali nei processi di miglioramento genetico; IV) indagare e validare genotipi resistenti mediante infezione con patogeni micotossigeni utilizzando sistemi di inoculo controllati; V) identificare QTL e geni candidati di specifiche vie metaboliche per la resistenza a patogeni fungini condotta mediante analisi di associazione.

Le resistenze identificate potranno essere disponibili per l'immediato processo di miglioramento genetico.

Ringraziamenti

Le attività di caratterizzazione del germoplasma di mais sono state realizzate nell'ambito nei seguenti progetti: Risorse genetiche vegetali (RGV-FAO), Collezioni E-A-OR, SAFEMAIZE, AFLARID, MICOCER, ALISAL, MICOPRINCEM.

Si ringrazia la Prof.ssa P. Battilani dell'Università Piacenza per la collaborazione riguardante i ceppi di *F. verticillioides* ed *A.flavus*.

Bibliografia

- Alfieri M., Berardo N., Redaelli R., 2012. Carotenoids content in Italian maize germplasm. *Tecnica Molitoria International*, 63(13A): 82-89.
- Balconi C., Motto M., Mazzinelli G., Berardo N., 2010. Ear secondary traits related to aflatoxin accumulation in commercial maize hybrids under artificial field inoculation. *World Mycotoxin Journal* 3: 239-250.
- Balconi C., Valoti P., Berardo N., Guerrini L., Locatelli S., Lanzasova C., Redaelli R., 2011. Qualità alimentare e sicurezza di genotipi italiani di mais. In: AISTEC (ed.). *Evoluzione e rilancio della filiera dei cereali: biodiversità, sostenibilità, tecnologia e nutrizione*, pp. 178-182, Roma.

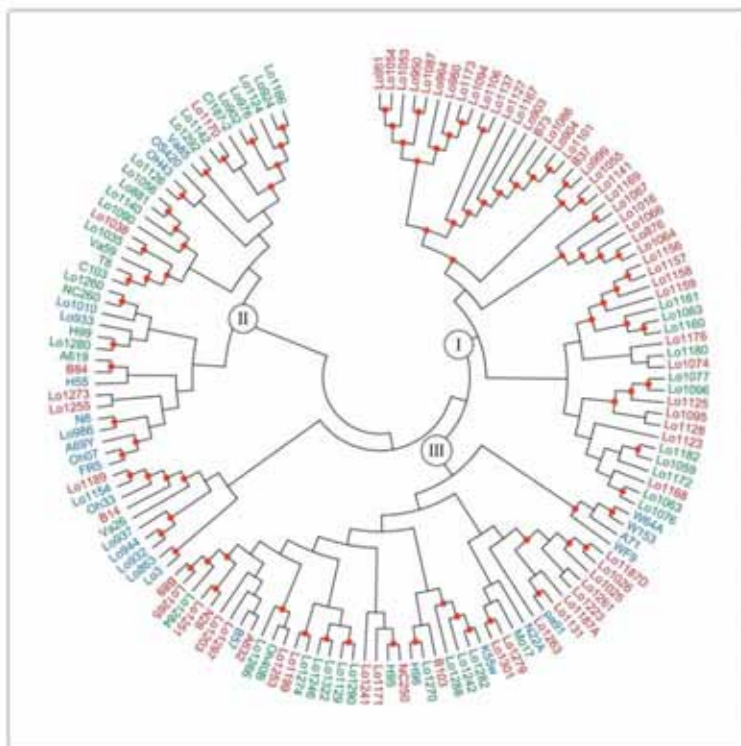


Figura 6. Analisi cluster mediante bootstrap Neighbor-joining. I punti rossi identificano i rami dell'albero con un grado di significatività superiore al 67%. I numeri romani identificano i tre gruppi eterotici: rosso - Iowa Stiff Stalk Synthetic; verde - Lancaster Sure Crop; azzurro - indipendente.

- Berardo N., Brenna O.V., Amato A., Valoti P., Pisacane V., Motto M., 2004. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5: 393-398.
- Berardo N., Mazzinelli G., Valoti P., Laganà P., Redaelli R., 2009. Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2378-2384.
- Berardo N., Lanzaova C., Locatelli S., Laganà P., Verderio A., Motto M., 2011. Levels of total fumonisins in maize samples from Italy during 2006–2008. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 4: 116–124.
- CAST-Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Aflatoxins and other mycotoxins: An agricultural perspective. Council for Agricultural Science and Technology Reports, Ames, IA (USA), pp. 50.
- Chittò A., Bertolini M., Hartings H., Verderio A., Motto M., 2000. AFLP-based genetic relationships among maize inbred lines selected in a climatically temperate location. *Maydica* 45: 257-266.
- European Commission Recommendation N 2006/576 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A,T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of European Union* 229: 7–9.
- European Commission Regulation (EC) N 1126/2007 of 28 September 2007 amending regulation (EC) N1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Official Journal of European Union* 255:14–17.
- Ferrari A., Balconi C., 2008. Tecniche di inoculo fungino per valutazione di genotipi di mais. *Dal Seme - Marzo 2008*, n° 1: 38-40.
- Hartings H., Berardo N., Mazzinelli G.F., Valoti P., Verderio A., Motto M., 2008. Assesment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP profiling. *Theor. Appl. Genet.* 117: 831-842.
- Mesterhazy A., Lemmens M., Reid L.M., 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. In maize – a review. *Plant Breeding* 131: 1-19.
- Losa A., Hartings H., Verderio A., Motto M., 2011. Assesment of genetic diversity and relationships among maize inbred lines developed in Italy. *Maydica* 56: 95-103.
- Piva G., Pietri A. 2004. Aflatossine: un pericolo per la salute umana e degli animali. *L'Informatore Agrario* 14: 7-8.
- Reid L.M., Hamilton R.I., Mather D.E. 1996. Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. *Technical Bulletin 1996-5E*, Research Branch, Agriculture and Agri-Food Canada. 1996
- Zummo N., Scott G.E., 1989. Evaluation of field inoculation techniques for screening maize genotypes against kernel infection by *Aspergillus flavus* in Mississippi. *Plant Disease* 73: 313-316.

Capitolo 2
Collezioni Farmacologiche Officinali

LA COLLEZIONE DI SALVIE*

Responsabili Scientifici: Dr. Claudio Cervelli, Dr.ssa Barbara Ruffoni

CRA-FSO Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali
Corso Inglesi, 508 – 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

Il genere *Salvia* comprende più di 900 specie diffuse allo stato spontaneo in quasi tutto il mondo. Alcune specie trovano attualmente utilizzo in campo medicinale, cosmetico, profumiero, alimentare e ornamentale, ma le potenzialità del vasto germoplasma ancora inesplorato sono notevoli, sia per l'elevata variabilità biochimica dei metaboliti secondari in esse contenuti, sia per la grande varietà di forme e colori che ne fanno un soggetto estremamente interessante per l'individuazione di nuove colture ornamentali. A tale fine il CRA-FSO ha costituito una collezione di specie, varietà e ibridi di *Salvia* che ammonta attualmente a 164 accessioni, che sono mantenute come piante (in vivo e in vitro) o come semi (conservati a 4°C). L'attività svolta per la valorizzazione della collezione a fini scientifici e produttivi riguarda la caratterizzazione morfologica e fenologica delle accessioni, studi sulla fisiologia di sviluppo, la definizione delle caratteristiche e delle problematiche propagative e agronomiche, l'individuazione di nuove colture ornamentali, la definizione di protocolli colturali. È mantenuta una costante collaborazione con produttori italiani e francesi di differenti settori produttivi. Vengono svolte attività di ricerca, in collaborazione con altre istituzioni scientifiche, riguardanti la caratterizzazione degli oli essenziali e di altri metaboliti secondari per utilizzo in campo industriale e agronomico. Una consistente attività di documentazione e divulgazione relativa al materiale vegetale in collezione consente una comunicazione continua dei risultati al mondo scientifico e produttivo.

Summary

The genus *Salvia* includes more than 900 species widespread in almost all over the world. Some species are currently used in medicine, cosmetics, food products, perfumery and ornamental field, but at present the potential of the not yet exploited germplasm is relevant, both for the high variability in the biochemistry of secondary metabolites and for the very different shapes and colors of plants for ornamental purposes. For these reasons, the CRA-FSO has raised a collection of species, varieties and hybrids of sage that currently amounts to 164 accessions, which are maintained as plants (in vivo or in vitro) or as seeds (at 4°C). The activities for the enhancement of the collection for both scientific and productive purposes include the morphological and phenological characterisation of the accessions, studies on the physiology of development, settlement of propagative and agronomic performances, the identification of new ornamental crops, the establishment of cultural protocols. Collaborations are constantly maintained with French and Italian growers. Research activities are carried out in collaboration with other scientific institutions, with regard to the characterization of essential oils and other secondary metabolites for use in industrial and agronomic field. A relevant documentation and dissemination activity on plant material in the collection allows a continuous transfer of results to the scientific and productive world.

Parole chiave

Valutazione, ornamentali, metaboliti, morfologia, fioritura, fisiologia, aroma, nuove colture

Keywords

Evaluation, ornamentals, metabolites, morphology, flowering, physiology, aroma, new crops

* doi:10.4458/0986-23

1.1 Il genere *Salvia*

Nell'ambito della famiglia delle *Lamiaceae* rappresenta il genere botanico più numeroso, annoverando oltre 900 specie (Alziar G., 1988-1993; Clebsch B., 2003; Froissart C., 2008), a cui si aggiungono decine di ibridi interspecifici (di origine naturale o non) e centinaia di cultivars.

Allo stato spontaneo il genere *Salvia* è presente in tutti i continenti eccetto l'Australia (in cui si trovano alcune specie naturalizzate), con diffusione nelle regioni temperate e tropicali dei due emisferi ed escursione altitudinale dal livello del mare a oltre 3400 m..

Sei zone geografiche costituiscono i centri di biodiversità di questo genere botanico: negli stati centro-meridionali degli U.S.A. sono presenti 40 specie (nella sola California ne esistono 17); l'America Centrale ne conta circa 300, risultando l'area messicana la zona di maggior presenza di *taxa*; 210 specie sono originarie del Sud-America, 250 dell'area comprendente il Bacino Mediterraneo e l'Asia Occidentale; circa 30 crescono nell'Africa australe, 90 nell'Asia Orientale (Walker *et al.*, 2004; Epling C., 1939). In Italia sono spontanee o naturalizzate 18 specie (Pignatti, 1982).

1.2 Gli usi delle salvie

L'uso delle salvie è testimoniato da secoli presso molte civiltà e popoli: ad esempio nel Bacino Mediterraneo la *S. officinalis* è impiegata fin dal tempo degli antichi Egizi per scopi medicinali, mentre il suo uso alimentare è uno degli elementi tipici della cucina mediterranea; la *S. miltiorrhiza* è utilizzata in Cina da secoli contro malattie cardio-vascolari; i semi di *S. columbariae* e *S. hispanica* costituivano un'importante fonte nutritiva per gli Indios americani; l'efficacia curativa della *S. africana-caerulea* in problemi dell'apparato gastro-intestinale e respiratorio era ben conosciuta dagli aborigeni sudafricani (Campbell P., 1999; Hareuveni N., 1996; Watt *et al.* 1962; Yokozawa, 2000).

Nel secolo scorso diverse specie di salvia sono entrate di comune uso nel campo ornamentale, tra cui soprattutto la *S. splendens*, una delle specie annuali più utilizzate nei giardini come pianta da bordura, e la *S. farinacea*, il cui impiego si è molto diffuso nell'ultimo decennio (Nau, 1996; Sutton, 1999; Carlson, 1983).

Recenti ricerche scientifiche hanno confermato le proprietà terapeutiche di numerose specie presenti nella tradizione etnobotanica. Esse risultano fonti di metaboliti secondari come flavonoidi ed isoprenoidi (monoterpeni, sesquiterpeni, diterpeni e triterpeni) (Croteau e Johnson, 1984; Wollenweber, 1985) che hanno dimostrato di mediare interazioni ecologiche in genere difensive con altri organismi, es. attività anti-insetto (antifeedant), anti-batteriche, anti-fungine ed antiossidanti (Kelsey *et al.*, 1984; Wagner, 1991; Bell, 1981; Croteau, 1977; Muller *et al.*, 1964; Theis e Lerda, 2003; Dweck, 2000). Tali composti possono essere considerati potenti ecochemicals per la difesa dei vegetali (Cowan, 1999; Dixon, 2001; Gebbink *et al.*, 2002; Pare e Tumlinson, 1999; Arikat *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2004), interessanti componenti per la definizione di formulazioni agrochimiche per la difesa delle colture in sistemi agricoli biologici o integrati e, infine, promettenti molecole dotate di attività biologica nei confronti di numerosi batteri umani (Weckesser *et al.*, 2007).

Dal punto di vista della chimica degli alimenti si può sottolineare che la presenza di sostanze polifenoliche è alla base dell'elevata attività antiossidante dimostrata da vari estratti vegetali, ed in particolare da diverse specie di *Salvia* (Demo *et al.*, 1998; Kamatoua *et al.*, 2005; Santos-Gomes *et al.*, 2002; Suhaj, 2006; Tepe *et al.*, 2006; Tepe *et al.*, 2007; Yinrong e Yeap Foo, 2002); infatti ciò è causa dell'impiego delle foglie di diverse specie quali la *S. officinalis* come antiossidanti in cibi, additivi alimentari e cosmetici. La *S. sclarea* (pianta intera) è utilizzata nella preparazione del Vermouth.

Nel campo ornamentale l'attività di introduzione di nuove specie è stata rilevante, portando alla selezione di varietà e ibridi dalla ricca e prolungata fioritura spesso facilmente adattabili alle condizioni ambientali mediterranee.

1.3 La collezione del CRA-FSO

Il CRA-FSO ha iniziato la propria attività di ricerca sulle Salvie a partire dal 2004 per le interessanti prospettive di multifunzionalità di molte specie appartenenti a questo genere botanico.

I progetti che hanno interessato le salvie sono stati 3 INTERREG-ALCOTRA italo-francesi denominati "Sviluppo a scopi commerciali delle potenzialità del genere *Salvia* L." (n. 74, 2004-2006), "Savie: nuovi prodotti" (n. 231, 2007-2009) e "AROMA" (n. 68, 2010-2012), il programma interregionale REVFLOR (2007-2009), il progetto nazionale BIODATI (2011-2014).

Funzionale all'attività prevista dai progetti è stato l'instaurarsi di una collezione di specie e varietà, in particolare riguardante accessioni con caratteristiche ornamentali interessanti e con peculiare aroma.

Obiettivi della collezione sono l'individuazione e valorizzazione di nuove specie utilizzabili per la diversificazione produttiva nel comparto delle piante in vaso (piante fiorite, piante aromatiche e da fogliame ornamentale), del reciso e delle piante da giardino (con particolare riguardo per queste ultime a quelle coltivabili con criteri di limitata manutenzione). Inoltre, un altro importante obiettivo, perseguito in collaborazione con altre istituzioni, è l'ottenimento di sostanze naturali impiegabili in campo farmaceutico, cosmetico, profumiero, alimentare e per la costituzione di antiparassitari a basso impatto ambientale. (Cervelli e Capponi, 2006).

La collezione ha raggiunto attualmente le 164 accessioni (specie, ibridi e cultivars) (sito web del CRA-FSO, 2011). Le accessioni presenti sono riportate in tabella 1.

In foto 1 sono riportate immagini di alcune delle specie e varietà in collezione presso il CRA-FSO.

Tabella 1 – Le accessioni di *Salvia* presenti presso il CRA-FSO.

<i>Salvia adenophora</i>	<i>Salvia microphylla</i> var. <i>neurepia</i>
<i>Salvia aethiopis</i>	<i>Salvia miniata</i>
<i>Salvia albicaulis</i>	<i>Salvia miriantha</i>
<i>Salvia algeriense</i> (S)	<i>Salvia muiirii</i>
<i>Salvia apiana</i> (S)	<i>Salvia multicaulis</i>
<i>Salvia argentea</i> (S)	<i>Salvia munzii</i>
<i>Salvia aurea</i> 'Kirtenbosch'	<i>Salvia namaensis</i>
<i>Salvia aurita</i>	<i>Salvia nemorosa</i> (S)
<i>Salvia barrelieri</i> (S)	<i>Salvia nilotica</i> (S)
<i>Salvia blancoana</i>	<i>Salvia nubicola</i> (S)
<i>Salvia blepharophylla</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Berggarten'
<i>Salvia broussonetti</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Crispa'
<i>Salvia buchananii</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Icterina'
<i>Salvia cacaliifolia</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Linea 4'
<i>Salvia cadmica</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Maxima'
<i>Salvia canariensis</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Purpurascens'
<i>Salvia candelabrum</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Rothmuhle'
<i>Salvia chamaedryoides</i> var. <i>isochroma</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Rotundifolia'
<i>Salvia chamalaeagnea</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Tricolor'
<i>Salvia chiapensis</i>	<i>Salvia officinalis</i> 'Wurzburg'
<i>Salvia chionantha</i>	<i>Salvia officinalis</i> RB1
<i>Salvia cinnabarina</i>	<i>Salvia officinalis</i> RB2
<i>Salvia coccinea</i> (S)	<i>Salvia officinalis</i> RB3
<i>Salvia corrugata</i>	<i>Salvia officinalis</i> RB4
<i>Salvia darcyi</i>	<i>Salvia officinalis</i> RB5
<i>Salvia dentata</i>	<i>Salvia officinalis</i> RB6
<i>Salvia desoleana</i>	<i>Salvia officinalis</i> VERDE 1
<i>Salvia dichroanta</i>	<i>Salvia officinalis</i> VERDE 2
<i>Salvia discolor</i>	<i>Salvia oxyphora</i>
<i>Salvia disermas</i>	<i>Salvia pachyphylla</i>
<i>Salvia dollicantia</i> (S)	<i>Salvia patens</i> (S)
<i>Salvia dolomitica</i>	<i>Salvia patens</i> 'Lavender Lady'
<i>Salvia dominica</i>	<i>Salvia patens</i> 'White Trophy'
<i>Salvia dorisiana</i>	<i>Salvia polistachya</i>
<i>Salvia dorrii</i>	<i>Salvia pomifera</i> – 1
<i>Salvia elegans</i> 'Scarlet Pineapple'	<i>Salvia pomifera</i> – 2

<i>Salvia fruticosa</i>	<i>Salvia pratensis</i> (S)
<i>Salvia gesneriflora</i>	<i>Salvia recognita</i> (S)
<i>Salvia greggi</i> 'Alba'	<i>Salvia repens</i> (S)
<i>Salvia greggi</i> 'James Compton'	<i>Salvia ringens</i>
<i>Salvia greggi</i> 'Keter's Red'	<i>Salvia roemeriana</i> (S)
<i>Salvia greggi</i> 'Peach'	<i>Salvia roscida</i>
<i>Salvia greggi</i> 'Stormy Pink'	<i>Salvia runcinata</i> (S)
<i>Salvia greggi</i> 'Yellow'	<i>Salvia scabra</i>
<i>Salvia haenkei</i>	<i>Salvia sclarea</i> (S)
<i>Salvia heldreichiana</i>	<i>Salvia semiatrata</i>
<i>Salvia henryi</i> (S)	<i>Salvia sinaloensis</i>
<i>Salvia horminum</i> (S)	<i>Salvia somalensis</i>
<i>Salvia ianthina</i>	<i>Salvia spathacea</i>
<i>Salvia indica</i> (S)	<i>Salvia staminea</i> (S)
<i>Salvia interrupta</i>	<i>Salvia stenophylla</i> (S)
<i>Salvia involucrata</i>	<i>Salvia subrotunda</i> (S)
<i>Salvia involucrata</i> 'Bethellii'	<i>Salvia tingitana</i>
<i>Salvia involucrata</i> 'Hidalgo'	<i>Salvia tomentosa</i>
<i>Salvia involucrata</i> 'Boutin'	<i>Salvia transsylvanica</i>
<i>Salvia involucrata</i> 'Hadspen'	<i>Salvia urica</i>
<i>Salvia iodantha</i>	<i>Salvia verbenaca</i> (S)
<i>Salvia karvinskii</i>	<i>Salvia verticillata</i> (S)
<i>Salvia lanigera</i> (S)	<i>Salvia verticillata</i> 'Alba' (S)
<i>Salvia lavandulifolia</i>	<i>Salvia virgata</i> (S)
<i>Salvia lavandulifolia</i> ssp. <i>gallica</i>	<i>Salvia wagneriana</i>
<i>Salvia lavandulifolia</i> ssp. <i>oxyodon</i>	<i>Salvia x jamensis</i> 'Dyson's Orange Pink'
<i>Salvia lavandulifolia</i> ssp. <i>vellerea</i>	<i>Salvia x jamensis</i> 'El Durango'
<i>Salvia leucantha</i>	<i>Salvia x jamensis</i> 'La Luna'
<i>Salvia leucantha</i> 'Eder'	<i>Salvia x jamensis</i> 'La Siesta'
<i>Salvia leucantha</i> 'Purple Velvet'	<i>Salvia x jamensis</i> 'Pat Vlasto'
<i>Salvia leucantha</i> 'Santa Barbara'	<i>Salvia x jamensis</i> 'Cherry Queen'
<i>Salvia leucophylla</i>	<i>Salvia</i> 'Allen Chickering'
<i>Salvia libanotica</i>	<i>Salvia</i> 'Amparito'
<i>Salvia lyrata</i> (S)	<i>Salvia</i> 'Anthony Parker'
<i>Salvia madrensis</i>	<i>Salvia</i> 'Bee's Bliss'
<i>Salvia mellifera</i>	<i>Salvia</i> 'Caramba'
<i>Salvia microphylla</i> 'Baby Sage'	<i>Salvia</i> 'Chateau Chatare'
<i>Salvia microphylla</i> 'Hot Lips'	<i>Salvia</i> 'Christine Yeo'
<i>Salvia microphylla</i> 'Huntington'	<i>Salvia</i> 'Dorset Wonder'
<i>Salvia microphylla</i> 'Pink Bush'	<i>Salvia</i> 'Furman's Red'
<i>Salvia microphylla</i> 'Pleasant View'	<i>Salvia</i> 'Mulberry Jam'
<i>Salvia microphylla</i> 'Trenance'	<i>Salvia</i> 'Mystic Spires'
<i>Salvia microphylla</i> 'La Trinidad'	<i>Salvia</i> 'Navajo'
<i>Salvia microphylla</i> 'Le Pradet'	<i>Salvia</i> 'Phyllis Fancy'
<i>Salvia microphylla</i> 'Maraschino'	<i>Salvia</i> 'Purple Queen'
<i>Salvia microphylla</i> 'Royal Bumble'	<i>Salvia</i> 'Waverly'

(S) = l'accessione è mantenuta sotto forma di semi conservati a 4°C.

Foto 1 – Alcune delle specie e varietà di Salvia in collezione presso il CRA-FSO.



S. adenophora



S. algeriensis



S. 'Allen Chickering'



S. aurea 'Kirtenbosch'



S. buchananii



S. cacaliifolia



S. canariensis



S. cinnabarina



S. chiapensis



S. chamaedryoides var.
isochroma



S. darcy



S. discolor



S. dolomitica



S. dominica



S. dorisiana



S. gesneriflora



S. fruticosa



S. ianthina



S. indica



S. interrupta



S. involucrata



S. iodantha



S. lanigera



S. karvinski



S. leucantha



S. madrensis



S. muirii



S. 'Mystic Spires'



S. officinalis 'Rothmuhle'



S. oxyphora

La collezione di salvie



S. patens



S. polystackia



S. pomifera



S. roemeriana



S. semiatrata



S. spathacea



S. verticillata



S. wagneriana



S. greggii 'Caramba'



S. microphylla 'Trenance'



S. microphylla 'Hot Lips'



S. x jamensis 'James Compton'



S. x jamensis 'Pat Vlasto'



S. 'Purple Queen'



S. x jamensis 'Yellow'

La collezione delle Salvie viene mantenuta presso la sede del CRA-FSO (43° 49' 02" N, 7° 45' 33" E) a Sanremo; la maggior parte delle accessioni è rappresentata da piante coltivate in vivo in pien'aria in contenitori di plastica (foto 2) che, secondo le dimensioni e la vigoria della specie/varietà, possono arrivare fino a 60 cm di diametro. Ogni accessione è rappresentata da 2 piante nel caso di coltivazione in vasi fino a 30 cm di diametro, da 1 pianta per le accessioni

coltivate in mastelli da 60 cm. Una parte minore delle accessioni è mantenuta sotto forma di seme (indicate con la lettera S nell'elenco della tabella 1) a 4°C.

Foto 2 – Parte della collezione delle Salvie, con piante coltivate in contenitore.



L'irrigazione è effettuata tramite impianto a goccia automatizzato con programmatore a tempo. Il substrato di coltivazione è di tipo per coltivazioni vivaistiche e contiene circa il 15% di pomice (diametro 7-12 mm); specie particolarmente sensibili al ristagno idrico (in genere coincidenti con quelle più resistenti all'aridità) sono coltivate nello stesso tipo di substrato addizionato con perlite (1:1 in volume). Quando le piante diventano troppo grandi o invecchiate per poter crescere e svilupparsi adeguatamente nei contenitori menzionati, vengono rinnovate tramite l'ottenimento di nuove piantine (con propagazione per seme o per radicazione di talea, secondo i casi); successive rinvasature permettono nel tempo alle piante di crescere in condizione ottimali di disponibilità idrica e nutrizionali fino al successivo rinnovo. Ad ogni invasatura viene aggiunto nel substrato un concime a rilascio controllato con rapporto equilibrato N:P₂O₅:K₂O (con microelementi) della durata di 5-6 mesi alla dose di 4 g/l. Successive necessità nutrizionali delle piante sono soddisfatte attraverso periodiche fertirrigazioni alla dose di 1,5 g/l. Trattamenti antiparassitari di routine vengono effettuati soprattutto contro insetti (in particolare aleuroididi, ma anche afidi e larve di lepidotteri) e miceti (prevalentemente oidio).

Per molte specie di origine tropicale l'accrescimento risulta piuttosto rapido, per cui le necessità di rinvasature o l'ottenimento di giovani piante per sostituire quelle troppo ingombranti o invecchiate risultano piuttosto onerosi. Le caratteristiche climatiche del sito di collezione (tabella 2) consentono alle piante di evitare danni da gelate e di vegetare per tutto l'anno, ad eccezione del periodo centrale dell'inverno, permettendo anche a piante sensibili al freddo di manifestare le naturali caratteristiche di fioritura in qualsiasi periodo dell'anno.

Tabella 2 - Caratteristiche climatiche del sito di collezione delle salvie (Sanremo, anno 2010):

Media	Temperatura (°C)		Umidità relativa (media)	Piovosità (mm)	Radiazione globale (Wh/mq)
	Min. assoluta	Max. assoluta			
16,0	- 0,9	32,7	68,9	696,8	1.570.128,15

1.4 Caratterizzazione e valorizzazione della collezione

Gli obiettivi sopra riportati vengono perseguiti attraverso una serie di attività volte sia alla caratterizzazione delle accessioni dal punto di vista biologico e agronomico sia alla valorizzazione produttiva, in collaborazione con istituzioni nazionali ed estere che si occupano anche di biochimica, farmaceutica e microbiologia, con associazioni di produttori e privati del settore medicinale, alimentare, agronomico e profumiero, con ibridatori del settore ornamentale, con istituzioni volte alla formazione e alla divulgazione.

L'attività di caratterizzazione del germoplasma è strettamente correlata con quella di valorizzazione in funzione dei risultati ottenuti, proseguendo sulle specie e varietà più promettenti con ricerche e studi particolari. Nel complesso queste attività riguardano le seguenti tematiche:

1. Caratterizzazione morfologica e identificazione varietale;
2. Caratterizzazione fenologica;
3. Caratterizzazione fisiologica;
4. Definizione delle caratteristiche propagative;
5. Valutazione ornamentale e individuazione di nuove potenziali colture;
6. Valorizzazione del germoplasma in ambito produttivo;
7. Caratterizzazione degli oli essenziali e di altri metaboliti secondari.

1.4.1 Caratterizzazione morfologica e identificazione varietale

Misurazioni biometriche, analisi morfologiche e osservazioni protratte nel tempo delle caratteristiche specifiche delle accessioni hanno permesso non solo un'approfondita descrizione di specie e cultivar ma anche di verificare la corretta (o non) identificazione della maggior parte del materiale vegetale acquisito dalle diverse fonti, attraverso il confronto con le descrizioni riportate in testi botanici e descrizioni varietali presenti in letteratura. Tale fase ha rivestito fondamentale importanza nell'utilizzo del corretto materiale vegetale oggetto di ricerche scientifiche.

Per l'identificazione e l'acquisizione di nuovo materiale vegetale sono stati sviluppati rapporti con vivai specializzati in Italia e all'estero, con Orti Botanici e con specialisti del genere *Salvia*. La massa di dati e foto raccolti ha dato origine a documentazione descrittiva e di importanza tecnica e scientifica (v. documentazione).

1.4.2 Caratterizzazione fenologica

L'attività riguarda la registrazione dei flussi di fioritura e il periodo di attività vegetativa, evidenziando l'eventuale produzione di seme e acquisendo materiale fotografico in particolare sulla fioritura.

Si possono distinguere due gruppi principali di salvie in funzione del periodo di formazione dei fiori: a) specie a fioritura primaverile-estiva; b) specie a fioritura autunno-invernale (Cervelli *et al.*, in stampa).

Per le prime, la maggiore produzione di fiori si ha in genere tra metà primavera e inizio estate, con un'ulteriore fioritura (di minore intensità) a partire da fine estate; gli ultimi fiori possono essere presenti fino a fine novembre. Alcune di queste specie presentano solo il 1° flusso di fioritura (ad esempio arbusti come *S. apiana*, *S. canariensis*, *S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. candelabrum*, o specie erbacee come *S. aethiopis*, *S. argentea*, *S. nilotica*, *S. barrelieri*, *S. cadmica*, *S. cyanescens*, *S. forskalei*, *S. indica*, *S. juriscii*, *S. sclarea*, *S. transsylvanica*, *S. officinalis* (tutte le cultivars). La fioritura di questo gruppo è talvolta particolarmente precoce (marzo-aprile in *S. dolomitica*).

Evidenziano una fioritura più estesa temporalmente (primaverile-estiva o primaverile-autunnale) *S. blepharophylla*, *S. barrelieri*, *S. brussonetii*, *S. buchananii*, *S. cacaliifolia*, *S. canariensis*, *S. chamaedryoides* var. *isochroma*, *S. corrugata*, *S. darcy*, *S. desoleana*, *S. disermas*, *S. dominica*, *S. ianthina*, *S. haenkei*, *S. oxyphora*, *S. scabra*, *S. namaensis*, *S. sinaloensis*, *S. somalensis*, *S. tingitana*, *S. verticillata*, *S. urica*, *S. 'Christine Yeo'*, *S. 'Mulberry Jam'*, tutte le cultivars di *S. greggii*, *S. microphyllae*, *S. x jamensis* e *S. coccinea*.

S. roemeriana presenta una fioritura primaverile e una successiva rifioritura autunnale, intervallate da una fase estiva in cui i fiori sono quasi invisibili, essendo di tipo cleistogamo.

Nelle salvie a fioritura autunno-invernale l'inizio della formazione dei fiori oscilla tra l'inizio dell'autunno e l'inizio dell'inverno. Nelle specie più precoci esiste un flusso autunnale

abbondante alla cui fine segue, dopo due-tre mesi, un nuovo flusso di intensità simile al precedente o di poco inferiore, che può durare fino a metà primavera; il periodo tra le due fioriture coincide col periodo più freddo dell'anno. Specie con questo periodo di fioritura sono *S. semiatrata*, *S. elegans*, *S. cinnabarina*, *S. madrensis*, *S. chiapensis*, *S. dorisiana*, *S. iodantha*, *S. fallax*, *S. adenophora*, *S. wagneriana*, *S. gesneriiflora*, *S. karvinskii*, tutte le cultivars di *S. involucreta* e di *S. leucantha*, *S. 'Anthony Parker'*, *S. 'Waverly'*, *S. 'Phyllis Fancy'*.

S. discolor mostra una fioritura per tutto l'arco dell'anno, anche se di entità variabile.

Il periodo di fioritura di alcune specie è riportato in figura 1.

Figura 1 - Periodo di fioritura di alcune specie di *Salvia* (zona climatica degli agrumi). Il colore riportato per ciascuna specie rispecchia quello reale della corolla.

Specie	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lugl	Ago	Sett	Ott	Nov	Dic
<i>S. blefarophylla</i>					Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	
<i>S. canariensis</i>					Pink	Pink						
<i>S. chamaedryoides</i>				Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	
<i>S. chiapensis</i>		Pink	Pink	Pink							Pink	Pink
<i>S. coccinea</i> 'Brenthurst'				Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	
<i>S. dolomitica</i>			Pink	Pink								
<i>S. dorisiana</i>	Pink	Pink	Pink	Pink								
<i>S. elegans</i> 'Scarlet Pineapple'	Red	Red	Red	Red						Red	Red	Red
<i>S. leucantha</i> 'Purple Velvet'			Pink	Pink	Pink					Pink	Pink	Pink
<i>S. madrensis</i>										Yellow	Yellow	Yellow
<i>S. microphylla</i> var. <i>neurepia</i>				Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	
<i>S. nilotica</i>						Blue						
<i>S. officinalis</i>					Pink	Pink						
<i>S. patens</i>					Blue	Blue		Blue	Blue	Blue		
<i>S. scabra</i>				Pink	Pink	Pink			Pink	Pink		
<i>S. S. semiatrata</i>	Pink	Pink		Pink	Pink						Pink	Pink
<i>S. sinaloensis</i>					Blue	Blue	Blue		Blue	Blue	Blue	
<i>S. verticillata</i>					Pink	Pink	Pink					
<i>S. virgata</i>						Pink			Pink			
<i>S. wagneriana</i>	Red	Red										Red
<i>S. x jamensis</i> 'La Siesta'					Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	Pink	

La capacità di produzione di semi è di entità molto variabile secondo le accessioni, in relazione probabilmente alla presenza o assenza di idonei impollinatori. Molte specie dell'America tropicale sono infatti impollinate, nel loro ambiente naturale, da piccoli uccelli, mentre nelle nostre aree gli unici impollinatori attivi sono insetti; producono seme scarso o nullo le seguenti specie e cultivars: *S. adenophora*, *blepharofilla*, *buchananii*, *calaliifolia*, *chiapensis*, *cinnabarina*, *corrugata*, *discolor*, *dorisiana*, *elegans*, *fallax*, *gesneriiflora*, *haenkei*, *ianthina*, *involucreta* cvs., *iodantha*, *karvinski*, *leucantha* cvs., *madrensis*, *microphylla* cvs., *oxyphora*, *semiatrata*, *sinaloensis*, *somalensis*, *urica*, *wagneriana*, 'Caramba', 'Christine Yeo', 'Mulberry jam', 'Phyllis Fancy', 'Waverly'; per la loro moltiplicazione è perciò necessario ricorrere alla propagazione vegetativa.

La produzione di seme sulle restanti accessioni della collezione è variabile ed è molto abbondante in genere sulle specie erbacee o suffruticose, molte delle quali sono di origine eurasiatica.

1.4.3 Caratterizzazione fisiologica

Al fine di valutare la reattività fotoperiodica di alcune specie di *Salvia* a fioritura invernale con buone caratteristiche ornamentali, sono state effettuate prove su alcune specie a fioritura invernale (*S. wagneriana*, *S. iodantha* e *S. gesneriflora*) coltivate in vaso. I risultati hanno nettamente evidenziato, come in altre specie che fioriscono nello stesso periodo (Zanin e Erwin, 2006), la reattività al fotoperiodo delle tre specie, la cui fioritura è completamente inibita da un fotoperiodo di 16 ore; al contrario il fotoperiodo di 12 ore ha permesso la formazione di infiorescenze in tutte e tre le specie dopo un determinato numero di nodi vegetativi (Cervelli *et al.*, 2010). Questa ricerca è stata oggetto di una tesi di laurea (D'Adamio E., 1998). È stata studiata la reattività alla temperatura di *S. roemeriana*, al fine di chiarire l'effetto di tale fattore sulla crescita della pianta e sulle caratteristiche morfologiche dei fiori, per i quali era stata osservata una netta influenza stagionale sulle dimensioni. L'incremento della temperatura ha determinato un aumento lineare della velocità di crescita della pianta tra 6 e 24°C (numero di nodi vegetativi formato per mese), ma la temperatura non ha influenzato il numero di nodi sotto l'infiorescenza. È emersa un'influenza negativa delle alte temperature sulla dimensione del fiore ed una maggiore sensibilità a tale fattore delle piante più giovani (Cervelli *et al.*, 2012).

1.4.4 Definizione delle caratteristiche propagative

Questa è un'attività essenziale per l'ottenimento di nuove piante sia al momento del rinnovo della collezione sia per l'esecuzione di prove su particolari specie. Molta attività è stata effettuata per valutare su un'ampia gamma di specie le caratteristiche di germinabilità del seme e le capacità di propagazione per via vegetativa (nel caso di specie che non producono seme o di materiale selezionato).

1.4.4.1 Germinabilità del seme

Una panoramica sulle caratteristiche germinative di molte specie di *Salvia* è riportato in tab. 3.

Tabella 3 – Dati sulle caratteristiche del seme e sulla germinabilità di 48 specie del genere *Salvia* a 24±1°C (Mascarello *et al.*, 2008).

Specie	Germinabilità (%) (*)	T.M.G. (giorni)	Specie	Germinabilità (%) (*)	T.M.G. (giorni)
<i>S. africana lutea</i>	44,0 ± 4,6	9.0 ± 1.9	<i>S. nilotica</i>	92,0 ± 0	3.3 ± 0.1
<i>S. apiana</i>	2,0 ± 2,0	n.r.	<i>S. nubicola</i>	62,0 ± 4,2	7.5 ± 0.4
<i>S. argentea</i>	85,0 ± 6,0	2.3 ± 1.3	<i>S. officinalis</i>	95,0 ± 3,8	5.2 ± 0.4
<i>S. austriaca</i>	86,0 ± 2,0	3.5 ± 0.1	<i>S. patens</i>	100,0 ± 0	4.1 ± 0.3
<i>S. barrelieri</i>	58,0 ± 4,8	19.1 ± 0.6	<i>S. pratensis</i>	9,0 ± 3,4	4.3 ± 1.6
<i>S. broussonetii</i>	7,0 ± 3,0	13.4 ± 4.3	<i>S. recognita</i>	2,0 ± 2,0	n.r.
<i>S. chamaedryoides</i>	3,0 ± 3,0	n.r.	<i>S. repens</i>	70,0 ± 4,2	8.1 ± 0.3
<i>S. carduea</i>	1,0 ± 1,0	n.r.	<i>S. roborowski</i>	83,0 ± 3,5	6.1 ± 0.4
<i>S. clevelandii</i>	22,0 ± 5,3	7.3 ± 1.5	<i>S. roemeriana</i>	100,0 ± 0	7.0 ± 3.2
<i>S. coccinea "Brenthurst"</i>	100,0 ± 0	3.2 ± 0.1	<i>S. rugosa</i>	92,0 ± 5,6	3.3 ± 0.2
<i>S. coccinea "Lady in Red"</i>	100,0 ± 0	3.4 ± 0.2	<i>S. runcinata</i>	84,0 ± 1,6	5.4 ± 0.4
<i>S. columbariae</i>	46,0 ± 4,8	7.1 ± 1	<i>S. scabra</i>	66,0 ± 9,6	15 ± 1.9
<i>S. cyanescens</i>	12,0 ± 5,1	5.3 ± 2.0	<i>S. sclarea</i>	100,0 ± 0	3.0 ± 0.6
<i>S. disermas</i>	90,0 ± 3,5	3.5 ± 0.1	<i>S. staminea</i>	97,0 ± 3,0	3.3 ± 0.1
<i>S. dominica</i>	85,0 ± 6,0	6.7 ± 0.8	<i>S. stenophylla</i>	85,0 ± 3,4	5.4 ± 0.3
<i>S. grandiflora</i>	64,0 ± 4,4	10.1 ± 0.6	<i>S. superba</i>	61,0 ± 11,5	3.4 ± 0.2
<i>S. hispanica</i>	78,0 ± 5,3	4.4 ± 0.3	<i>S. tiliifolia</i>	100,0 ± 0	3.1 ± 0.1
<i>S. horminum</i>	82,0 ± 7,6	4.9 ± 1.5	<i>S. tingitana</i>	74,0 ± 3,8	4.9 ± 0.1
<i>S. indica</i>	100,0 ± 0	3.3 ± 0.2	<i>S. transsylvanica</i>	61,0 ± 4,1	4.7 ± 0.2
<i>S. iodantha</i>	84,0 ± 6,3	3.8 ± 0.1	<i>S. verbenaca</i>	3,0 ± 1,0	n.r.
<i>S. juriscii</i>	69,0 ± 7,2	3.6 ± 0.2	<i>S. verticillata "Alba"</i>	24,0 ± 5,4	7.2 ± 1.3
<i>S. lyrata</i>	72,0 ± 4,3	19.7 ± 0.5	<i>S. virgata</i>	51,0 ± 9,1	4.3 ± 0.9
<i>S. algeriense</i>	62,0 ± 3,5	6.1 ± 1.0	<i>S. viscosa</i>	33,0 ± 5,0	10.7 ± 4.3
<i>S. mellifera</i>	1,0 ± 1,0	n.r.			

(*) dopo 45 giorni

Sono state effettuate in laboratorio prove di germinabilità in capsule Petri su alcune specie che avevano evidenziato una limitata germinabilità quali *S. haematodes*, *S. juriscii*, *S. lanigera*, *S. virgata*, *S. verticillata*. È stato testato l'effetto sia di un trattamento con GA₃ (0, 100, 200, 400 ppm) sia della luce.



I risultati evidenziano un effetto positivo della luce su alcune specie; infatti nel caso della *S. roemeriana* la germinabilità è stata quasi nulla in presenza di luce ed oltre il 90% in assenza di luce (foto 3).

È stato analizzato su *S. virgata*, *S. pratensis* e *S. pratensis* subsp. *haematodes* l'effetto dei seguenti fattori sulla germinazione: presenza di gibberelline (0, 250, 500, 750 ppm di GA₃), livello di temperatura (da 4°C a 35°C, con intervalli di 5 °C), stratificazione fredda del seme (0, 15, 30, 60 giorni a 4°C), presenza/assenza

Foto 3 – Semi di *S. roemeriana* in germinazione

di luce. È emerso che il livello di germinabilità migliore è 20°C per *S. pratensis* subsp. *haematodes*, 15°C per *S. virgata*, 20°C per *S. pratensis*. Mentre sulla subsp. *haematodes* e su *S. virgata* non c'è alcun effetto positivo sia della vernalizzazione che dell'applicazione delle gibberelline, in *S. pratensis* il pre-trattamento del freddo per 30 giorni e una dose fino a 750 ppm di gibberelline possono incrementare la germinabilità del seme (Mascarello *et al.*, 2010). L'effetto della presenza di luce o meno durante la germinazione sembra non essere significativamente influente sulla germinabilità dei semi delle tre specie di Salvia testate.

1.4.4.2 Propagazione vegetativa (in vivo)

Sono state effettuate radiazioni di talee di varie specie in differenti periodi dell'anno, con particolare riguardo alle specie utilizzate nelle prove e a quelle risultate interessanti per uso ornamentale.

Sono stati definiti i periodi dell'anno in cui le percentuali di radicazione sono massime; emerge nel complesso una notevole facilità di radicazione delle talee delle salvie (con pochissime eccezioni), purché si utilizzi un ambiente di radicazione adatto (foto 4).



Foto 4 – Talee di Salvia in radicazione sotto mist

Nella tabella 4 si riportano dati riassuntivi sulla percentuale di radicazione di diverse specie:

Tabella 4 – Effetto del genotipo sulla radicazione delle talee.

Specie	Miglior risultato		Specie	Miglior risultato	
	Radicazione (%)	Periodo		Radicazione (%)	Periodo
<i>S. adenophora</i>	100	Marzo	<i>S. grandiflora</i>	50	Gennaio
<i>S. africana-cerulea</i>	100	Marzo	<i>S. greggii</i>	96,0	Luglio
<i>S. atrocyanea</i>	100	Marzo	<i>S. guaranitica</i>	100	Marzo
<i>S. azurea</i>	100	Marzo	<i>S. 'Indigo Spires'</i>	100	Marzo
<i>S. blepharophylla</i>	82,2	Febbraio	<i>S. involucreta</i>	100	Marzo
<i>S. canariensis</i>	70	Febbraio	<i>S. iodantha</i>	100	Marzo
<i>S. chamaedryoides</i>	100	Settembre	<i>S. leucantha</i>	100	Marzo
<i>S. chiapensis</i>	100	Marzo	<i>S. madrensis</i>	100	Marzo
<i>S. cinnabarrina</i>	100	Agosto	<i>S. mexicana</i>	100	Marzo
<i>S. coccinea</i>	100	Marzo	<i>S. namaensis</i>	100	Febbraio
<i>S. confertiflora</i>	100	Marzo	<i>S. polystachya</i>	100	Marzo
<i>S. corrugata</i>	99	Gennaio	<i>S. regla</i>	30	Luglio
<i>S. dentata</i>	80	Settembre	<i>S. semiatrata</i>	100	Marzo
<i>S. discolor</i>	100	Settembre	<i>S. sessei</i>	50	Giugno
<i>S. dolomitica</i>	98,7	Marzo	<i>S. sinaloensis</i>	96,2	Febbraio
<i>S. dorisiana</i>	100	Settembre	<i>S. urica</i>	100	Marzo
<i>S. forreri</i>	100	Marzo	<i>S. wagneriana</i>	90	Settembre
<i>S. gesneriflora</i>	100	Marzo			

In genere la radicazione si completa, in condizioni ottimali, tra i 15 e i 30 giorni (secondo la specie) ma si può protrarre fino a 60 giorni in specie a più lenta emissione di radici.

1.4.4.3 Micropropagazione

Sono stati effettuati diversi studi sull'introduzione in vitro delle Salvia. Le ricerche effettuate hanno interessato la definizione della risposta al vitro in funzione delle metodiche di sterilizzazione degli espianti, del tipo di espianto, di differenti condizioni ambientali, mezzi colturali, uso di ormoni. Dalle esperienze effettuate sono stati definiti protocolli di coltivazione in vitro di diverse specie (Mascarello *et al.*, 2006; Cervelli *et al.*, 2010; Ruffoni *et al.*, 2009).

Il mezzo di coltura utilizzato per tutte le accessioni è stato così definito: sali (macro e microelementi) e vitamine secondo la formulazione di Murashige e Skoog, 1962; saccarosio 30 g/L; pH 5.7; benzyladenina 0,3 mg/L. Le condizioni termofotoperiodiche sono: temperatura di 24°C ± 1, fotoperiodo di 16 ore di luce (3500 lux) e 8 di buio, (condizioni colturali standard).

Per ogni accessione è stato valutato il tempo massimo di conservazione alle condizioni colturali standard senza rinnovo del mezzo di coltura. Immagini di piante in vitro sono riportate in foto 5.

Ciclicamente gli espianti allevati *in vitro* sono stati sottoposti ad un trattamento rizogeno che induceva l'allungamento degli internodi e la contemporanea comparsa di radici, successivamente sono stati trasferiti in serra d'ambientamento per verificare la vitalità ed il vigore di crescita *in vivo* e per controllare la conformità fenotipica. La fase di radicazione avviene in assenza di ormoni in circa 25 giorni. Le prove di ambientamento in serra hanno mostrato una buona percentuale di ambientamento e crescita e le piante provenienti da vitro hanno sempre mantenuto le caratteristiche morfologiche delle piante di partenza.

Le salvia attualmente in collezione in condizioni di vitro sono riportate in tabella 5. Una periodica attività di rimoltiplicazione degli espianti risulta necessaria per il mantenimento in condizioni ottimali delle piantine, in modo da evitare fenomeni di invecchiamento dei tessuti.

Foto 5 – Salvie mantenute in vitro



Tabella 5 - Salvie mantenute nella collezione in vitro del CRA-FSO.

Specie di Salvia	Tipo di espianto	Tasso di moltiplicazione (*)
<i>cacaliifolia</i>	germoglio	2,5
<i>cinnabarina</i>	germogli/calco	2,3
<i>corrugata</i>	germogli	1,9
<i>dolomitica</i>	germogli/calco	3,1
<i>elegans</i>	germogli	3,5
<i>greggii</i> 'Peach'	germogli	2,2
<i>horminum</i> 'Tricolor'	germogli	4,1
<i>mellifera</i>	germogli	1,8
<i>sinaloensis</i>	germogli/calco	2,3
<i>wagneriana</i>	germogli	1,5
<i>x jamensis</i> 'La Luna'	germogli	2,9
<i>x jamensis</i> 'La Siesta'	germogli	2,5

(*) ogni 30 giorni

1.4.5 Valutazione ornamentale e individuazione di nuove potenziali colture

Sul germoplasma acquisito e coltivato in collezione, attraverso la misurazione delle caratteristiche morfologiche, la registrazione delle fasi fenologiche, la valutazione delle



Foto 6 – Una fase della coltivazione di differenti specie di Salvia volta all'individuazione di nuove colture floricole.

performances propagative, l'osservazione e la misurazione dei ritmi e delle modalità di crescita delle piante, la verifica della suscettibilità o resistenza alle più comuni fitopatie o ad altri attacchi parassitari, è stata effettuata nel corso degli anni un'attività di screening (foto 6) al fine di individuare specie e varietà particolarmente interessanti per l'ottenimento di colture ornamentali da vaso, da giardino, da reciso.

Per il primo tipo di comparto commerciale si è distinto tra colture per vaso fiorito, da fogliame ornamentale e piante aromatiche. Caratteristiche comuni a tutte le specie individuate sono una buona velocità di crescita - da cui la possibilità di produzione in cicli brevi,

caratteristiche morfologiche attraenti dal punto di vista estetico (fogliame e/o fiori), ridotte esigenze di input energetici (riscaldamento, trattamenti antiparassitari, manodopera).

Specie risultate interessanti per la produzione di vasi fioriti sono *S. algeriensis*, *S. coccinea*, *S. juriscii*, *S. patens*, *S. roemeriana*, *S. blepharophylla*, *S. buchananii*, *S. greggii*, *S. x jamensis*, *S. microphylla*, *S. sinaloensis*, *S. verticillata*, *S. guaranitica*, di cui alcune comprendono un notevole panorama varietale (foto 7).



S. sinaloensis



S. roemeriana



S. blepharophylla



S. patens

Foto 7 - Piante fiorite in vaso di alcune specie di Salvia selezionate per questo specifico uso.

Caratteristiche interessanti di queste specie sono la elevata intensità della produzione di fiori, il lungo periodo di fioritura, la elevata compattezza. Specie utilizzabili come piante da fogliame ornamentale sono risultate *S. argentea*, *S. aethiopsis*, *S. sinaloensis*, *S. chamaedryoides* var. *isochroma* e *S. lyrata* var. *atropurpurea*. Specie di particolare interesse come piante aromatiche, per il loro intenso e caratteristico aroma, utilizzabili talvolta anche come piante eduli, sono state individuate nella *S. dorisiana*, *S. elegans*, *S. dolomitica*, *S. namaensis*, *S. lavandulifolia*, *S. discolor*, *S. repens*. Interessanti specie da giardino, con ricca e prolungata fioritura e ottenibili in esemplari di dimensione medio-grandi sono *S. leucantha*, *S. adenophora*, *S. iodantha*, *S. gesneriflora*, *S. involucrata*, *S. madrensis*, *S. cacaliifolia*, *S. dorisiana*, *S. sessei*, *S. chiapensis*, *S. canariensis*, *S. cinnabarina*, *S. virgata*, *S. canescens*, *S. confertiflora*, *S. darcy*, *S. scabra*, *S. semiatrata*, *S. wagneriana*, *S. regla*, *S. 'Indigo Spires'* (Cervelli, 2011) (foto 8).

Per la produzione di rami recisi sono state individuate *S. multicaulis*, *S. dolomitica*, *S. aurea* 'Kirtenbosch', *S. elegans*, *S. confertiflora*.

Sulle specie considerate più interessanti come potenziali nuove colture in contenitore e per la produzione di biomassa da estrazione sono stati definiti protocolli di coltivazione sulla base

delle esperienze effettuate precedentemente e sulla base di prove agronomiche specifiche. I risultati sono stati riportati in un libro sulle salvie di recente pubblicazione (vedi bibliografia).



Foto 8 – Specie di Salvia con intensi e contrastanti cromatismi dei fiori e del fogliame, idonee ad un utilizzo come piante decorative da giardino.

1.4.6 Valorizzazione del germoplasma in ambito produttivo

Nell'ambito dei progetti sopra citati, ma anche su richiesta specifica di produttori di piante ornamentali, aromatiche e da profumo della Riviera Ligure e della Costa Azzurra è stato fornito materiale propagativo di varie specie di salvia per l'esecuzione di prove di coltivazione (di piante ornamentali o per estrazione da biomassa) o per l'avviamento di produzioni di nuove colture ornamentali. Tra esse spicca in particolare l'ottenimento di circa 7000 talee radicate di *S. elegans* e *S. dorisiana* che sono state fornite su richiesta di un produttore di piante da profumo della Costa Azzurra nell'ambito delle attività di uno dei progetti Alcotra (foto 9), la collaborazione iniziata dal 2004 con un vivaio della provincia di Imperia che è diventato attualmente specializzato nella produzione di salvie ornamentali, la collaborazione con un noto ibridatore di Sanremo per l'ottenimento di linee originali di Salvie ornamentali.



Foto 9 – Coltivazione di *Salvia elegans* presso un'azienda francese per l'ottenimento di biomassa da estrazione per l'industria profumiera.

1.4.7 Caratterizzazione degli oli essenziali e di altri metaboliti secondari

Questa attività ha riguardato, su alcune specie, la caratterizzazione degli oli essenziali e di altri metaboliti secondari, effettuata in collaborazione con istituzioni che si occupano specificamente di questo aspetto, in particolare i Dipartimenti di Chimica e Biochimica dell'Università di Genova e di Pisa. La collezione è stata utilizzata come fonte di germoplasma di specie ritenute interessanti dal punto di vista medicinale, profumiero ed agronomico, per le quali erano presenti scarsi dati in letteratura. Su di esse si è provveduto alla coltivazione in pien'aria, al taglio e alla fornitura di biomassa alle istituzioni sopra menzionate per l'estrazione dei metaboliti, in un rapporto di collaborazione previsto dal programma dei progetti sopra citati. Specie interessate sono state *S. cinnabarina*, *S. wagneriana*, *S. corrugata*, *S x jamensis* 'La Siesta', *S. somalensis*, *S. dolomitica*, *S. dorisiana*, *S. discolor*, *S. patens*, non ancora sfruttate economicamente e di cui alcune hanno fortemente fogliame aromatico, ricco di oli essenziali. In alcuni casi è stato effettuato anche il monitoraggio la produzione dei metaboliti nel corso

dell'anno. Prove di coltivazione sono state effettuate anche in differenti ambienti pedoclimatici al fine di comparare i risultati della produzione di olio essenziale in diverse zone (foto 10). Un'altra specie interessata a fini estrattivi è stata la *S. sclarea*, al fine di individuare genotipi con caratteristiche fitochimiche interessanti per aspetti qualitativi o quantitativi di questa specie già utilizzata nell'industria estrattiva (foto 10).



Foto 10 – Coltivazione in due siti diversi di Salvie destinate alla produzione di biomassa per l'individuazione di nuovi metaboliti secondari.

Rilievi di tipo biometrico, fenologico e produttivo hanno interessato la fase di coltivazione delle specie, portando alla definizione di protocolli di coltivazione per questo specifico uso.

I risultati relativi a questo tipo di attività hanno permesso l'individuazione di nuovi metaboliti, la loro caratterizzazione e la valutazione dell'effetto biologico su microrganismi patogeni (umani e vegetali) o nella formulazione di nuovi prodotti (profumi, prodotti alimentari), risultandone in alcuni casi ottime prospettive per futuri impieghi in campo industriale (Villa *et al.*, 2009; Savona *et al.*, 2003; Minuto *et al.*, 2006; Alfieri *et al.*, 2007).

1.5 L'attività di documentazione

L'attività di valorizzazione della collezione di salvie è stata portata avanti anche attraverso la costituzione di documentazioni su mezzi cartacei (libri, fascicoli, opuscoli) e informatici (sito web, CD-ROM), la divulgazione attraverso seminari, incontri tecnici e giornate "porte aperte", con preparazione di presentazioni e di materiali informativi di vario genere (brochure, schede, ecc.).

È stato acquisito ampio materiale fotografico sulle accessioni riguardante dimensioni e tipologie di foglie, fusti, infiorescenze, fiori, semi, pianta intera, le colorazioni dei fiori e di eventuali altre parti della pianta (calici, steli, brattee), le modalità di ramificazione della pianta e la capacità di ricaccio naturale o in seguito a potature. Molto materiale fotografico è stato acquisito sulle specie e varietà della collezione riguardo alle fasi e modalità di propagazione, alle prove di coltivazione, ai prodotti ottenuti, agli incontri organizzati.

Descrittori morfologici sono stati definiti per la costituzione di un database e di schede tecniche (Cervelli *et al.*, 2011).

1.6 Bibliografia

- Alfieri A., Maione F., Bisio A., Romussi G., Mascolo N., Cicala C., 2007. Effect of a diterpenoid from *Salvia cinnabarina* on arterial blood pressure in rats. *Phytotherapy Research*, 21 (7):690 - 692.
- Alziar G., (1988-1993). Catalogue synonymique des *Salvia* L. du monde (Lamiaceae) I-VI. *Biocosme Mesogéen*, 5 (3-4): 87-136; 6 (1-2, 4): 79-115, 163-204; 7 (1-2): 59-109; 9 (2-3): 413-497; 10 (3-4): 33-117.
- Arikat N. A., Jawad F. M., Karam N. S., Shibli R. A., 2004. *Scientia Horticulturae* 100: 193-202.
- Bell E. A. 1981. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry of plants; a comprehensive treatise*. Vol. 7. Secondary plant products. New York: Academic Press, 1-19.
- Campbell P., 1999. *Survival skills of native California*. Gibbs Smith, Layton.

- Carlson W. H., Lynne Crankshaw C., 1983. Growing *Salvia* for profit. Michigan State University Extension Bulletin, January, 1-5.
- Cervelli C. (a cura di), 2009. Schede informative sulle specie del Progetto REVFLOR: risultati intermedi. CRA-FSO Sanremo.
- Cervelli C., 2011. Salvie: caratteristiche, usi e coltivazione. Editore Ace 2, Cernusco Lombardone (LC).
- Cervelli C., Capponi A., 2006. Il genere *Salvia*: il progetto Interreg e le potenzialità ornamentali. *Flortecnica* 1-2: 31-39.
- Cervelli C., Capponi A., Minuto G., Paris B., Cambournac L., in stampa. Salvie: aspetti ornamentali e nuovi prodotti floricoli.
- Cervelli C., D'Adamio E., Capponi A., Zizzo G., 2012. Effect of Temperature on Plant Development and Inflorescence Structure of *Salvia roemeriana*. *Acta Hort (ISHS)* 937:931-937.
- Cervelli C., D'Adamio E., Pacifici S., 2010. Effetto del fotoperiodo sulla fioritura di tre specie messicane di salvia. *Italus Hortus* vo. 17, suppl. al n. 2, pag. 116 (abstract).
- Cervelli C., Del Gaudio C., Masselli L., 2011. Il genere *Salvia*: Schede descrittive di 117 specie, varietà e ibridi: documentazione della collezione del CRA-FSO di Sanremo. E-book, Edizioni CRA-FSO, Sanremo.
- Cervelli C., Pasini C., Ruffoni B., Sacco M., Capponi A., Liotta A., Campagna G., Mascarello C., 2010. *Salvia*. In: *Specie spontanee in colture florovivaistiche produttive* (a cura di Capurro M., Gimelli F.), Regione Liguria, pag. 221-233.
- Clebsch B., 2003. *The New Book of Salvias: Sages for Every Garden*. Timber Press, Portland.
- Cowan M. M., 1999. *Clinical Microbiology Reviews* 564-582.
- CRA-FSO, 2011. www.istflori.it.
- Croteau R., 1977. *Plant Physiology* 59: 519-520.
- Croteau R., Johnson M. A., 1984. In: Rodriguez E., Healey P.L., Metha J., eds. *Biology and chemistry of plant trichomes* New York, Plenum Press: 133-185.
- D'Adamio E., 1998. Sviluppo di metodiche propagative e colturali per la valorizzazione di specie del genere *Salvia*. Tesi di laurea, Università di Pisa.
- Demo A., Petrakis C., Kefalasa P., Boskoub D., 1998. *Food Research International* 31: 351-354.
- Dixon R. A., 2001. *Nature* 411: 843-847.
- Dweck A. C., 2000. The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. In: Kintzios S.E. (ed.), *Sage, the genus Salvia*. Hardwood Academic Publishers, Amsteldijck, 1-26.
- Epling C., 1939. A revision of *Salvia*, subgenus *Calosphace*. *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis*, beihefte, vol. 110. Verlag des Repertoriums, Dahlem-bei-Berlin.
- Froissart C., 2008 *La connaissance des sauges*. Edisud, Aix-en-Provence.
- Gebbink E. A. K., Jansen B. J. M., de Groot A., 2002. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry* 61: 737-770.
- Hareuveni N., 1996. *Nature in Our Biblical Heritage*. Neot Kedumim Ltd., Kiryat Ono.
- Kamatoua G. P. P., Viljoen A. M., Gono-Bwalya A. B., van Zyl R. L., van Vuuren S. F., Lourens ACU, Baser KHC, Demirci B, Lindsey KL, van Staden J, Steenkamp P. 2005. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 382-390.
- Kelsey R. G., Reynolds G. W., Rodriguez E., 1984. In: Rodriguez E, Healey PL, Metha J, eds. *Biology and chemistry of plant trichomes* New York: Plenum Press 187-241.
- Kintzios S.E. (a cura di), 2000. *Sage, the genus Salvia*. Hardwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Mascarello C., D'Adamio E., Capponi A., Ruffoni B., Cervelli C., 2008. Caratteristiche del seme e della germinabilità in 48 specie del genere *Salvia*. *Flortecnica* 6: 86-91.
- Mascarello C., Mantovani E., Ruffoni B., 2006. In vitro culture of several ornamental and medicinal *Salvia* species. *Acta Hort. (ISHS)*, 723:375-380.
- Minuto G., Bruzzone C., Minuto A., Romussi G., Bisio A., De Tommasi N., 2006. Antifungal activity of some extracts from ornamental sages grown in Riviera dei Fiori' (Italy). *Acta Hort. (ISHS)*, 723:193-196.
- Muller W. S., Muller C.H., 1964. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 91: 327-330.
- Nau J., 1996. *Ball Perennial Manual: Propagation and Production*. *Salvia*. Ball Publishing, Batavia.; Sutton J., 1999. *The Gardener's Guide to Growing Salvias*. Timber Press, Portland.
- Pare P. W., Tumlinson J. H., 1999. *Plant Physiology* 121: 325-331.

- Pignatti S., 1982. Flora d'Italia. *Salvia* L. Edagricole, Bologna, vol. II, pp.502-507.
- Ruffoni B., Savona M., Capponi A., Cervelli C., 2009. Micropropagation of *Salvia pratensis* L. and *Salvia nemorosa* L. accessions selected for ornamental characters. *Acta Hort (ISHS)* 812: 201-204.
- Santos-Gomes P. C., Seabra R. M., Andrade P. B., Fernandes-Ferreira M., 2002. *Plant Science* 162: 981-987.
- Savona M., Mascarello C., Ruffoni B., Bisio A., Romussi G., 2003. *Salvia cinnabarina* Martens et Galeotti: optimisation of the extraction of a new compound - tissue culture and hairy root transformation. *Agricoltura Mediterranea*, 133(1):28-35.
- Suhaj M., 2006. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 531-537.
- Sutton J., 1999. *The Gardener's Guide to Growing Salvias*. Timber Press, Portland.
- Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat H. A., Aydin E., 2007. *Food Chemistry* 100: 985-989.
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Sokmen A., 2006. *Food Chemistry* 95: 200-204.
- Theis N., Lerda M., 2003. *Int. J. Plant Sci.* 164:S93-S102.
- Tokozawa T., 2000. The antihypertensive properties of Dan-shen, the root of *Salvia miltiorrhiza*. In: Kintzios S.E. (ed.), *Sage, the genus Salvia*. Hardwood Academic Publishers, Amsteldijck, 193-206.
- Villa C., Trucchi B., Bertoli A., Pistelli L., Parodi A., Bassi A.M., Ruffoni B., 2009. *Salvia somalensis* essential oil as a potential cosmetic ingredient: solvent-free microwave extraction, hydrodistillation, GC-MS analysis, odor evaluation and in vitro cytotoxicity assays. *International Journal of Cosmetic Science*, 31:55-61.
- Wagner G. J., 1991. *Plant Physiology* 96: 675-679.
- Walker J. B., Sytsma K.J., Treutlein J., Wink M., 2004. *Salvia (Lamiaceae)* is not monophyletic: implications for the systematics, radiation and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Menthae*. *American Journal of Botany* 91(7): 1115-1125.
- Watt J.M., Breyer-Brandwijk M.G., 1962. *Medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa*. Livingstone, London.
- Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C. M., 2007, *Phytomedicine* 14 (7-8): 508-16.
- Weir T. L., Sang-Wook P., Vivanco J. M., 2004. *Current Opinion in Plant Biology* 7:472-479
- Wollenweber E., 1985. *Plant Systematics and Evolution* 150: 83-88.
- Yinrong L., Yeap Foo L., 2002. *Phytochemistry* 59: 117-140.
- Zanin G., Erwin J. E., 2006. Photoperiod and irradiance effects on *Salvia elegans*, *S. greggii* and *S. patens* flowering, height and branching. *Acta Hort. (ISHS)*, 723: 367-373.

MANTENIMENTO DI UNA COLLEZIONE DI PIANTE OFFICINALI *

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Carla Vender e Dr. Fabrizio Scartezzini

CRA-MPF Unità di ricerca per il monitoraggio e la pianificazione forestale
Piazza Nicolini, 6 – 38123 Villazzano di Trento

Riassunto

Dal 1980 parte del personale dell'attuale CRA-MPF (ex ISAFa) ha condotto varie prove sperimentali su numerose piante officinali (p.o.). Tale attività ha portato alla costituzione di una collezione di p.o. che dal 2002, grazie ai fondi del progetto FAO-RGV, è stata sistemata in maniera più razionale ed ordinata in modo tale da offrire anche la possibilità a singoli e/o gruppi di persone di visitarla. Una piccola parte di queste specie sono però alpine (*Arnica montana*, *Cicerbita alpina*, *Gentiana lutea* ecc.) e pertanto il loro allevamento deve essere fatto in montagna. Nel 2010, le specie allevate, appartenenti a 102 generi ed a 35 famiglie, erano in totale 123. Questa collezione comprende specie alimentari, medicinali, aromatiche, ornamentali ed insetticide di origine varia. Dal 2007 è stata messa in rete una lista (http://www.pianteofficinali.org/main/Ricerca/isafa/CRAMPF_index_seminum_2012.pdf) di semi scambiabili. Oltre al mantenimento delle specie ed alla raccolta del seme vengono portate avanti anche attività divulgative finalizzate alla raccolta di dati produttivi e/o qualitativi sulle specie utilizzate nella produzione di tisane e sali aromatici (menta piperita, melissa, calendula, fiordaliso, camomilla, rosmarino, origano, salvia, timo ecc.). Inoltre il progetto FAO-RGV ha permesso di far parte del MAP-WG (Medicinal and Aromatic Plants Working Group), gruppo europeo che fra l'altro si occupa di contribuire a sviluppare delle strategie di conservazione delle MAPs a livello europeo.

Summary

Since 1980 part of the staff of the CRA-MPF Unit (ex ISAFa) carried out experimental trials on various medicinal and aromatic plants (MAPs). The outcome of this activity was the beginning of a MAPs collection which, since 2002, thanks to funds of the FAO-RGV project, was organized according to a proper system and arranged in such a way that it could be visited by individual people or groups. A small part of this species is made up of Alpine plants (*Arnica montana*, *Cicerbita alpina*, *Gentiana lutea* etc.) so they have to be grown in nearby mountainous fields. In 2010 the total species cultivated at the CRA-MPF farm were 123, belonging to 102 genera and 35 families. This collection includes medicinal, aromatic, ornamental and food species; some pest control plants are also present.

Since 2007 an exchangeable list of seeds was published in the Internet (http://www.pianteofficinali.org/main/Ricerca/isafa/CRAMPF_index_seminum_2012.pdf).

Besides growing the species and collecting their seed, other activities aimed at characterizing some species recording their productive and/or qualitative data are carried out; these target species are mainly used to produce herbal teas and flavoured salts (mint, lemon-balm, marigold, cornflower, chamomile, rosemary, oregano, sage, thyme etc.). Furthermore, the FAO-RGV project allowed us to be part of the MAP-WG (Medicinal and Aromatic Plants Working Group), a European Group which is also engaged in developing strategies aimed at the MAPs conservation at European level.

Parole chiave

Collezione, MAP WG, piante officinali, piante aromatiche

Keywords

Collection, MAP-WG, medicinal plants, aromatic plants

1.1 Premessa

Dal 1980 la sezione Apicoltura dell'ex-ISAFa è impegnata nel campo della coltivazione e del miglioramento di alcune piante officinali. Questa attività con l'andar degli anni ed il procedere

* doi:10.4458/0986-35

della sperimentazione, ha portato alla costituzione di una collezione di piante erbacee perenni ed arbustive a diversa attitudine. La collocazione dell'azienda del CRA-MPF che si trova sulla collina Est di Trento ed è sistemata in gran parte a gradoni, si presta bene a portare avanti questo tipo di attività.

1.2 Caratteristiche delle specie in collezione

L'origine delle specie in collezione è la più varia, molte provengono da Orti Botanici sia italiani che esteri, mentre, soprattutto quelle alpine, sono state raccolte in Trentino. La collezione di accessioni più numerosa è quella di salvie di cui si mantengono circa 15 tra varietà ed ecotipi. Di alcune di queste è stata determinata sia la capacità produttiva, sia il contenuto di olio essenziale (mediante distillazione presso il laboratorio del CRA-MPF), che la sua composizione (analisi GC presso laboratori esterni) (13). Altre specie di cui si conservano più di un'accessione sono: *Achillea millefolium sensu strictu* e *A. millefolium* subsp *collina* (2, 18), *Echinacea angustifolia* DC e *Hieracium pilosella* L.(3), *Lythrum salicaria* L. e *Thymus* spp..

Si fa presente però che la mancanza di strutture di isolamento delle singole accessioni, impedisce di raccogliere seme in grado di produrre piante con caratteristiche identiche a quelle del singolo ecotipo, e quindi il seme raccolto è *open-pollinated*.



Figura 1 Panoramica della collezione presente presso il CRA-MPF di Villazzano-TN.

1.3 Scopi

Il mantenimento della collezione si prefigge gli obiettivi previsti dal TRATTATO INTERNAZIONALE SULLE RISORSE FITOGENETICHE PER L'ALIMENTAZIONE E L'AGRICOLTURA ed in particolare quelli indicati all'Art. 5 che riguardano conservazione, ricerca, raccolta, caratterizzazione, valutazione e documentazione delle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura.

1.4 Attività svolta

Dal 2002, grazie ai fondi del progetto RGV (14, 15) la collezione *in vivo* preesistente è stata sistemata in maniera più razionale, allargata ed ordinata per offrire anche la possibilità a singoli e/o gruppi di persone ed alle scolaresche interessate di visitarla più comodamente.

Le varie specie vengono coltivate in file singole, formate da un numero variabile di piante, a seconda del tipo di sviluppo e/o dimensioni. Ogni fila è contraddistinta da una tabellina che riporta il nome scientifico, quello comune e l'utilizzo principale (alimentare, medicinale,

aromatico ecc.). In ogni caso si cerca di mantenere almeno n° 10 piante/specie. Il seme delle perenni viene raccolto ogni 4-5 anni a rotazione, e con la stessa cadenza si coltivano le specie annuali. Detto seme viene poi pulito al soffiatore, pesato e riposto in sacchetti. Su parte delle specie coltivate è stato determinato il peso di 1000 semi. La collezione comprende specie alimentari, medicinali, aromatiche ed *insetticide*. Per ogni specie viene compilata una scheda che riporta l'origine (selvatica, Orti botanici, commerciale), il tipo di pianta (annuale, biennale, perenne) i principali dati agronomici (date di semina, trapianto ecc.), fenologici ed il n° di piante presenti. Sulla maggior parte delle specie aromatiche è stata determinato il contenuto di olio essenziale e per qualche specie anche la composizione dello stesso, mediante analisi al GC. Nel 2011 le specie allevate nell'azienda del CRA-MPF, fra perenni ed annuali, sono state 123, appartenenti a 102 generi ed a 35 famiglie. Le famiglie più rappresentate sono quelle delle Asteracee e delle Lamiacee di cui si conservano 21 generi seguite da Apiacee (4 generi), Rosacee (6 generi) e Leguminose (3 generi).

Inoltre alcune specie alpine sono state mantenute in appezzamenti situati in montagna. È questo il caso della *Gentiana lutea*, la prima pianta su cui si è cominciato a lavorare nella sezione di Alpicoltura dell'ex ISAFa, in alternativa all'abbandono dei pascoli. La *G. lutea* è nota fin dall'antichità per il contenuto di principi amari delle sue radici. Già a partire dagli anni '80, la raccolta di diverse accessioni, alcune provenienti anche dall'estero (Francia e Germania) ed il loro allevamento prima sul monte Bondone, poi nel comune di Garniga Terme, 800 m s.l.m. ha permesso di fornire per molti anni, semente ibrida (*open-pollinated*) da cui era possibile ottenere piante più vigorose di quelle selvatiche. Più recentemente la nostra Unità si è occupata anche di altre piante officinali alpine (*Rhodiola rosea*, *Euphrasia rostkoviana*, *Arnica montana* ecc.) ed anche di una pianta alimentare con utilizzo tradizionale locale (*Cicerbita alpina*).

Di ognuna di queste specie spontanee si sono raccolte varie accessioni con le quali sono state realizzate più prove agronomiche comparative finalizzate a valutare la possibilità di domesticazione, la capacità produttiva, il contenuto in principi attivi ecc.

Per le specie più interessanti, (*Cicerbita alpina*, *Rhodiola rosea*, *Arnica montana* e *Gentiana lutea*) si è provveduto ad allestire in quota ed in relazione alle strette esigenze edafiche, campi di conservazione dove poter mantenere varie accessioni e poter raccogliere ogni anno il seme per prove successive e per renderlo eventualmente disponibile ai coltivatori interessati. La coltivazione delle specie spontanee utili è sempre consigliabile ed auspicabile per scongiurare il rischio di raccolte di rapina che possono metterne a repentaglio la sopravvivenza e/o la riduzione della biodiversità.

Dal 2007 è stata messa in rete una lista di 50-60 specie di semi scambiabili (http://www.pianteofficinali.org/main/Ricerca/isafa/CRAMPF_index_seminum_2012.pdf) che vengono spediti gratuitamente a chiunque ne faccia richiesta (Tabella 1).

Altre specie però possono servire anche ad altri scopi, ad esempio con alcune accessioni di *Echinacea angustifolia* disponibili, si sta portando avanti un lavoro di miglioramento genetico (4, 5) e lo stesso si pensa di fare con quelle di *Arnica montana*. Negli anni passati invece erano state svolte delle ricerche finalizzate alla valutazione morfologica, produttiva e qualitativa di popolazioni di camomilla e di iperico, raccolte nel nord e centro Italia (1, 6, 11).

Tabella 1 Lista dei semi scambiabili 2010.

Code	Species	Famiglia	Notes
010	<i>Achillea millefolium</i> L.	Asteraceae	
123	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Rosaceae	
103	<i>Alcea rosea</i> L.	Malvaceae	
096	<i>Allium schoenoprasum</i> L.	Liliaceae	
001	<i>Amsonia tabernaemontana</i> Walt.	Apocynaceae	
139	<i>Anetum graveolens</i>	Apiaceae	
011	<i>Arctium lappa</i> L.	Asteraceae	
124	<i>Aruncus dioicus</i> (Walt) Fern.	Rosaceae	
136	<i>Atropa belladonna</i> L.	Solanaceae	
063	<i>Betonica officinalis</i> L.	Lamiaceae	
054	<i>Centaurium erythraea</i> Rafn	Gentianaceae	
008	<i>Chenopodium bonus-henricus</i> L.	Chenopodiaceae	

022	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Asteraceae	
027	<i>Cnicus benedictus</i> L.	Asteraceae	
049	<i>Cucurbita pepo</i> L. var. <i>styriaca</i>	Cucurbitaceae	
038	<i>Cynara cardunculus</i>	Asteraceae	
132	<i>Digitalis lutea</i> L.	Scrophulariaceae	
028	<i>Echinacea angustifolia</i> D.C. var. <i>angustifolia</i>	Asteraceae	
029	<i>Echinacea pallida</i> (Nutt.) Nutt.	Asteraceae	
030	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	Asteraceae	
153	<i>Eryngium alpinum</i> L.	Umbelliferae	
126	<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	Rosaceae	
142	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>vulgare</i>	Apiaceae	
032	<i>Grindelia robusta</i> Nutt.	Asteraceae	
005	<i>Gypsophylla paniculata</i> L.	Caryophyllaceae	
066	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	
056	<i>Hypericum androsaemum</i> L.	Guttiferae	
069	<i>Leonorus cardiaca</i> L.	Lamiaceae	
100	<i>Leopoldia comosa</i> (L.) Parl. (<i>Muscari c.</i>)	Liliaceae	
101	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linaceae	
108	<i>Malva verticillata</i> L.	Malvaceae	
071	<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	
075	<i>Monarda fistulosa</i> L.	Lamiaceae	
076	<i>Nepeta cataria</i> subsp. <i>citriodora</i>	Lamiaceae	
167	<i>Papaver roeas</i> L.	Papaveraceae	
117	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Plantaginaceae	
121	<i>Rheum x cultorum</i> Thorsrud & Reis.	Polygonaceae	
168	<i>Rheum palmatum</i> L.	Polygonaceae	
042	<i>Rhodiola rosea</i> L.	Crassulaceae	wild collected
159	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	
130	<i>Ruta graeolens</i> L.	Rutaceae	
082	<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	
083	<i>Salvia sclarea</i> L.	Lamiaceae	
127	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	Rosaceae	
085	<i>Satureja montana</i> L.	Lamiaceae	
036	<i>Silybum marianum</i> Gaertn.	Asteraceae	
040	<i>Tanacetum vulgare</i>	Lamiaceae	
094	<i>Trigonella coerulea</i> Ser.	Fabaceae	
095	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Fabaceae	
151	<i>Vitex agnus castus</i> L.	Verbenaceae	

1.4.1 Attività divulgativa collaterale

Negli ultimi 10 anni, il comparto delle officinali si è mostrato particolarmente attivo ed ha interessato anche la Provincia di Trento (PAT), dove ha sede il nostro Istituto. In particolare, per dare impulso a questo settore, molto collegato a quello turistico, la PAT, ispirandosi alle normative già esistenti in Alto Adige, ha promulgato uno specifico decreto (24.09.2008 n.41-148/Leg.) che ha previsto l'istituzione di un intervento formativo atto a garantire una capacità professionale adeguata agli operatori del settore e al tempo stesso finalizzato ad assicurare al consumatore finale, un prodotto di ottime caratteristiche qualitative ed igienico sanitarie.

La legislazione provinciale ha previsto anche l'istituzione di un albo professionale al quale si può accedere solo dopo la frequenza di uno specifico corso formativo ed il superamento di un esame. Tale iniziativa ha destato un indubbio interesse a livello locale e nello specifico ha riguardato in prevalenza aziende di piccole dimensioni con realtà produttive di nicchia. Grazie a questo provvedimento tali aziende commercializzano direttamente la loro produzione, occupandosi direttamente dell'intera filiera, hanno quindi tutto l'interesse a valorizzare al massimo la loro produzione per ottenere un reddito dell'impresa soddisfacente.

La nostra Unità è stata coinvolta in questa iniziativa ed i corsi vengono organizzati direttamente presso la nostra sede. Per questo motivo particolare attenzione viene dedicata alla raccolta di dati produttivi e/o qualitativi su specie sia da foglia e sia da fiore, utilizzate nella produzione di tisane e di sale aromatico (menta, melissa, fragolina, lampone, calendula, fiordaliso, monarda, camomilla, altea, malva, rosmarino, origano, santoreggia, salvia, timo, alloro e dragoncello). Partendo dalle sementi disponibili, produciamo piantine con le quali allestiamo parcelle sulle quali, in genere ogni anno, raccogliamo e valutiamo la produzione fresca. La materia prima raccolta viene poi sottoposta alle successive fasi di lavorazione che consistono nell'essiccazione, separazione foglie-steli, macinazione e miscelazione, oppure nella distillazione per l'ottenimento dell'olio essenziale e/o essenza.

Ai fini della divulgazione, è quindi importante saper dare dei suggerimenti anche sulle fasi successive alla produzione in campo.

Questa attività non si può configurare come attività sperimentale vera e propria, ma in ogni caso, ci consente di raccogliere informazioni utili a verificare l'efficacia di eventuali accorgimenti adottati sia nella fase di coltivazione, che in quelle di post-raccolta allo scopo di ottenere un prodotto di qualità elevata.

In tale contesto, la collezione di piante officinali e le attrezzature idonee al condizionamento e alle successive lavorazioni, in dotazione al CRA-MPF, ci permettono di completare la filiera delle p.o. e di garantire ai corsisti una adeguata formazione.



Foto 2 Bambini in visita alla collezione

1.4.2 Attività a livello internazionale

Grazie alla partecipazione al progetto FAO-RGV, la dott.sa Vender è stata nominata dal Prof. Carlo Fideghelli rappresentante italiano nell'ambito del MAP WG (*Medicinal and Aromatic Plants Working Group*) uno degli ultimi gruppi costituitisi nell'ambito del Programma Cooperativo Europeo (ECP/GR), coordinato dall'IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*), a cui attualmente aderiscono 35 paesi (17).

Fra i suoi compiti, questo gruppo si prefigge di contribuire a sviluppare delle strategie di conservazione delle MAPs a livello europeo, in quanto l'accresciuto interesse dei consumatori del mondo sviluppato nei confronti dei prodotti naturali a base di erbe, rischia di minacciarne il corretto sfruttamento. Inoltre il medesimo gruppo ha concordato un elenco di 10 specie prioritarie, sulle quali sono stati redatti dei descrittori da adottare nella caratterizzazione delle popolazioni naturali *in situ* oppure idonee accessioni *ex situ*. Fra queste 10 specie prioritarie è compresa anche la *G. lutea*. Su questa specie, a partire dal 2007, grazie all'esperienza acquisita negli anni precedenti, il personale del CRA-MPF ha avviato un'indagine finalizzata al reperimento ed alla caratterizzazione di popolazioni in diverse zone del Trentino, del Veneto e della Lombardia (10).

1.4.2.1 Risultati e conclusioni

Il finanziamento del progetto FAO-RGV, pur se di dimensioni modeste, ha permesso il mantenimento della collezione e delle altre attività ad essa collegate ed ha garantito la continuità della sperimentazione su alcune piante officinali, dando nel contempo visibilità all'istituzione CRA-MPF ed aprendola al mondo esterno. La partecipazione al gruppo internazionale MAP WG, che ha comportato la stesura di alcuni *report* riguardanti la situazione italiana del settore, ha permesso di raccogliere molte informazioni sulla situazione italiana (7, 8, 9, 15, 16, 17) che tuttavia proprio per quanto riguarda la conservazione delle risorse genetiche delle piante medicinali ed aromatiche è molto arretrata rispetto a molti altri paesi stranieri (8).

1.5 Ringraziamenti

Si ringrazia vivamente il prof. Carlo Fideghelli, Coordinatore del progetto FAO-RGV, per aver voluto includere anche le piante officinali nel progetto medesimo e nell'aver supportato e sostenuto con fiducia questa attività.

1.6 Bibliografia

1. Aiello N., Fusani P., Scartezzini F., Vender C., Matteodo M., Mattioda C., Rubiolo P., 2010. Determinazione del contenuto di apigenina totale nei capolini di accessioni di camomilla comune raccolte nel nord Italia per scopi di selezione varietale. Atti VIII Convegno Nazionale "La Biodiversità - una risorsa per sistemi multifunzionali" (Lecce, 21-23 aprile 2008): 10-11.
2. Aiello N., Fusani P., Scartezzini F., Vender C., Rubiolo P. 2007. Caratteristiche produttive e qualitative di una nuova selezione di millefoglio confrontata con due varietà commerciali. In: III GIORNATE SCIENTIFICHE SOI, SASSARI: 8-12 MAGGIO.
3. Aiello N., Scartezzini F., Vender C., 2006. Caratterizzazione di accessioni di *Hieracium pilosella* L.. Atti del VII Convegno Nazionale sulla Biodiversità "L'agrobiodiversità per la qualificazione delle filiere produttive" Parte II. *Italus Hortus* 13 (2):602-604.
4. Aiello N., Scartezzini F., Vender C., 2007. Determinazione del contenuto di principi attivi nei diversi organi della pianta di dieci accessioni di *Echinacea angustifolia* DC. var. *angustifolia* per scopi di selezione varietale. *Dal Seme*, anno II, 4:53-59.
5. Aiello N., Scartezzini F., Vender C., Albasini A., 2002 - Resa e qualità delle radici di diverse provenienze di *Echinacea angustifolia* DC. var. *angustifolia*. *ISAFSA Comunicazioni di ricerca* n. 2002/1:37-43.
6. Aiello N., Scartezzini F., Vender C., Fusani P., 2007 - Valutazione bio-agronomica e qualitativa di popolazioni spontanee di iperico confrontate con varietà selezionate. In: Atti del 2° Convegno Nazionale "Piante Mediterranee: valorizzazione delle risorse e sviluppo sostenibile" (Agrigento 7-8 ottobre 2004), 681-686.
7. Piotto B., Giancanelli V., Ercole S., 2010. La conservazione *ex situ* della biodiversità delle specie vegetali spontanee e coltivate in Italia. Stato dell'arte, criticità e azioni da compiere. *Manuali e linee guida ISPRA* 54/2010:58-60.
8. Vender C. 2005. Il ruolo della ricerca nella conservazione delle specie officinali in Europa. *Erboristeria Domani*, 293:41-44.
9. Vender C. 2006. Ruolo e importanza dei parenti selvatici delle specie coltivate. *Erboristeria Domani*, 302: 48 - 51.
10. Vender C., Aiello N. and Piovesana S. 2010. Survey of Yellow Gentian Populations of the Central Alps and Record of their Main Morphological and Qualitative Characteristics. Proc. 4th IS Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants (ISBMAP 2009) *Acta Hort.* 860, *ISHS* 2010: 101-104.
11. Vender C., Aiello N., Bicchi C., Taviani P., Rosellini D., Scartezzini F., Veronesi F., 2006. Valutazione morfologica, produttiva e qualitativa di popolazioni di camomilla raccolte nel nord e centro Italia. Relazione presentata al Convegno "Prospettive di produzione e d'impiego delle piante officinali: la camomilla" (Sansepolcro, 19-20 maggio 2003). Atti "CAMOMILLA" realizzazione a cura di Erboristeria Domani, 18-28.
12. Vender C., Aiello N., Clementel F., Fusani P., Piovesana S., Scartezzini F., 2008 - Attività di mantenimento ed implementazione della collezione di piante officinali. *RGV Notiziario Risorse Genetiche Vegetali*, Anno VIII, numero speciale "Progetto RGV / FAO" 1-2/2008.

Mantenimento di una collezione di piante officinali

13. Vender C., Aiello N., Scartezzini F., 2007 - Caratteristiche morfo-produttive e qualitative di varietà ed ecotipi di salvia valutate all'ISAF. Atti del 2° Convegno Nazionale "PIANTE MEDITERRANEE: VALORIZZAZIONE DELLE RISORSE E SVILUPPO SOSTENIBILE" Agrigento, 7-8 ottobre 2004: 658-660.
14. Vender C., Aiello N., Scartezzini F., 2009. Recupero, mantenimento e caratterizzazione di specie aromatiche e medicinali. RGV Notiziario Risorse Genetiche Vegetali, Anno VIII, numero speciale "Progetto RSV / FAO" 1-2/2009.
15. Vender C., Fusani P. 2003. La conservazione delle risorse genetiche negli Orti Botanici. Erboristeria Domani, 269:28-32.
16. Vender C., Fusani P. 2003. La protezione delle piante officinali in Italia. Erboristeria Domani, 266:28-32.
17. Vender C., Fusani P. 2004. Conservation of medicinal and aromatic plants in Italy ECP/GR. Report of a Working Group on Medicinal and Aromatic Plants. First Meeting, 12-14 September 2002, Gozd Martuljek, Slovenia, 63-69.
18. Vender C., N. Aiello, P. Fusani, F. Scartezzini, M. Matteodo, P. Rubiolo 2010. Confronto fra accessioni commerciali di achillea. DAL SEME, 3:57-62.

Capitolo 3
Collezioni Industriali

COLLEZIONE DI SEMI DELLA FAMIGLIA DELLE BRASSICACEAE E LORO CARATTERIZZAZIONE PER IL CONTENUTO IN GLUCOSINOLATI E IN ACIDI GRASSI*

Responsabili Scientifici: Luca Lazzeri, Lorena Malaguti, Susanna Cinti, Gina R. De Nicola, Nerio Casadei, Luisa Ugolini, Lorenzo D'Avino, Manuela Bagatta e Renato Iori

CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali

Via di Corticella, 133 – 40128 Bologna

E-mail luca.lazzeri@entecra.it; renato.iori@entecra.it

Riassunto

La famiglia delle Brassicaceae è storicamente tra quelle maggiormente utilizzate nell'alimentazione mondiale, ma, in questi ultimi anni, alcune specie sono state oggetto di numerosi studi per una valorizzazione anche nel settore non alimentare. Presso il CRA-CIN di Bologna le Brassicaceae sono state studiate per oltre venti anni sia per il loro olio ad alto tenore in acido erucico (C22:1), sia per la caratterizzazione del tipico sistema difensivo glucosinolati-mirosinasi.

Da questa esperienza è derivata una collezione del germoplasma di oltre settanta specie di Brassicaceae non alimentari nella gran parte caratterizzate per i profili in acidi grassi dell'olio e in glucosinolati nel seme, nella pianta e nella radice. Tale collezione può risultare di interesse per scopi classificativi del germoplasma e per fini scientifici legati allo studio e all'utilizzazione di queste molecole in diversi settori economici.

Inoltre, nella collezione sono anche compresi i principali glucosinolati e l'enzima mirosinasi purificati ad un elevato grado di purezza, al fine di effettuare studi sugli effetti protettivi degli isotiocianati, i principali prodotti di idrolisi dei glucosinolati, contro l'insorgenza dei tumori e nel controllo di alcuni patogeni delle colture agrarie.

Summary

The Brassicaceae family is historically used in food chain but, in these last years, it was also considered for non food uses. At CRA-CIN, Brassicaceae have been studied for more than twenty years for their high erucic acid oil (C22:1) as well as for the characterization of the glucosinolate-myrosinase system.

From this work, it has been obtained a seed collection of more than 70 non food Brassicaceae species generally characterized both for their fatty acid profile and for glucosinolate content in seed, plant and root. The collection can be interesting for germoplasm classifying and for scientific aims for the study and the utilization of the molecules contained therein.

Finally, the collection contains both highly purified glucosinolates and myrosinase enzyme, in order to carry out studies on the protective effects of isothiocyanates, the main hydrolysis products of glucosinolates, against the onset of cancer and in containment of soil borne pathogens and pests.

Parole chiave

Brassicaceae, acido erucico, glucosinolati, mirosinasi, biofumigazione, chemioprevenzione

Keywords

Brassicaceae, erucic acid, glucosinolates, myrosinase, biofumigation, chemoprevention

* doi:10.4458/0986-10

1 Le Brassicaceae

DIVISIONE: Magnoliophyta CLASSE: Magnoliopsida SOTTOCLASSE: Dillenidae
ORDINE: Capparales FAMIGLIA: Brassicaceae

Le Brassicaceae o Cruciferae sono una grande famiglia con oltre 350 generi e 2500 specie, in gran parte ancora non sufficientemente caratterizzate (Kjaer 1976). Il germoplasma è formato prevalentemente da piante erbacee, spesso annuali, distribuite in tutti i continenti dove possono spingersi sia in latitudine che in altitudine fino al limite della vegetazione (Foto 1), pur mostrando il suo centro di biodiversità, in termini di numero di specie, nel bacino del Mediterraneo.



Foto 1 Resistenza alle basse temperature invernali di *Brassica juncea*.



Foto 2 Infiorescenza del Broccolo

Le piante di questa famiglia hanno foglie disposte in maniera alterna; i fiori sono riuniti in infiorescenze a grappolo. La struttura florale, molto caratteristica, consente di riconoscere facilmente la famiglia (Foto 3). Il fiore, ermafrodita, a simmetria bilaterale, ha il calice dialisepalo costituito da 4 sepali, la corolla dialipetala costituita da 4 petali, alterni ai sepali, l'androceo costituito da 6 stami (2 esterni più corti e 4 interni più lunghi); il gineceo sincarpico, costituito da 2 carpelli, è in posizione supera. Il frutto è una siliqua se la lunghezza supera almeno di tre volte la larghezza, una siliquetta se la lunghezza non supera di almeno 3 volte la larghezza. La siliqua (o siliquetta) è un frutto secco deiscente, derivante da un gineceo bicarpellare, che a maturità si apre in corrispondenza della linea di saldatura dei due carpelli. L'apertura della siliqua



Foto 3 Tipica struttura florale delle Brassicaceae

mette in evidenza un falso setto (repl) derivante dalla proliferazione dei margini dei carpelli; sul repl sono inseriti i semi. La siliqua può presentarsi suddivisa in segmenti per la presenza di strozzature (siliqua lomentacea).

Mentre la struttura dei fiori di Brassicaceae è costante, la morfologia dei frutti è molto variabile nell'ambito dei diversi taxa presenti nella famiglia.

Le Brassicaceae sono comunque caratterizzate da una lunga radice fittonante che permette di esplorare il terreno fino a profondità che possono essere anche superiori al metro e conseguentemente di svolgere un'ottima azione drenante e di contenimento del fenomeno della lisciviazione nelle falde dei nutrienti quali soprattutto l'azoto. Per lo stesso motivo e per la loro tolleranza ai metalli pesanti alcune specie hanno un ruolo chiave nella tecnica della fitodepurazione (*phytoremediation*) di suoli contaminati (Vamerali et al 2010).

Si tratta di colture generalmente con una buona resistenza al freddo e che in piena fioritura possono produrre elevate quantità di biomassa con un rapporto C/N più vicino a quello dell'humus rispetto alle graminacee e per questo caratterizzate da una maggiore resa in humus. Le Brassicaceae sono state storicamente indicate come piante miglioratrici del terreno, probabilmente in relazione all'effetto allelopatico dei prodotti dell'idrolisi dei glucosinolati che caratterizzano i diversi taxa presenti nella famiglia (Lazzeri e Malaguti, 2008).

Le relazioni esistenti tra le specie coltivate del genere *Brassica* ci permettono di individuare tre specie base: *Brassica nigra* (n=8) (Foto 4), *Brassica oleracea* (n=9) e *Brassica campestris* (n=10). A seguito di ibridazioni naturali si sono ottenute tre nuove specie caratterizzate da un numero cromosomico pari alla somma di quello delle specie base: *Brassica carinata* (n=17), *Brassica juncea* (n=18) e *Brassica napus* (n=19) (Fig. 1) (Toniolo, Mosca 1986).

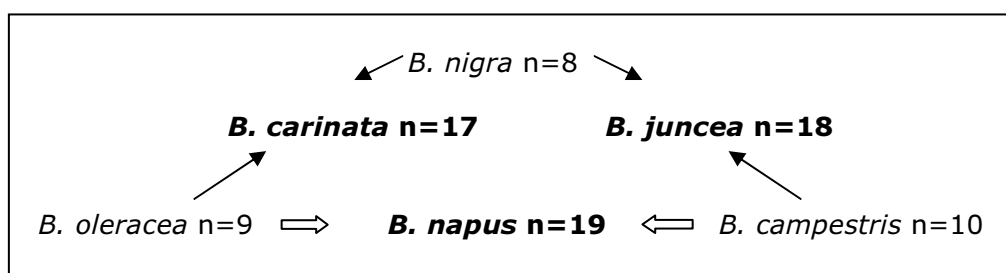


Figura 1 Triangolo di U. Le specie poste ai vertici del triangolo rappresentano i capostipiti, mentre quelle poste in posizione intermedia sono specie derivate.



Foto 4 Coltivazione di pieno campo di *Brassica nigra*

1.1 Il sistema glucosinolati-mirosinasi

1.1.1 I glucosinolati

I glucosinolati costituiscono un gruppo di circa 140 metaboliti secondari presenti in elevate quantità in semi e piante di Brassicaceae e delle Akaniaceae, Bataceae, Bretschneideraceae, Capparaceae, Caricaceae, Drypetes (Euphorbiaceae), Gyrostemonaceae, Limnanthaceae, Moringaceae, Pentadiplandraceae, Resedaceae, Salvadoraceae, Tovariaceae e Tropeolaceae (Halkier, 1999). Questi composti sono particolarmente abbondanti nei vegetali della famiglia delle Brassicaceae (Fahey et al., 2001). I glucosinolati sono esteri alchil-N-idrossimino solfato con un gruppo β -D-tioglucopiranosidico legato al carbonio idrossiminico, con una struttura comune e una diversa catena laterale R di tipo alchilico, aromatico o indolico che li differenzia (fig 2 e 3).

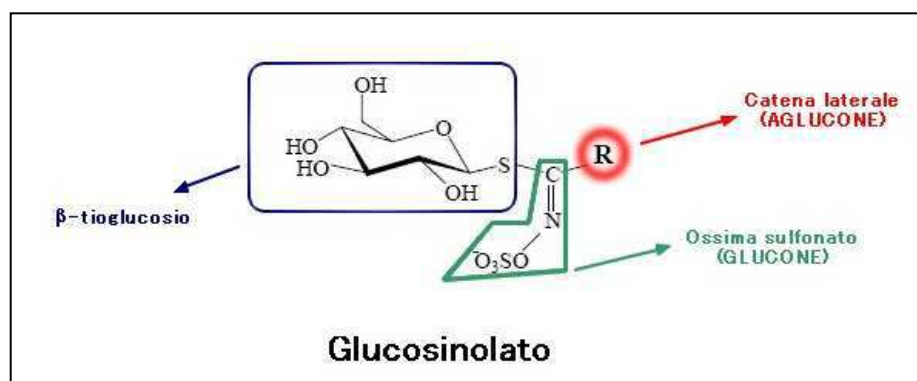


Figura 2
Struttura base dei glucosinolati

La composizione in glucosinolati caratterizza le diverse specie delle Brassicaceae non solo sulla base della quantità, ma anche della qualità contenuta nei diversi organi della pianta. L'analisi HPLC, infatti, evidenzia un profilo tipico per ogni specie (Rosa et al. 1997), che può essere caratterizzato talvolta da un solo glucosinolato (Fig. 4) o, più spesso, da diversi glucosinolati (Fig. 5). Inoltre, anche all'interno dello stesso germoplasma il profilo in glucosinolati può variare da un punto di vista quali-quantitativo tra gli organi vegetativi (parte epigea ed ipogea) e riproduttivi (fiori e seme).

1.1.2 La mirosinasi

La mirosinasi (tiogluco-side gluco-idrolasi E.C. 3.2.1.147) è l'enzima che catalizza la reazione di idrolisi dei glucosinolati attraverso la rottura del legame tra il glucosio e l'aglucone, determinando e modulando la formazione dei prodotti d'idrolisi dei glucosinolati caratterizzati da una ben conosciuta attività biologica.

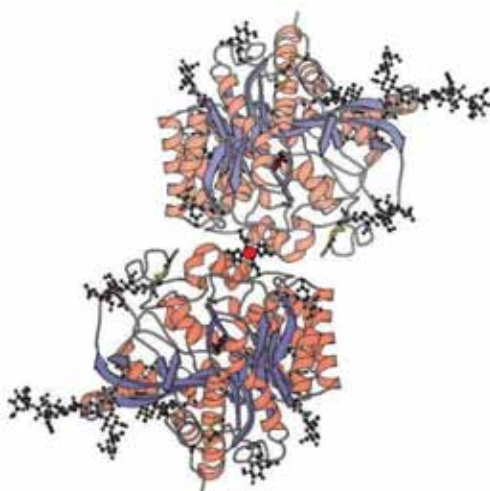


FOTO 5 Struttura dell'enzima mirosinasi purificato da semi di *Sinapis alba* (Burmeister et al., 1997).

La scoperta della mirosinasi è dovuta a Bussy nel 1840, che la trovò insieme ai glucosinolati nei semi di senape. Oltre che nella famiglia delle Brassicaceae la si ritrova nelle Akaniaceae, Bataceae, Bretschneideraceae, Capparidaceae, Caricaceae, Drypetes (Euphorbiaceae), Gyrostemonaceae, Limnanthaceae, Moringaceae, Pentadiplandraceae, Resedaceae, Salvadoraceae, Tovariaceae e Tropeolaceae oltre che in vari microrganismi come funghi, batteri ed anche insetti.

Le mirosinasi sono glicopolipeptidi che contengono vari gruppi tiolici, disolfuri, ponti salini e, in relazione alla matrice da cui sono state estratte, si presentano con differenti pesi

molecolari (135-480 kDa), varie sub-unità (2-12) e alte percentuali di carboidrati (9-23%). La presenza quali-quantitativa in mirosinasi in una pianta è funzione del genotipo, della specie e del tipo di tessuto considerato (foglie, stelo, radici, semi) e, tranne rare eccezioni, si trova sempre in concomitanza con i glucosinolati.

Il principale isoenzima di mirosinasi isolato è quello da semi di *Sinapis alba* ed è costituito da due subunità identiche di circa 70 kDa stabilizzate da uno ione Zn^{2+} sull'asse bilaterale, avente coordinazione tetraedrica e può formare complessi con alcune "binding proteins" dando origine a diverse forme isoenzimatiche (Pessina, 1990; Eriksson, 2002) (Foto 5).

Glucosinolati con catena R alchilica		Glucosinolati con catena R ossidrilica	
Nome	Struttura	Nome	Struttura
Glucocapparina		Progoitrina / Epiprogoitrina	
Sinigrina		Gluconapoleiferina	
Gluconapina		Glucosisimbrina	
Glucobrassicinapina		Glucoconringina	
Glucosinolati con catena R tiofunzionalizzata		Glucosinolati con catena R aromatica	
Glucoerucina		Glucotropeolina	
Glucioiberina		Gluconasturtina	
Glucorafanina		Sinalbina	
Glucoalissina		Glucolimnantina	
Glucorafasatina		Glucosinolati indolici	
Glucorafenina			
Glucocheirolina		Glucobrassicina	
		4-Idrossi glucobrassicina	

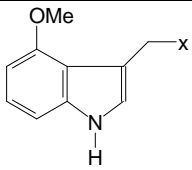
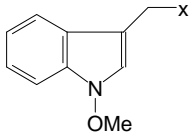
		4-Metossi glucobrassicina	
		Neoglucobrassicina	

Figura 3 Nomenclatura e struttura della catena laterale di alcuni dei principali glucosinolati

Figura 4 Profilo in glucosinolati del seme di *Brassica juncea*

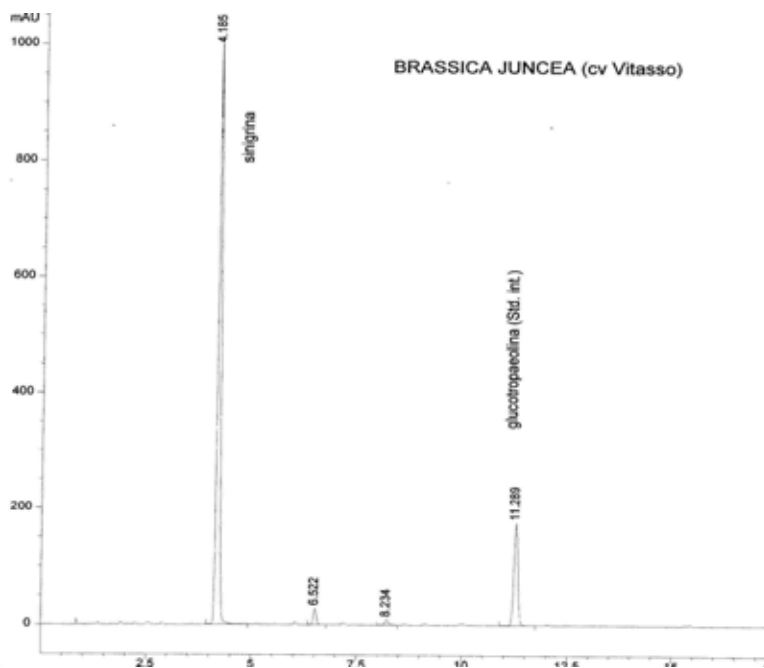
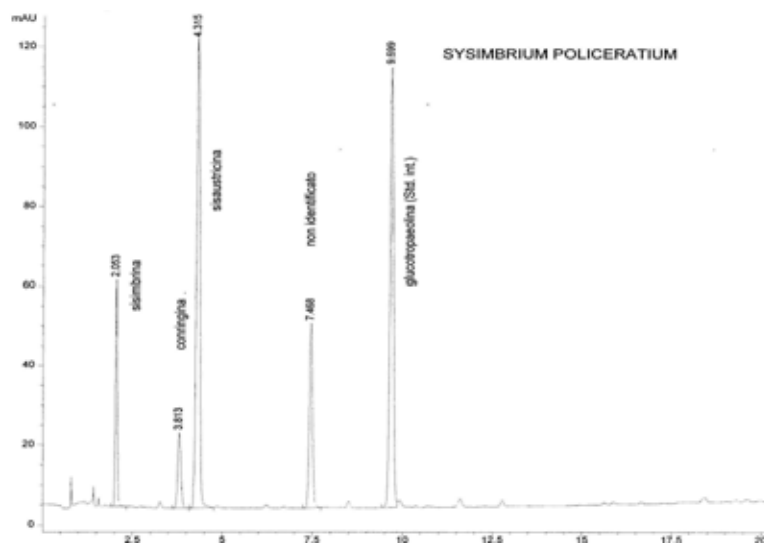


Figura 5 Profilo in glucosinolati del seme di *Sisymbrium polyceratum*



1.1.3 La reazione di idrolisi dei glucosinolati

Il sistema glucosinolati-mirosinasi svolge nella pianta un ruolo di difesa. Nella fisiologia della cellula, infatti, enzima e substrato sono nella maggior parte dei casi compartimentalizzati in zone diverse del citoplasma (il glucosinolato in grossi vacuoli e l'enzima in specifici corpi mirosinici localizzati principalmente sulle membrane della cellula) e solo in seguito a lesioni cellulari, causate da fattori biotici o abiotici, glucosinolati e mirosinasi entrano in contatto, rilasciando *in situ* i prodotti di idrolisi enzimatica principalmente rappresentati da isotiocianati ed in misura minore da nitrili, epitio-nitrili e tiocianati (Fig. 6). Questi composti sono in generale caratterizzati da una rilevante attività biologica di difesa che si esprime in alcuni casi come una manifesta attività biocida e che può essere utilizzata nel contenimento di fitoparassiti.

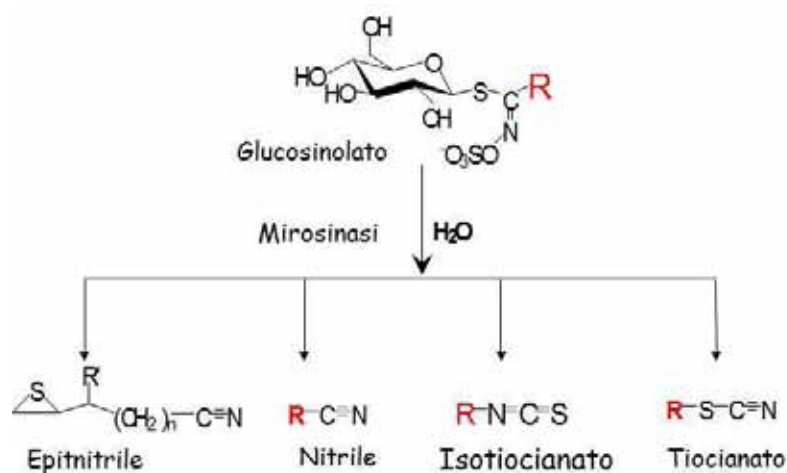


Figura 6 Prodotti di idrolisi dei glucosinolati.

In specifici screening effettuati *in vitro*, i prodotti di idrolisi di alcuni glucosinolati hanno mostrato un'elevata attività biofungitossica nei confronti di alcuni funghi patogeni responsabili del cosiddetto fenomeno della stanchezza del terreno quali *Pythium* spp. e *Rhizoctonia* spp. (Manici et al., 1997), risultati fino a cento volte più sensibili rispetto a ceppi di *Trichoderma harzianum*, fungo imperfetto inserito nelle sperimentazioni come rappresentativo della micoflora utile o comunque non patogena (Sanchi et al., 2005). Questi prodotti sono risultati attivi anche nei confronti di patogeni del post raccolta (Mari et al., 1993), nematodi (Lazzeri et al., 2004) ed elateridi (Furlan et al., 2010).

Un altro settore nel quale queste molecole svolgono un ruolo importante è quello nutraceutico. Infatti, i glucosinolati e i loro prodotti di idrolisi, in particolare gli isotiocianati, sono tuttora oggetto di un interesse per la loro attività chemiopreventiva mostrata in studi condotti sia *in vitro* su cellule tumorali, sia in modello animale, in quanto agenti bloccanti la carcinogenesi chimica. Tale azione anticancerogena è legata alla capacità degli isotiocianati di induzione di enzimi detossificanti e di inibizione degli enzimi che attivano la carcinogenesi (Abdull Razis et al., 2011a). L'esempio più noto di queste proprietà è dato dal sulforafano, l'isotiocianato derivato dal 4-metilsulfonilbutil glucosinolato (glucorafanina) tipico dei broccoli che, al pari di altri isotiocianati, previene la crescita tumorale bloccando il ciclo cellulare e promuovendo l'apoptosi (Fimognari et al., 2002).

1.1.4 La biofumigazione

La presenza del sistema glucosinolati-mirosinasi in tutti gli organi vegetativi e in particolare l'elevata concentrazione nei semi ha suggerito la possibilità di veicolare nel terreno questi composti che altro non sono che i responsabili del tipico aroma pungente delle salse di senape e di mostarda. Negli ultimi decenni molti studi sono stati dedicati a questo argomento. Questi studi, perseguendo la maggiore efficacia dei trattamenti, hanno portato alla definizione di diverse modalità di impiego e condizionamento tecnologico del materiale vegetale, suscitando un crescente interesse da parte del mondo agroindustriale. Si è così sviluppata la tecnica della biofumigazione, basata sull'effetto soppressivo su diversi patogeni del terreno di alcune Brassicaceae appositamente selezionate (*Brassica juncea*, *Brassica carinata*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus*...). Questo effetto si esprime non solo attraverso la liberazione di isotiocianati

derivati dall'idrolisi dei glucosinolati via mirosinasi (Brown e Morra, 1996), ma anche attraverso la coltivazione di alcune specie le cui radici determinano un effetto *catch crop* nei confronti di



alcuni nematodi (Curto et al., 2005). Questa tecnica prevede l'interramento in fase di preimpianto di sovesci verdi (Foto 6) o in alternativa di formulati a base di farine disoleate, con buoni risultati anche nel breve periodo. Oltre all'azione biofumigante, l'interramento della biomassa consente un apporto dell'ordine di qualche kg m^{-2} di sostanza secca nel caso dei sovesci freschi e dell'ordine dei 300 g m^{-2} di sostanza secca (con oltre il 5% di azoto organico) nel caso dei formulati a base di farine vegetali.

Foto 6 Interramento di Brassicaceae da sovescio

L'applicazione dei materiali biofumiganti freschi o secchi consente quindi di perseguire l'obiettivo prioritario di una corretta gestione della fertilità fisica, chimica e biologica dei terreni quale elemento funzionale per l'incremento della competizione all'interno dell'agrosistema. Tale tecnica, applicata commercialmente su numerose colture orticole, come dimostrato da numerose esperienze realizzate a partire dall'inizio degli anni 2000 sia con sovesci in pre-impianto (Lazzeri et al., 2003) che con formulati a base di farine disoleate (Lazzeri et al., 2009). La tecnica della biofumigazione è di facile applicazione e può essere usata in sinergia con altre tecniche a ridotto impatto ambientale quale la solarizzazione o l'uso di antagonisti fungini, proponendosi quindi per la definizione di sistemi di gestione della fertilità "personalizzata" per ogni singola realtà produttiva in funzione del tipo di terreno, delle rotazioni e del tipo di patogeno dominante. In questo modo, la tecnica mostra evidenti effetti già sulla coltura successiva alla sua applicazione, anche se i risultati migliori sono stati comunque ottenuti in prove pluriennali simulando una rotazione orticola interamente gestita con diversi materiali biofumiganti.

1.2 L'acido erucico (C:22)

Le Brassicaceae sono tradizionalmente classificate come piante oleaginose in quanto presentano nel seme quantità di trigliceridi che possono variare dal 10 al 45% del peso secco. La composizione acidica di questi oli è nella maggior parte dei casi caratterizzata dalla presenza di acidi grassi a catena lunga quali l'acido erucico (acido 13-docosenoico, C 22:1), ed in quantità minori il gadoleico (9-eicosenoico, C 20:1) ed il nervonico (15-tetracosenoico, C 24:1). L'espressione del contenuto qualitativo in acidi grassi a catena lunga è un parametro strettamente legato al genotipo e relativamente stabile al variare delle condizioni di coltivazione e per questo, al pari del profilo in glucosinolati, la loro valutazione può fornire ulteriori informazioni per la classificazione delle varie specie.

Gli acidi grassi a catena lunga, ed in alcuni casi anche il loro livello di insaturazione, conferiscono all'olio di Brassicaceae modeste proprietà nutrizionali, anche se in molti paesi asiatici sono diffusamente presenti nella dieta. Nello stesso tempo, però, gli oli a catena lunga sono caratterizzati da ottime proprietà tribologiche per un'utilizzazione non alimentare quali ad esempio l'alta viscosità che determina un elevato potere lubrificante, l'elevato punto di fumo e un'alta bagnabilità dei metalli (Lazzeri et al., 1997).

Giova inoltre ricordare che nelle Brassicaceae l'acido erucico non è mai presente nella posizione 2 del trigliceride, occupata frequentemente da acido oleico o linoleico o linolenico. Un semplice calcolo evidenzia quindi una barriera fisiologica alla produzione nella pianta di un olio con un contenuto teorico massimo di acidi grassi a catena lunga del 66%.

La pianta che produce l'olio con il maggior contenuto di acido erucico è il *Crambe abyssinica* (Foto 7) con valori che possono superare il 56%. Questa caratteristica ha negli ultimi anni aperto interessanti prospettive applicative nel settore dei biolubrificanti.

L'interesse per questo olio è comunque più ampio. Infatti, in seguito a saponificazione del trigliceride e la successiva distillazione è possibile isolare gli acidi grassi a catena lunga che possono essere utilizzati, nel caso dell'acido erucico nella produzione di erucamide, surfattanti non-ionici e in seguito a frazionamento, di acido pelargonico e brassilico.



Foto 7 Seme ed olio di *Crambe abyssinica*.

Nella famiglia delle Brassicaceae esistono anche piante con limitati quantitativi di acido erucico il cui profilo degli acidi grassi può contenere un crescente livello di polinsaturi fino a divenire quelli maggiormente presenti, determinando le proprietà tribologiche tipiche degli oli siccativi.

1.3 La collezione di semi di Brassicaceae caratterizzati per il profilo in glucosinolati e in acidi grassi

La collezione di semi delle *Brassicaceae* e altre quattro famiglie minori, pur se limitato ad una piccola parte della biodiversità presente in natura, contempla un germoplasma di 73 specie appartenenti a 4 famiglie botaniche e può offrire delle opportunità sia a livello scientifico che classificativo. Le specie al momento inserite nella collezione sono state, infatti, caratterizzate per il loro contenuto in glucosinolati sia nel seme che nella pianta e nelle radici e per la composizione in acidi grassi dell'olio. In questo lavoro, sono riportati esclusivamente gli acidi grassi ed i glucosinolati principali delle singole specie anche se le relative analisi complete sono eventualmente disponibili.

Secondo una prima classificazione, la collezione è descritta per alcune caratteristiche generali (nome scientifico e comune, numero di cromosomi ([http: www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)), germinabilità e numero di selezioni disponibili per ogni specie) (Tab. 1). Solo una parte del materiale è stato



negli anni moltiplicato in purezza e quindi ha mantenuto un sufficiente potere germinativo (Foto 8), ma è attualmente in corso un programma di rinnovamento e aggiornamento. Il germoplasma non contiene le specie attualmente utilizzate per scopi alimentari, ed è focalizzata esclusivamente sulle specie non edibili e per questo potenzialmente di interesse per un'utilizzo non alimentare.

Foto 8 Campo catalogo del genere *Iberis*

Alcune specie presenti nella collezione (*B. napus*, *B. carinata*, *Crambe abyssinica* ecc.) in questi ultimi anni hanno suscitato l'interesse scientifico e applicativo nei settori più disparati (piante da sovescio, piante per biocarburanti, biolubrificanti ecc.). Tale interesse commerciale ha condotto a sua volta alla definizione di nuove varietà o ecotipi selezionati e pertanto per alcune specie inserite nella collezione sono disponibili più accessioni.

In una seconda classificazione, invece, il germoplasma della collezione è descritto sinteticamente per le due componenti caratterizzanti le Brassicaceae e altre famiglie minori: la composizione in acidi grassi dell'olio ed il contenuto in glucosinolati nel seme, nella pianta e nella radice (Tab. 2). I due caratteri sono stati espressi rispettivamente come i due acidi grassi caratterizzanti l'olio ed il glucosinolato predominante nelle diverse matrici. Per la valutazione dei glucosinolati presenti nella pianta e nella radice, le piante sono state coltivate su suolo agrario presso l'azienda sperimentale del CRA-CIN (Budrio, Bologna) e raccolte in fase di piena fioritura. Il materiale è stato immediatamente congelato in azoto liquido e successivamente liofilizzato, macinato e analizzato per mezzo di analisi HPLC dei desulfoderivati, seguendo essenzialmente la procedura ISO 9167-1 riportata nell'*Official Journal of the European Community* (1990), con alcune modifiche indispensabili per l'analisi di materiali freschi (Wathelet et al., 2004).

Tabella 1 - Lista del germoplasma presente nella collezione (NG seme non germinabile, G seme germinabile)

	Nome botanico	Nome comune	Genoma (2n)	Ciclo	Seme
Brassicaceae					
1	<i>Alliaria petiolata (Bieb.)</i>	Alliaria	36	Biennale	NG
2	<i>Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.</i>	Arabetta	10	Annuale	NG
3	<i>Barbarea verna (Mill.) Asch.</i>	Erba di santa Barbara	16	Biennale	G
4	<i>Barbarea vulgaris W.T. Aiton.</i>	Erba di santa Barbara comune	16	Biennale	NG
5	<i>Berteroa incana DC.</i>	Berteroa	16	Annuale	NG
6	<i>Brassica albo glabra L.H.</i>		18	Annuale	NG
7	<i>Brassica carinata A.Braun</i>	Cavolo d'Abissinia	34	Annuale	G
8	<i>Brassica chinensis (L.)</i>	Cavolo cinese	20	Annuale	NG
9	<i>Brassica deflexa Boiss</i>		14	Annuale	G
10	<i>Brassica elongata Ehrh.</i>	Cavolo di Persia	22	Annuale	NG
11	<i>Brassica japonica Thunb.</i>		20	Annuale	NG
12	<i>Brassica juncea (L.) Czern.</i>	Senape indiana	36	Annuale	G
13	<i>Brassica kaber (DC.) L.C.Wheeler</i>	Erba falcona	36	Annuale	NG
14	<i>Brassica maurorum Durieu</i>		16	Annuale	G
15	<i>Brassica napus (L.)</i>	Colza	38	Annuale	G
16	<i>Brassica narinosa L.H.Bailey</i>		20	Annuale	NG
17	<i>Brassica nigra (L.) Koch</i>	Senape nera	16	Annuale	G
18	<i>Brassica pekinensis (Lour.)</i>	Cavolo sedano	20	Annuale	NG
19	<i>Brassica rapa (L.) Metzger</i>	Cavolo rapa	20	Annuale	G
20	<i>Brassica tournefortii Gouan</i>	Cavolo di Tournefort	20	Annuale	G
21	<i>Camelina microcarpa Andrz.</i>	Dorella minore	26	Annuale	G
22	<i>Camelina sativa Crantz (L.)</i>	Dorella comune	12	Annuale	G
23	<i>Capsella bursa-pastoris (L.) Medik.</i>	Borsa del pastore	32	Biennale	NG

*Collezione di semi della famiglia delle Brassicacee
e loro caratterizzazione per il contenuto in glucosinolati e in acidi grassi*

24	<i>Cardaria draba (L.) Desv.</i>	Lattona	64	Perenne	NG
25	<i>Cheiranthus cheiri (L.)</i>	Violaciocca	14	Biennale	NG
26	<i>Chorispora tenella (Willd.) DC</i>	Tenella	14	Annuale	NG
27	<i>Conringia orientalis (L.) C.Presl</i>	Conringia orientale	14	Annuale	NG
28	<i>Coronopus didymus (L.) Sm.</i>	Lappolina americana	32	Annuale	NG
29	<i>Crambe abyssinica Hochst.</i>	Senape abissinica	30	Annuale	G
30	<i>Crambe filiformis Boiss.</i>		30	Annuale	NG
31	<i>Crambe hispanica (L.)</i>	Senape spagnola	30	Annuale	NG
32	<i>Crambe hispanica (L.) subsp. glabrata (DC.)</i>		30	Annuale	NG
33	<i>Descurainia pinnata (Walter)</i>		28	Annuale	NG
34	<i>Descurainia sophia (L.) Webb</i>	Erba di Sofia	28	Annuale	G
35	<i>Diplotaxis tenuifolia (L.) DC</i>	Rughetta selvatica	22	Perenne	NG
36	<i>Eruca vesicaria (L.) Cav.</i>	Rucola comune	22	Annuale	G
37	<i>Eruca sativa spp. Oleifera Mill</i>	Rucola oleifera	22	Annuale	G
38	<i>Erucastrum gallicum O.E.Schulz</i>	Erucastrum francese	30	Annuale	G
39	<i>Erysimum officinale (L.)</i>		14	Annuale	G
40	<i>Hirschfeldia incana (L.) Lagr</i>	Senape canuta	14	Annuale	G
41	<i>Iberis amara (L.) - Pall.</i>	Iberide bianco	14	Annuale	G
42	<i>Iberis linifolia Loeff (L.)</i>	Iberide	14	Biennale	NG
43	<i>Iberis umbellata (L.)</i>	Iberide rossa	14-16-18	Annuale	NG
44	<i>Isatis tinctoria (L.)</i>	Guado	14	Biennale	G
45	<i>Lepidium campestre (L.) R. Br.</i>	Lepidio campestre	16	Annuale	G
46	<i>Lepidium densiflorum Schrad.</i>	Lepidio densiflora	32	Annuale	G
47	<i>Lepidium draba (L.)</i>	Erba di Santa Maria	64	Perenne	NG
48	<i>Lepidium virginicum var. menziesii DC.</i>	Lepidio della Virginia	16		NG
49	<i>Lepidium ruderales (L.)</i>	Lepidio de' calcinacci	16	Annuale	G
50	<i>Lepidium sativum (L.)</i>	Crescione	16	Annuale	G
51	<i>Lesquerella fendleri (A. Gray)</i>	Lesquerella	12	Annuale	NG
52	<i>Lobularia maritima (L.) Desv.</i>	Alisso profumato	24	Annuale	NG
53	<i>Lunaria annua (L.) (Jundz.)</i>	Medaglioni del Papa	30	Annuale	G
54	<i>Matthiola incana (L.)</i>	Violaciocca rossa	14	Annuale	NG
55	<i>Orychophragmus violaceus (L.)</i>		24	Annuale	NG

56	<i>Raphanus raphanistrum (L.)</i>	Ravanello selvatico	18	Annuale	NG
57	<i>Raphanus sativus spp. oleiformis Pers.</i>	Rafano	18	Annuale	G
58	<i>Rapistrum rugosum (L.)</i>	Miagro peloso	16	Annuale/pe rennante	G
59	<i>Sinapis alba (L.)</i>	Senape bianca	24	Annuale	G
60	<i>Sinapis arvensis (L.) O.F. Müll.</i>	Senape dei campi	18	Annuale	G
61	<i>Sisymbrium austriacum Jacq.</i>	Erba cornacchia	14	Annuale	NG
62	<i>Sisymbrium austriacum Jacq. subsp. contortum Cav.</i>		14	Annuale	NG
63	<i>Sisymbrium loeselii (L.)</i>	Erba cornacchia di Loesl	14	Annuale	NG
64	<i>Sisymbrium polyceratum (L.)</i>	Erba cornacchia fogliosa	28	Annuale	NG
65	<i>Trachistoma ballii O.E. Shultz</i>		16	Annuale	G
Capparidaceae					
66	<i>Cleome graveolensis Ewart</i>		22		NG
67	<i>Cleome hassleriana Chodat</i>		20	Annuale	NG
68	<i>Cleome spinosa Jacq.</i>	Cleome comune	38	Annuale	NG
69	<i>Cleome trachysperma Torr. & Gray</i>		20		NG
70	<i>Cleome viscosa (L.)</i>	Cleome viscoso	20	Annuale	NG
Limnanthaceae					
71	<i>Limnanthes alba Hartweg</i>		10	Annuale	NG
Resedaceae					
72	<i>Reseda luteola (L.)</i>	Reseda biondella	24	Biennale	NG
Tropaeolaceae					
73	<i>Tropaeolum peregrinum (L.)</i>		28	Annuale	NG

In una seconda classificazione, invece, il germoplasma della collezione è descritto sinteticamente per le due componenti caratterizzanti le Brassicaceae e altre famiglie minori: la composizione in acidi grassi dell'olio ed il contenuto in glucosinolati nel seme, nella pianta e nella radice (Tab. 2). I due caratteri sono stati espressi rispettivamente come i due acidi grassi caratterizzanti l'olio ed il glucosinolato predominante nelle diverse matrici. Per la valutazione dei glucosinolati presenti nella pianta e nella radice, le piante sono state coltivate su suolo agrario presso l'azienda sperimentale del CRA-CIN (Budrio, Bologna) e raccolte in fase di piena fioritura. Il materiale è stato immediatamente congelato in azoto liquido e successivamente liofilizzato, macinato e analizzato per mezzo di analisi HPLC dei desulfoderivati, seguendo essenzialmente la procedura ISO 9167-1 riportata nell'*Official Journal of the European Community* (1990), con alcune modifiche indispensabili per l'analisi di materiali freschi (Wathelet et al., 2004).

La caratterizzazione degli acidi grassi è stata effettuata previa trasformazione nei corrispondenti metil-esteri via transmetilazione rapida con catalisi basica (Christopherson and Glass, 1969) utilizzando un Gas cromatografo Carlo Erba mod HRGC 5300 mega series con un detector a ionizzazione di fiamma (FID), equipaggiato con una colonna Rtx 2330 della Restek.

Pur essendo chiaro che con un germoplasma così ridotto rispetto alle potenzialità presenti in natura non siano possibili considerazioni generali, è possibile comunque evidenziare l'ampio range di variabilità presente nella collezione, con valori compresi tra il 10 ed il 56% di acido erucico nell'olio. Alcuni genotipi sono risultati infatti caratterizzati da un contenuto in acido erucico molto alto ($\geq 50\%$) (*Crambe abyssinica*, *Crambe hispanica*, *Barbarea verna*, *Sinapis alba*, *Iberis umbellata*) o alto ($\geq 40\%$) (*B. carinata*, *B. rapa*, *Eruca sativa*, *Lunaria annua*). Nello stesso tempo altre specie hanno mostrato un ridotto contenuto in acido erucico, ma comunque superiore al 10% e un contenuto predominante ($\geq 40\%$) di altri acidi grassi quali il linoleico 18:2 (*Orychophragmus violaceus*, *Cleome hassleriana*, *Cleome pungens spinosa*), il linolenico 18:3 (*Coronopus didymus*, *Descurainia pinnata*, *Descurainia sophia*, *Lepidium menziesii*, *Lepidium ruderales*, *Lepidium densiflorum*), il gadoleico 20:1 (*Limnanthes alba*), il nervonico C 24:1 (*Lunaria annua*).

Nella collezione sono presenti, nelle diverse parti della pianta, 27 profili, ed i relativi spettri, dei glucosinolati maggiormente rappresentativi. Alcuni di questi sono presenti in numerose specie come ad esempio la sinigrina (*Alliaria petiolata*, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. nigra*, *Chorispora tenella*, *Iberis umbellata*) la sinalbina (*Brassica Kaber*, *Brassica elongata*, *Cardaria draba*, *Lepidium draba*, *Sinapis alba*, *Sinapis arvensis*, *Tropaeolum peregrinum*), la Tropeolina (*Lepidium ruderales*, *Lepidium sativum*). In generale, a livello radicale la gluconasturtina è presente in numerose specie spesso come glucosinato dominante. Questa variabilità è destinata ad allargarsi se si considerano anche i profili completi degli acidi grassi e dei glucosinolati minori andando a considerare anche le frazioni meno rappresentative, ma tale aspetto sarà oggetto di ulteriori approfondimenti.

La caratterizzazione di alcune specie non è stata ancora completata per la presenza, soprattutto nel caso dei glucosinolati, di numerosi picchi al momento incogniti ed in corso di definizione.

Tabella 2 Principali acidi grassi nell'olio e glucosinolati in semi, piante e radici di Brassicaceae

		Principali acidi grassi nell'olio	Principale glucosinato nel seme
Brassicacee			
1	<i>Alliaria petiolata</i>		S P R Sinigrina
2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	18:2 28%; 18:3 22%	S Glucoerucina
3	<i>Barbarea verna</i>	22:1 55%, 18:1 20%	S P S Gluconasturtina
4	<i>Barbarea vulgaris</i>	18:1 31%, 22:1 29%	S R Glucobarbarina P Gluconasturtina
5	<i>Berteroa incana</i>		S Glucoberteroina
6	<i>Brassica albo glabra</i>		P Neoglucobrassicina R Gluconasturtina
7	<i>Brassica carinata</i>	22:1 40% 18:2 18%	S P Sinigrina R Gluconasturtina
8	<i>Brassica chinensis</i>		P R Neoglucobrassicina
9	<i>Brassica deflexa</i>		S Glucocheirolina P Glucoiberina R Gluconasturtina
10	<i>Brassica elongata</i>		P R Sinalbina
11	<i>Brassica japonica</i>		P Gluconapoleiferina R Glucobrassicinapina
12	<i>Brassica juncea</i>	22:1 33% 18:2 19%	S P Sinigrina (Fig. 4) R Gluconasturtina
13	<i>Brassica kaber</i>	18:1 34% 18:2 22%	S Sinalbina
14	<i>Brassica maurorum</i>	22:1 32% 18:3 17%	S P Gluconapina R Gluconasturtina
15	<i>Brassica narinosa</i>		P R Neoglucobrassicina

16	<i>Brassica napus</i>	AE**22:1 53% 18:1 13% OO 18:1 63% 18:2 18%	S P Progoitrina
17	<i>Brassica nigra</i>	22:1 40% 18:2 18%	S P Sinigrina R Gluconasturtina
18	<i>Brassica pekinensis</i>		S Progoitrina P Glucobrassicinapina R Neoglucobrassicina
19	<i>Brassica rapa</i>	22:1 45% 18:2 15%	S P R Gluconapina
20	<i>Brassica tournefortii</i>	22:1 32% 18:3 16%	S P R Glucoiberina
21	<i>Camelina microcarpa</i>	18:3 28% 18:2 28%	
22	<i>Camelina sativa</i>	18:3 32%, 20:1 15%	
23	<i>Capsella bursa-pastoris</i>		P Metossi-gluco Brassicina S Gluco Brassicina
24	<i>Cardaria draba</i>		S Sinalbina P Glucorafasatina R Glucoerucina
25	<i>Cheiranthus cheiri</i>	22:1 28%, 18:2 27%	S Glucocheirolina
26	<i>Chorispora tenella</i>	18:2 43%, 18:1 41%	S Sinigrina
27	<i>Conringia orientalis</i>	22:1 27%, 18:2 27%	S Glucoconringina
28	<i>Coronopus didymus</i>	18:3 44%, 18:1 18%	S Glucotropeolina
29	<i>Crambe abyssinica</i>	22:1 54% 18:1 17%	S P Epi-progoitrina R Neoglucobrassicina
30	<i>Crambe filiformis</i>	22:1 54% 18:1 20%	
31	<i>Crambe hispanica</i>	22:1 52% 18:1 21%	S P Gluconapoleiferina R Neoglucobrassicina
32	<i>Crambe glabrata</i>	22:1 42% 18:1 30%	
33	<i>Descurainia pinnata</i>	18:3 42%, 18:2 18%	S Gluconapina
34	<i>Descurainia sophia</i>	18:3 43%, 18:2 20%	S P R Gluconapina
35	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	18:3 28%, 22:1 15%	S R Glucoerucina P Glucosativina
36	<i>Eruca vesicaria</i>	22:1 36%, 18:1 19%	S Glucoerucina
37	<i>Eruca sativa</i>	22:1 47%, 18:1 12%	S R Glucoerucina P Glucorafanina
38	<i>Erucastrum gallicum</i>	22:1 39%, 18:3 16%	S Glucoerucina
39	<i>Erysimum officinale</i>	18:3 38%, 18:1 15%	S P R IsopropilGlucoSinolato
40	<i>Hirschfeldia incana</i>	18:3 30%, 22:1 28%	S P Gluconapina R Gluconasturtina
41	<i>Iberis amara</i>	22:1 42%, 18:1 20%	S P R Glucoiberina
42	<i>Iberis linifolia</i>	22:1 37% 18:3 17%	
43	<i>Iberis umbellata</i>	22:1 53%, 18:1 18%	S P Sinigrina R Glucoalissina
44	<i>Isatis tinctoria</i>		S Gluconapina P Gluco Brassicina R Gluco Brassicina/ Neoglucobrassicina
45	<i>Lepidium campestre</i>	18:3 36%, 22:1 24%	S P Sinalbina R Glucoerberteroina
46	<i>Lepidium densiflorum</i>	18:3 49%, 18:1 21%	
47	<i>Lepidium draba</i>		S Sinalbina P Glucoerucina
48	<i>Lepidium menziesii</i>	18:3 50%, 20:1 14%	S P R Etil-GlucoSinolato
49	<i>Lepidium ruderale</i>	18:3 55%, 18:2 20%	S P R Glucotropeolina

Collezione di semi della famiglia delle Brassicacee
e loro caratterizzazione per il contenuto in glucosinolati e in acidi grassi

50	<i>Lepidium sativum</i>	18:1 30% 18:3 29%	S P R Glucotropeolina
51	<i>Lesquerella fendleri</i>	18:1 29% 18:1 OH 51%	S Glucoiberina
52	<i>Lobularia maritima</i>		S Gluconapina
53	<i>Lunaria annua</i>	22:1 41%, 24:1 23%	S Isoproil-Glucosinolato/ Glucoalissina
54	<i>Matthiola incana</i>		S Glucorafenina
55	<i>Orychophragmus violaceus</i>	18:2 54%, 18:1 17%	S P Epi-progoitrina
56	<i>Raphanus raphanistrum</i>	22:1 37%, 18:3 22%	
57	<i>Raphanus sativus oleiformis</i>	18:1 36%, 22:1 15%,	S P Glucorafenina R Glucorafasatina
58	<i>Rapistrum rugosum</i>	22:1 36%,	S P R Glucocheirolina
59	<i>Sinapis alba</i>	22:1 56%, 18:1 15%	S P Sinalbina
60	<i>Sinapis arvensis</i>	22:1 38%, 18:2 19%	S P R Sinalbina
61	<i>Sisymbrium austriacum</i>	18:3 38%, 18:2 15%	S Glucosisimbrina
62	<i>Sisymbrium contortum</i>	18:3 35% 18:2 13%	
63	<i>Sisymbrium loeselii</i>	18:3 36%, 22:1 14%	
64	<i>Sisymbrium polyceratum</i>	18:3 35%, 22:1 20%	S Sisausticina (Fig. 5)
65	<i>Trachistoma ballii</i>	18:3 28.4%, 22:1 31.4%	S P R Glucocheirolina
Capparidaceae			
66	<i>Cleome graveolensis</i>	18:2 68% 18:1 15%	
67	<i>Cleome hassleriana</i>	18:2 74% 18:1 12%	S P R Capparina/Glucocleomina
68	<i>Cleome spinosa</i>	18:2 73% 18:1 14%	S P R Capparina/Glucocleomina
69	<i>Cleome trachysperma</i>	18:2 70% 18:1 13%	S P R Capparina/Glucocleomina
70	<i>Cleome viscosa</i>	18:2 68% 18:1 11%	
Limnanthaceae			
71	<i>Limnanthes alba</i>	20:1 58% 22:1 22%	S P R Glucolimnantina
Resedaceae			
72	<i>Reseda luteola</i>	18:3 58% 18:2 22%	
Tropaeolaceae			
73	<i>Tropaeolum peregrinum</i>		S Sinalbina/Isopropil- glucosinolato

Legenda:

* S Seme P Pianta R Radici;

** HE Varietà Alto erucico. 00 Varietà Basso erucico, basso glucosinolato.

1.5 La collezione di glucosinolati purificati

Il gruppo di biochimica del CRA-CIN di Bologna, dal 1992 a tutt'oggi, ha purificato ad un buon grado di purezza dapprima il 4-metiltio-3-butenil glucosinolato (glucorafasatina) da radici di rafano (Visentin et al., 1992) ed in seguito, una collezione dei più importanti glucosinolati maggiormente diffusi in natura (foto 9) e caratteristici delle principali classi della loro catena laterale (alchilica, idrossilica, aromatica, tiofunzionalizzata).



Foto 9 - Collezione di glucosinolati purificati del CRA-CIN

La purificazione è stata realizzata estraendo i glucosinolati dai semi o da foglie disidratate mediante una soluzione di metanolo o etanolo al 70% ad una temperatura di 75-80°C. Dopo centrifugazione, la soluzione limpida è stata sottoposta a cromatografia di scambio anionico con DEAE Sephadex A-25. I glucosinolati sono stati eluiti con una soluzione salina di solfato di potassio ed in seguito recuperati per precipitazione in etanolo assoluto mantenuto a -20°C (Visentin et al., 1992). Da alcuni anni, al fine di incrementare il grado di purezza dei composti da utilizzare per prove di attività biologica in collaborazione con gruppi di farmacologi e tossicologi, è stato introdotto un ulteriore step cromatografico di gel filtrazione su resina Sephadex G-10. Lo schema di purificazione è riportato nella fig. 7:



Figura 7 – Metodo per la purificazione dei glucosinolati

Numerosi studi, eseguiti sia *in vitro* sia *in vivo* su animali da laboratorio, hanno dimostrato che alcuni isotiocianati a catena laterale alchilica tiofunzionalizzata, quali il sulfurafane, l'erucina e la rafasatina ottenuti dall'idrolisi enzimatica dei corrispondenti glucosinolati, presenti in broccoli, cavoli pigmentati ed in germogli di broccoli, rucola e daikon), sono sostanze ad azione potenzialmente antitumorale "chemiopreventiva" in quanto capaci di modulare il livello degli enzimi della cosiddetta Fase II preposti alla detossificazione delle sostanze cancerogene introdotte nell'organismo con la dieta (Fahey & Kensler, 2007). Recenti studi effettuati su ratti alimentati con estratti acquosi liofilizzati di broccoli, contenenti circa il 15% di glucorafanina, hanno dimostrato che esiste un effetto significativo di protezione contro la cancerogenesi

indotta. Questi risultati sono confermati anche da studi epidemiologici realizzati rilevando dati concernenti il consumo delle Brassicaceae da tavola.

Sebbene il meccanismo attraverso cui queste orticole esercitano il loro effetto protettivo non sia ancora del tutto chiarito, si ritiene che gli isotiocianati bioattivi, ottenuti dai GLs precursori, agiscano tramite un meccanismo multipotente. La loro attività chemioprotettiva è attribuita a diverse funzioni biologiche, infatti numerosi lavori scientifici riportano che essi sono in grado di inibire lo sviluppo del cancro attraverso molteplici meccanismi (Zhang Y., 2004) quali:

a- la protezione del DNA attraverso la modulazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo delle sostanze cancerogene;

b- la riduzione dello stress ossidativo attraverso un incremento delle difese antiossidanti cellulari;

c- l'inibizione della proliferazione di cellule tumorali.

I glucosinolati al momento disponibili sottoforma di sali di potassio in quantità di grammi e ad un elevato grado di purezza sono brevemente descritti in tabella 3.

Il loro utilizzo ha consentito di svolgere, in collaborazione con altre strutture di ricerca, numerosi studi confluiti in articoli su riviste internazionali nel corso del periodo 2010-2012; (per citarne alcuni: Wagner et al 2010; Abdull Razis 2011 b; Zanichelli et al 2011; Baasanjav-Gerber 2011; Krehl et al 2012).

Tabella 3 Descrizione dei glucosinolati purificati a partire da semi e piante delle Brassicaceae

1) Nome comune: GLUCOTROPEOLINA R- catena laterale: Benzil PM: 447.6 Purezza media: 97-99% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Lepidium sativum</i>	Abbreviazione:	GTL
2) Nome comune: GLUCOERUCINA R- catena laterale: 4-Metiltiobutil PM: 459.6 Purezza media: 95% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Eruca sativa</i>	Abbreviazione:	GER
3) Nome comune: GLUCORAFANINA R- catena laterale: 4-Metilsulfinilbutil PM: 475.6 Purezza media: 97-99% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Cavolo nero di Toscana</i>	Abbreviazione:	GRA
4) Nome comune: GLUCORAFASATINA R- catena laterale: 4-Metiltio-3-butenil PM: 457.6 Purezza media: 95% (da step 3) Purificato a partire da germogli di: <i>Raphanus sativus</i>	Abbreviazione:	GRH
5) Nome comune: GLUCORAFENINA R- catena laterale: 4-Metilsulfinil-3-butenil PM: 473.6 Purezza media: 95% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Raphanus sativus</i>	Abbreviazione:	GRE
6) Nome comune: SINIGRINA R- catena laterale: 2-Propenil PM: 415.5 Purezza : 97-99% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Brassica carinata</i>	Abbreviazione:	SIN
7) Nome comune: SINALBINA R- catena laterale: p-Idrossibenzil PM: 463.6 Purezza media: 95% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Sinapis alba</i>	Abbreviazione:	SNB

8) Nome comune: GLUCONASTURTINA R- catena laterale: 2-Fenilettil PM: 461.5 Purezza media: 95% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Barbarea verna</i>	Abbreviazione:	GST
9) Nome comune: GLUCONAPINA R- catena laterale: 3-Butenil PM: 411.5 Purezza media: 92% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Brassica rapa</i>	Abbreviazione:	GNA
10) Nome comune: GLUCOIBERINA R- catena laterale: 3-Metilsulfinilpropil PM: 461.6 Purezza media: 92% (da step 3) Purificato a partire da semi di: <i>Iberis amara</i>	Abbreviazione:	GIB
11) Nome comune: EPI-PROGOITRINA R- catena laterale: (2S)-2-Idrossi-3-butenil PM: 427.5 Purezza media: 75% (da step 2) Purificato a partire da semi di: <i>Crambe abyssinica</i>	Abbreviazione:	EPI
12) Nome comune: GLUCOCHEIROLINA R- catena laterale: 3-Metilsulfonilpropil PM: 477.6 Purezza media: 70% (da step 2) Purificato a partire da semi di: <i>Rapistrum rugosum</i>	Abbreviazione:	GCH

1.6.2 Bibliografia

- Abdull R., Ahmad F., Bagatta M., De Nicola G.R., Iori R., Ioannides C. (2011 a). Induction of epoxide hydrolase and glucuronosyl transferase by isothiocyanates and intact glucosinolates in precision-cut rat liver slices: importance of side chain substituent and chirality. *Archives of Toxicology* 85(8), 919-927.
- Abdull R., Ahmad F., Bagatta M., De Nicola G.R., Iori R., Ioannides C. (2011 b). Up-regulation of cytochrome P450 and phase II enzyme systems in rat precision-cut rat lung slices by the intact glucosinolates, glucoraphanin and glucoerucin. *Lung Cancer*. 71(3):298-305
- Baasanjav-Gerber C., Monien B.H., Mewis I., Schreiner M., Barillari J., Iori R., Glatt H. (2011). Identification of glucosinolate congeners able to form DNA adducts and to induce mutations upon activation by myrosinase. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(5):783-792
- Brown P.D. and Morra M.J., (1997). Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy*, 61: 167-231.
- Burmeister W.P., Cottaz S., Driguez H., Iori R., Palmieri S., Henrissat B. T. (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5 (5), 663-676.
- Christopherson S.W. and Glass R.L. (1969). Preparation of milk fat methylesters by alcoholysis in essentially non alcoholic solutions. *Journal of Dairy Science*, 52: 1289-1290
- Curto G., Dallavalle E., Lazzeri L. (2005). Life cycle duration of *Meloidogyne incognita* and host status of Brassicaceae and Capparaceae selected for glucosinolate content. *Nematology*, 7: 203-212.
- Eriksson S., Andréasson E., Ekbohm B., Granén G., Pontoppidan B., Taipalensuu J et al. (2002). Complex formation of myrosinase isoenzymes in oilseed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins. *Plant Physiology* 129, (4),1592-9.
- Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talalay P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanate among plants. *Phytochemistry* 56, 5-51.
- Fahey J.W. & Kensler. (2007). Role of dietary supplements/nutraceuticals in chemoprevention through induction of cytoprotective enzymes *Chemical Research in Toxicology*, 4, 572-576.

- Fimognari C., Nusse M., Cesari R., Iori R., Cantelli-Forti G., Hrelia P. (2002). Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis*, 23 (4), 581-586.
- Furlan L., Bonetto C., Finotto A., Lazzeri L., Malaguti L., Patalano G., Parker W. (2010). The efficacy of biofumigant meals and plants to control wireworm populations.. *Industrial Crop and Products* 31, 245-254.
- Halkier B.A. (1999). Glucosinolates. In *Naturally Occurring Glycosides* Ed. By Raphael Ikan (John Wiley & Sons Ltd), 193-223.
- Kjaer A. (1976). *Glucosinolates in the cruciferae*. In Jones (Ed) *The biology and chemistry of the cruciferae*. Pag. 207-219. Academic London.
- IPCN. IPCN Chromosome reports Missouri Botanical Garden [http: www.tropicos.org](http://www.tropicos.org).
- Krehl S., Loewinger M., Florian S., Kipp A., Banning A., Wessjohann L., Brauer M., Iori R., Esworthy RS., Chu F.F., Brigelius-Flohé R. (2012). Glutathione peroxidase-2 and selenium decreased inflammation and tumors in a mouse model of inflammation-associated carcinogenesis whereas sulforaphane effects differed with selenium supply. *Carcinogenesis*. In stampa su: [10.1093/carcin/bgr288](https://doi.org/10.1093/carcin/bgr288).
- Lazzeri L., De Mattei F., Bucelli F., Palmieri S. (1997). Crambe oil - a potential new hydraulic oil and quenchant. *Industrial Lubrication & Tribology* 49, 71-77.
- Lazzeri L., Baruzzi G., Malaguti L., Antoniaci L., (2003). Replacing methyl-bromide in annual strawberry production with glucosinolate containing green manure crops. *Pest Management Science* 59: 983-990.
- Lazzeri L., Curto G., Leoni O., Dallavalle E. (2004). Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 : 6703-6707.
- Lazzeri L., Curto G., Dallavalle E., D'Avino L., Malaguti L., Santi R., Patalano G. (2009). Nematicidal efficacy of biofumigation by defatted Brassicaceae meal for control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. on zucchini crop. *Journal of Sustainable Agriculture*, 33:349-358.
- Manici L.M., Lazzeri L., Palmieri S. (1997). In vitro antifungal activity of glucosinolates and their enzyme derived products towards plant pathogenic fungi. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45, 2768-2773.
- Mari M., Iori R., Leoni O., Marchi A. (1993). In vitro activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against fruit postharvest pathogens. *Annals of Applied Biology* 123, 155-164.
- Official Journal of the European Community. (1990). EEC 1864/90, June Enclosure VIII J.O. n.L170: 27-34.
- Pessina A., Thomas R.M., Palmieri S., Luisi P.L. (1990). An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization. *Archives Biochemistry and Biophysic* 280,383-389.
- Rosa E.A.S., Heaney R.K., Fenwick G.R., Portas C.A.M. (1997). Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* 19: 99-215.
- Sanchi S., Odorizzi S., Lazzeri L., Marciano P. (2005). Effect of Brassica carinata seed meal treatment on the Trichoderma harzianum T39-Sclerotinia species interaction. *Acta Horticulturae* 698: 287-292.
- Toniolo L. e Mosca G. (1986). *Il colza: olio proteine foraggio*. Reda Ed. Roma.
- Vamerali T., Bandiera M., Mosca G., (2010). Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review, *Environmental Chemistry Letters*, 8:1-17 Wagner A., Ernst I., Iori R., Desel C., Rimbach G. (2010) Sulforaphane but not ascorbigen, indole-3-carbinole, and ascorbic acid activates the transcription factor Nrf2 and induces phase-2 and antioxidant enzymes in human keratinocytes in culture *Experimental Dermatology*, 19 (2), 137-144.
- Visentin M., Tava A., Iori R., Palmieri S. (1992). Isolation and Identification of trans-4-(Methylthio)-3-butenyl- Glucosinolate from Radish Roots (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1687-1681.
- Wathelet J.P., Iori R., Leoni O., Rollin P., Quinsac A., Palmieri S. (2004). Guidelines for glucosinolates analysis in green tissues used for biofumigation. *Agroindustria* 3 (3), 257-266.

- Zanichelli F., Capasso, S., Cipollaro M., Pagnotta E., Cartenì M., Casale F., Iori R., Galderisi U., (2011). Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect Age In stampa, doi: 10.1007/s11357-011-9231-7.
- Zhang Y. (2004). Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. Mutation Research 555 173-190.

SILYBUM MARIANUM (L.) GAERTN*

Responsabile Scientifico: Dr. Tommaso Martinelli

CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali
Via di Corticella, 133 – 40128 Bologna

Riassunto

Silybum marianum è stato utilizzato per secoli come pianta utile nella medicina tradizionale. Oggi la specie è coltivata come coltura officinale per la formulazione di prodotti farmaceutici e fitoterapici. *S. marianum* è una specie a rapido accrescimento capace di competere efficientemente con altre colture e, per questo motivo, è spesso considerata una pericolosa infestante. Le proprietà medicinali di *S. marianum* sono attribuite alla silimarina, una miscela di diversi flavolignani, presente prevalentemente nel seme di questa pianta. La silimarina è stata inoltre valutata come composto interessante per la produzione di cosmetici e antiossidanti ad uso alimentare. Il seme contiene inoltre una buona quantità di olio (25-30%) e proteina (19% circa). Nonostante la specie non sia stata oggetto di intensi programmi di miglioramento genetico, sono state descritte produzioni di granella fino a 2 Mg ha⁻¹ e 20 Mg ha⁻¹ di biomassa. In questo momento presso il Centro di Ricerca per le Colture Industriali (Bologna) viene conservata e studiata una collezione di 26 genotipi di *S. marianum* provenienti da diverse località, al fine di sviluppare una coltura industriale alternativa secondo il paradigma della bioraffineria.

Summary

Silybum marianum has been used as a medical plant for centuries. Nowadays it is cultivated as an officinal plant for the production of pharmaceutical and phytotherapeutic products. Nevertheless, *S. marianum* is a fast growing species able to compete efficiently with other crops or wild species and is thereby considered a dangerous weed in many environments. The medical properties of *S. marianum* are due to silymarin, a mixture of different flavolignans, mainly accumulated into the seed. Silymarin has also been proposed as an interesting molecule for the production of cosmetics and food antioxidants. The seeds contain also an interesting amount of oil (25-30%) and protein (ca 19%). Despite *S. marianum* has not undergone intensive breeding programmes, this species has been reported to produce up to 2 Mg ha⁻¹ of seed and 20 Mg ha⁻¹ of biomass. At the Research Centre for Industrial Crops (Bologna, Italy) a collection of 26 *S. marianum* genotypes of different origin is actually preserved and studied in order to develop a useful industrial crop according to biorefinery concept.

Parole chiave

Cardo mariano, cardo di S. Maria, silmarina, bioraffineria, biomassa, biocarburanti, biomolecole, colture industriali

Keywords

Milk thistle, Blessed milk thistle, silymarin, biorefinery, biomass, biofuel, biomolecole, industrial crop

1.1 Introduzione

Silybum marianum (L.) Gaertn., comunemente detto cardo mariano, cardo di S. Maria o cardo lattario (Pignatti, 1982), è una specie vegetale originaria del bacino mediterraneo che si è successivamente diffusa in molte zone del pianeta sia come pianta spontanea (Holm *et al.* 1979) che come specie coltivata (Andrzejewska *et al.* 2011). Il cardo mariano è conosciuto da lungo tempo come specie utile.

Rilievi archeologici hanno mostrato che questa tipologia di cardo era probabilmente già utilizzata in epoca neolitica in ambiente mediterraneo (Rottoli, 2000). Oggi il cardo mariano è coltivato come pianta officinale per la produzione di silimarina. La silimarina, contenuta prevalentemente nel seme di questa specie, è stata riconosciuta come il composto bioattivo alla base delle

* doi:10.4458/0986-17

proprietà curative degli estratti di cardo mariano. Attualmente è utilizzata per la formulazione di preparati per uso farmaceutico e fitoterapico in tutto il mondo. Gli effetti farmacologici comprovati della silimarina sono principalmente correlati alla funzionalità epatica e sono attribuibili alla sua elevata attività antiossidante, al suo effetto sulla sintesi dell'RNA ribosomale nei processi di rigenerazione del fegato e all'effetto inibente sulla deposizione delle fibre di collagene nei processi di cirrosi epatica (Fraschini *et al.* 2002). Inoltre è da sottolineare l'effetto della silimarina come stabilizzante e regolatore della permeabilità della membrana cellulare dell'epatocita. Questa sua caratteristica la rende un efficace rimedio contro i danni causati da composti tossici per il fegato come ad esempio le tossine di *Amanita phalloides* (Desplaces *et al.* 1975). Sono attualmente in studio gli effetti della silimarina come agente antitumorale (Ramasamy *et al.* 2008; Bode e Dong, 2009). In ambito zootecnico, l'azione della silimarina su colture cellulari di cellule mammarie di bovino e topo ha rivelato un aumento della proliferazione cellulare e dell'espressione dei geni che codificano per la β -caseina (Starvaggi Cucuzza *et al.* 2010). Potkanski *et al.* (2001) hanno riscontrato che, in vivo, la somministrazione di semi di cardo mariano a vacche in lattazione determina un aumento nel contenuto di grassi totali del latte e un aumento della frazione degli acidi grassi insaturi. Tedesco *et al.* (2004) hanno inoltre riportato un significativo aumento della produzione di latte in vacche trattate con silimarina. Questi risultati lasciano ipotizzare anche un possibile uso della silimarina in ambito zootecnico.

Oltre che per la produzione di silimarina *S. marianum* si caratterizza come una specie che ben si adatta ad ambienti differenti, con elevato vigore vegetativo e con buona produttività di biomassa e granella, questa ultima caratterizzata da un interessante contenuto di olio e proteina. Questi aspetti uniti alla produzione di biomolecole ad elevato valore aggiunto (silimarina) rendono *S. marianum* un ottimo candidato per lo sviluppo di una coltura industriale alternativa all'interno del paradigma della bioraffineria (Kamm e Kamm, 2004).

1.2 Descrizione generale della specie

Il genere *Silybum* appartiene alla famiglia delle Asteraceae e raggruppa 2 specie: *S. marianum* e *S. eburneum* (Tutin *et al.* 1976). Recentemente è stata riscontrata un'alta interfertilità tra i due genotipi che lascia ipotizzare che queste siano, in realtà, solo varianti di una stessa specie (Hetz *et al.* 1994). Nonostante i fiori del cardo mariano vengano spesso visitati da insetti pronubi la specie è stata descritta come prevalentemente autogama con una percentuale di allogamia del 2% (Hetz *et al.* 1994). *S. marianum* è diploide con un corredo cromosomico di $2n=34$ (Tutin *et al.* 1976, Asghari-Zakaria *et al.* 2008). È una specie tipica del corotipo Mediterraneo-Turanico (Pignatti, 1982). In Italia è descritta in tutto il territorio nazionale tra 0 e 1100 m sul livello del mare. Fanno eccezione il Friuli, gran parte della pianura Padana e le Alpi (Pignatti, 1982). In Italia settentrionale è presente per lo più come relitto di antiche colture ad uso officinale ed è attualmente in fase di contrazione (Pignatti, 1982). In natura i semi germinano in autunno e la fioritura si ha l'estate successiva, il ciclo vegetativo è di 8-9 mesi (Groves e Kaye, 1989).

Allo stadio di rosetta la pianta è caratterizzata da foglie alternate e glabre che possono raggiungere i 50-60 cm di lunghezza e i 20-30 cm di larghezza (Karkanis *et al.* 2011; Figura 1). Le foglie presentano margini spinosi e sono tipicamente screziate di bianco. Lo stelo è eretto, più o meno ramificato, e presenta foglie di dimensioni ridotte rispetto a quelle della rosetta. Le dimensioni dello stelo variano tra i 40 e i 200 cm di altezza al variare delle condizioni di fertilità del suolo e di quelle ambientali. I capolini sulle ramificazioni principali hanno un diametro di circa 4-7 cm (Pignatti, 1982). Il fiore è normalmente di colore fucsia-violetto (Figura 1) ma sono stati descritti genotipi a fiore bianco (Nyiredy *et al.* 2008).



Figura 1 *Silybum marianum* (L.) Gaertn. A, stadio di rosetta alla fine del periodo invernale, notare la tipica foglia variegata; B, singolo capolino in piena fioritura; C, singola pianta in fase di fine fioritura, si noti la scalarità di maturazione e il grande numero di capolini presenti.

1.3 Ecologia della specie

S. marianum è una specie tendenzialmente nitrofila tipica di ambienti antropizzati (Gabay *et al.* 1994) e si trova spesso localizzata ai bordi di strade, fossi e campi coltivati (Tutin *et al.* 1976; Pignatti, 1982).

Comunemente i semi di cardo mariano germinano in autunno al verificarsi delle prime piogge e la maturazione del seme si ha in genere ad inizio estate. La specie non richiede obbligatoriamente vernalizzazione per l'induzione della fase riproduttiva anche se le basse temperature favoriscono la successiva fioritura. I semi eventualmente germinati in primavera riescono di norma a portare a termine il ciclo colturale entro l'anno (Groves e Kaye, 1989) anche se, in queste circostanze, le dimensioni della pianta rimangono generalmente ridotte. Gli acheni prodotti all'interno dei capolini sono muniti di pappo e la dispersione del seme avviene prevalentemente per via anemofila. Oltre a quella anemofila, anche la mirmecocoria è stata descritta come un importante meccanismo di dispersione del seme in questa specie (Danin e Yom-Tov, 1990). Si è misurato che ciascuna pianta di *S. marianum* possa produrre fino a 6350 semi (Dodd, 1989), caratteristica questa che contribuisce a renderla una specie potenzialmente invasiva. Il seme appena prodotto è caratterizzato da un certo livello di dormienza, di norma tale fenomeno viene spontaneamente a scomparire nei mesi successivi alla maturazione (Groves e Kaye, 1989; Gabay *et al.* 1994). Coerentemente con queste osservazioni Sindel (1991) riporta una germinabilità del 94% trascorso il breve periodo di dormienza iniziale e osserva che i semi possono rimanere vitali nel terreno anche per periodi superiori ai 9 anni. La spiegazione di tale fenomeno deriva dall'osservazione che il tasso di germinazione dei semi di cardo mariano diminuisce all'aumentare della profondità di interrimento degli stessi. Young *et al.* 1978 hanno infatti documentato che si ha una buona germinabilità del seme fino a 8 cm di interrimento e una mancata germinazione dei semi posti più in profondità. Al contrario Montemurro *et al.* (2007) rilevano che la profondità limite per la germinazione dei semi è di 3 cm. Queste osservazioni lascerebbero ipotizzare un effetto della radiazione luminosa sulla germinazione dei semi di cardo mariano ma a tale riguardo sono stati riportati risultati contrastanti (Pook, 1983; Montemurro *et al.* 2007).

La germinazione in vitro avviene a temperature diurne comprese tra i 15 e i 40°C con un optimum intorno ai 25-30°C (Groves e Kaye, 1989; Montemurro *et al.* 2007). Al contrario Ghavami e Ramin (2007) documentano una temperatura ottimale di germinazione di 15°C in condizioni di elevata e bassa salinità del mezzo di coltura. La germinazione del seme avviene quando si hanno condizioni di umidità del substrato colturale in grado di generare un potenziale idrico superiore a -0,5 MPa (Groves e Kaye, 1989). In maniera simile, Montemurro *et al.* (2007) hanno trovato che la germinazione risulta completamente inibita

con potenziali idrici inferiori a $-0,8$ MPa. Le plantule di cardo mariano sono in grado di crescere rapidamente anche in condizioni di elevato ombreggiamento (Pook, 1983).

Dopo la germinazione si ha la formazione di una rosetta compatta che tende a competere molto efficientemente per la radiazione luminosa e i nutrienti con le altre specie spontanee presenti. *S. marianum* è una specie che tende ad essere dominante nelle aree che colonizza (Figura 2). In zone a clima mediterraneo si è misurata una drastica depressione delle altre specie spontanee nelle aree in cui *S. marianum* è presente (Gabay *et al.* 1994). In aree dove non si applicano procedure per il controllo delle infestanti, il cardo mariano si è rivelato una infestante temibile tipica delle colture a ciclo autunno-vernino nei confronti delle quali risulta essere molto competitivo (Khan *et al.* 2009). In alcune aree del Pakistan, a causa di infestazioni di cardo mariano, sono state registrate riduzioni della produttività del grano del 7-28% in annate secche e del 28-37% in annate più umide (Khan e Marwat, 2006). Analogamente in sud Italia cardo mariano è stato recentemente descritto come una specie infestante in espansione (Montemurro *et al.* 2007). Anche in aree gestite a pascolo si comporta come una specie infestante (Dodd, 1989) e costituisce un serio problema in molte zone dell'Australia (Michael, 1968). La proliferazione della specie nei pascoli è da imputarsi prevalentemente alla ridotta palatabilità della foglia dovuta alla sua spinosità, anche se, fenomeni di allelopatia indotti da estratti vegetali di cardo mariano sono stati recentemente descritti (Khan *et al.* 2011). *S. marianum* è, inoltre, stato ampiamente descritto come specie tossica (e in molti casi mortale) per il bestiame che accidentalmente se ne nutre. Tale tossicità è dovuta all'alto contenuto di nitrati che la pianta può accumulare nella foglia quando si sviluppa in terreni ricchi di azoto (Knott, 1971).

S. marianum è stato inoltre descritto come interessante specie mellifera (Rasic *et al.* 2009).

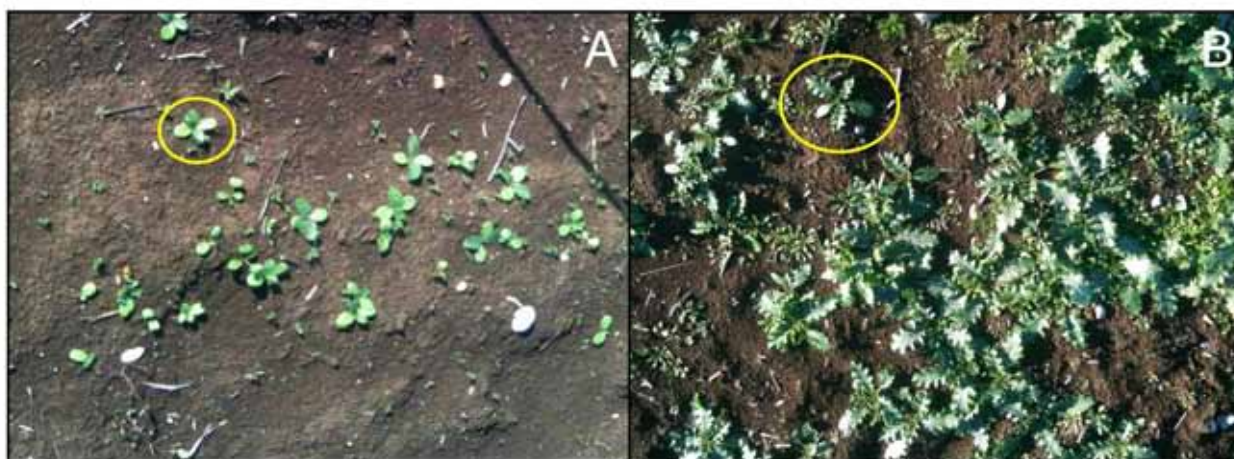


Figura 2 Piante spontanee di cardo mariano in condizioni di pieno campo (Tormancina, RM). A, mese di novembre, 2 settimane dopo l'ultima lavorazione del terreno, si noti la dimensione delle plantule di cardo mariano (cerchio giallo) rispetto alle altre specie infestanti presenti in campo; B, stessa area fotografata alla fine del mese di dicembre, si noti il grado di copertura dovuto alle piante di cardo mariano (cerchio giallo) rispetto alle altre specie infestanti presenti in campo.

1.4 Agronomia

In molte realtà agricole il cardo mariano è una specie coltivata. Nonostante la coltura non sia stata oggetto di intensi programmi di miglioramento genetico, in Polonia, sono state riportate produttività di granella dai 550 ai 1680 Kg ha⁻¹ e produttività massime fino a 2000 Kg ha⁻¹ (Andrzejewska *et al.* 2011). La Polonia è attualmente tra i maggiori produttori di cardo mariano con circa 2000 ha messi a coltura con questa specie (Andrzejewska *et al.* 2011). Benché siano state registrate cultivar migliorate per la produzione di silimarina, come ad esempio la varietà polacca Silma, la coltura è ancora caratterizzata da molti tratti tipici delle specie selvatiche. Tra questi possiamo elencare la spinosità della foglia, la scalarità della fioritura (Figura 1) e non ultima la presenza del pappo, causa dei processi di dispersione anemofila del seme. La semina può essere autunnale o primaverile ma in

ambiente mediterraneo sono le semine anticipate a massimizzare lo sviluppo della coltura. La resistenza al freddo è buona. In nord Italia, allo stadio di rosetta, temperature invernali di $-8,6^{\circ}\text{C}$ non hanno comportato alcun danno alla coltura. Al fine di limitare la scalarità della produzione e minimizzare così le perdite di seme in fase di raccolta, vengono spesso adottate densità di semina di 30-50 piante m^2 (Andrzejewska *et al.* 2011). Al contrario, nel caso si voglia privilegiare anche la produzione di biomassa, sono preferibili densità di semina molto inferiori. *S. marianum* si adatta a terreni più o meno pesanti e cresce bene a pH compresi tra 5,5 e 7,6 (Karkanis *et al.* 2011). È tipicamente una coltura non irrigua. Andrzejewska *et al.* (2011), in una prova sperimentale di 3 anni, hanno riportato una produttività media di 1230 Kg ha^{-1} in semina primaverile con soli 180 mm di pioggia durante l'intero ciclo colturale. La specie che risponde bene alle fertilizzazione azotate. In Polonia vengono normalmente somministrate prima della semina 50 U di azoto, circa 30 U di fosforo e circa 60 U di potassio (Karkanis *et al.* 2011). La raccolta, al fine di minimizzare le perdite di seme, deve essere effettuata prima della maturità fisiologica del seme. Curioni *et al.* (2002) indicano che il momento migliore per la raccolta si ha quando la coltura si presenta con il 35-83% dei capolini secchi o quantomeno con fiori secchi e brattee ancora verdi.

Le specie *Puccinia punctiformis* e *Microbotryum silybum* sono state descritte come crittogame dannose per il cardo mariano (Berner *et al.* 2002; Souissi *et al.* 2005). Tra gli insetti potenzialmente dannosi per la coltura è stato descritto il coleottero curculionide *Larinus latus* (Abdel-Moniem, 2002).

1.5 Il seme

In cardo mariano quello che è comunemente definito seme è, da un punto di vista botanico, un frutto indeiscente contenente al suo interno un unico seme. Per comodità utilizzeremo qui il termine seme riferendoci all'intero frutto del cardo mariano.

A maturità il seme è di colore marrone scuro, spesso striato di nero. Il peso dei mille semi può variare tra i 19 e i 25,5 g (Barclay e Earle, 1974) e le sue dimensioni sono mediamente di 5,8 per 2,9 mm (Groves e Kaye, 1989; Figura 3). Ad una estremità del seme sono presenti il pappo e l'elaiosoma, rispettivamente responsabili dei meccanismi di dispersione anemofila e mediante mirmecocoria. Quando il pappo si stacca l'elaiosoma rimane normalmente adesso al seme (Figura 3). La rimozione dell'elaiosoma ad opera dell'azione delle formiche, o per cause diverse, non altera la germinabilità del seme (Danin e Yom-Tov, 1990; Gabay *et al.* 1994).

A maturità fisiologica il seme contiene circa il 7% di acqua. Barclay e Earle (1974) analizzando semi provenienti da 4 differenti accessioni di cardo mariano hanno riportato un contenuto di proteina totale variabile tra 18,6 e 19,1% ($\text{N} \times 6,25$) e un contenuto di olio tra 27,1 e 30,4% (percentuali relative al peso secco del seme). Per quanto riguarda la composizione degli acidi grassi dell'olio Malekzade *et al.* 2011 riportano un contenuto di acido oleico e linoleico rispettivamente del 36,7 e 39,7%, altri acidi grassi presenti sono il palmitico (10,2%), lo stearico (6,9%), l'arachico (3,6%) e il beenico (2,5%). In tracce sono presenti C18:3 e C20:1. Questi valori del contenuto di acidi grassi danno luogo ad un numero di iodio dell'olio di circa 100 (calcolato secondo Kyriakidis e Katsiloulis, 2000). Garaev *et al.* 2010, confrontando le analisi sugli acidi grassi dell'olio di cardo mariano disponibili in letteratura ed effettuate su accessioni diverse coltivate in ambienti diversi, hanno evidenziato un'interessante variabilità nel contenuto di acido oleico (tra 20,9 e il 38,2%) e linoleico (tra 34,0 e 60,3%), e una sostanziale omogeneità nei valori relativi agli altri acidi grassi presenti nell'olio. In condizioni di stress idrico, Malekzadeh *et al.* (2011) hanno riportato un aumento degli acidi grassi insaturi registrando un aumento del contenuto di acido linoleico a scapito dell'oleico. L'olio ha inoltre un contenuto di tocoferoli totali di 260 ppm di cui l' α -tocoferolo risulta essere il costituente principale (84,5%; El-Mallah *et al.* 2003). Il contenuto di steroli totali è di 6 mg/g (El-Mallah *et al.* 2003). Le informazioni disponibili lasciano ipotizzare un possibile utilizzo dell'olio di cardo mariano per la produzione di biocarburante.

La silimarina è il composto bioattivo alla base delle proprietà fitoterapeutiche e farmacologiche del cardo mariano. Questa è costituita da una miscela di diversi flavolignani fra i quali i costituenti principali sono: silicristina, silidianina, silibina (presenti i diastereoisomeri A e B), e isosilibina (A e B) (Lee *et al.* 2006). Questi isomeri hanno

dimostrato di possedere diverso livello di attività biologica (Dvorak *et al.* 2003). La silimarina è prevalentemente contenuta nel seme. Secondo Adzet *et al.* (1987) il suo contenuto varia tra il 2,25 e lo 0,62% (peso secco) del seme, ma sono stati misurati contenuti fino al 4,2% (Martin *et al.* 2006). Differenti genotipi di cardo mariano hanno inoltre mostrato profili diversi nella composizione relativa dei diversi costituenti della silimarina. Sono stati identificati genotipi in grado di produrre prevalentemente silibina e altri che producono invece maggiormente silidianina (Adzet *et al.* 1987). Questi risultati indicano che nella specie è presente un'ampia variabilità genetica per quello che riguarda contenuto e composizione della silimarina presente nel seme (Adzet *et al.* 1987; Martin *et al.* 2006).

1.6 La biomassa

Il cardo mariano è una pianta che in natura può raggiungere facilmente gli 1,5-2 m di altezza ed è caratterizzato da rapido accrescimento della biomassa. Plantule di cardo mariano hanno mostrato un elevato tasso di accrescimento relativo se paragonate ad altre specie di cardo (Pook 2003). In condizioni di elevata fertilità azotata una singola pianta può superare i 900 g di biomassa secca (21,3% seme, 19,6% foglie, 40,6% stelo, 18,5% capolini e pappi). La vigoria vegetativa della pianta ha portato a valutarne la produttività come specie per la produzione di biomassa a scopi energetici (Sulas *et al.* 2009). In condizioni non irrigue (precipitazioni 420 mm durante ciclo colturale) e caratterizzate da bassi input azotati (35 U ha^{-1}), cardo mariano ha consentito una produzione di biomassa di circa 20 t ha^{-1} (peso secco). Il potere calorifico superiore medio (capolini, stelo, foglie) della biomassa è risultato di $14,8 \text{ MJ Kg}^{-1}$ (Sulas *et al.* 2009). Durante la stessa sperimentazione è stato documentato un rapporto output/input del 37,4%, il che dimostra una buona efficienza di utilizzo dell'energia da parte della coltura.

È interessante poi notare che la silimarina risulta presente anche nelle radici e nei capolini della pianta, anche se in quantità minore rispetto al seme (Martin *et al.* 2006).

1.7 *Silybum marianum* e il concetto di bioraffineria

Il concetto di bioraffineria implica l'utilizzo dei diversi composti organici derivanti dalle varie frazioni della biomassa vegetale come sostituti delle materie prime di origine fossile (Kamm e Kamm, 2004). A causa del costante aumento della richiesta di petrolio e della limitata disponibilità futura di questa risorsa, tale tipologia di approccio alle colture agrarie da destinare ad utilizzi industriali diventa sempre più attuale. L'utilizzo di materie prime di origine vegetale in sostituzione di quelle fossili consente inoltre di ridurre l'impatto ambientale negativo risultante dall'immissione in atmosfera di anidride carbonica da fonti non rinnovabili. Questa tipologia di approccio implica l'utilizzo della pianta intera, anche grazie allo sviluppo di nuovi processi chimici e industriali, permettendo un efficace utilizzo di tutte le frazioni vegetali per la produzione di energia (biocarburanti), molecole (per l'industria chimica, cosmetica, ecc.), materiali (fibre, materiali compositi) e ingredienti per prodotti alimentari (Octave e Thomas, 2009).

In questa ottica *S. marianum* si presenta come una coltura molto interessante. È una specie estremamente adattabile ad ambienti differenti e capace di produrre contemporaneamente una biomassa abbondante e granella. La biomassa può essere bruciata per la produzione di energia (Sulas *et al.* 2008). Dalla granella prodotta possono essere estratti facilmente olio, silimarina e proteina. L'olio potrebbe costituire una materia prima importante per la produzione di biocarburante o essere destinato ad altri usi industriali. La silimarina potrebbe essere sfruttata come molecola ad alto valore aggiunto per il confezionamento di prodotti farmaceutici, antiossidanti ad uso alimentare (Koksal *et al.* 2009) o cosmetici (Singh e Agarwal, 2009).

1.8 La collezione di genotipi

Attualmente presso il Centro di ricerca per le colture industriali di Bologna (CRA-CIN) è presente una collezione di 26 diversi genotipi di cardo mariano. Il materiale è stato reperito presso orti botanici e banche del germoplasma nazionali ed internazionali e mediante campionamento diretto in campagna (Tabella 1).

Al fine di mantenere un'elevata vitalità del seme, le diverse accessioni vengono periodicamente moltiplicate in condizioni di pieno campo. I semi vengono messi in semenzaio nel mese di settembre. In alternativa si può effettuare la semina, sempre in semenzaio, in serra durante il mese di febbraio. Soprattutto nel caso della semina in serra, avendo scelto alveoli di piccole dimensioni, è consigliabile utilizzare contenitori realizzati in torba pressata per garantire un buon arieggiamento delle radici. Il trapianto in pieno campo viene effettuato allo stadio di n° 2-3 foglie vere. Dopo il trapianto le piante vengono poi concimate con l'equivalente di 30 U di azoto.

Alla fioritura, nonostante la pianta sia prevalentemente autogama, è fondamentale provvedere ad isolare i singoli capolini onde evitare possibili incroci tra le differenti accessioni presenti in campo. A tal fine si possono applicare dei cappucci di tessuto non tessuto subito prima dell'inizio della fioritura di ciascun capolino (Figura 3). In questo modo, oltre ad evitare possibili incroci, si riescono a minimizzare le perdite di granella una volta che è stata raggiunta la maturità fisiologica del seme. Il seme raccolto viene pulito e, se necessario, portato ad un contenuto idrico del 7-8% circa mediante l'utilizzo di gel di silice o per mezzo di trattamento in stufa ventilata a 35°C. Una volta essiccato il seme viene etichettato e conservato in condizioni di umidità controllata.

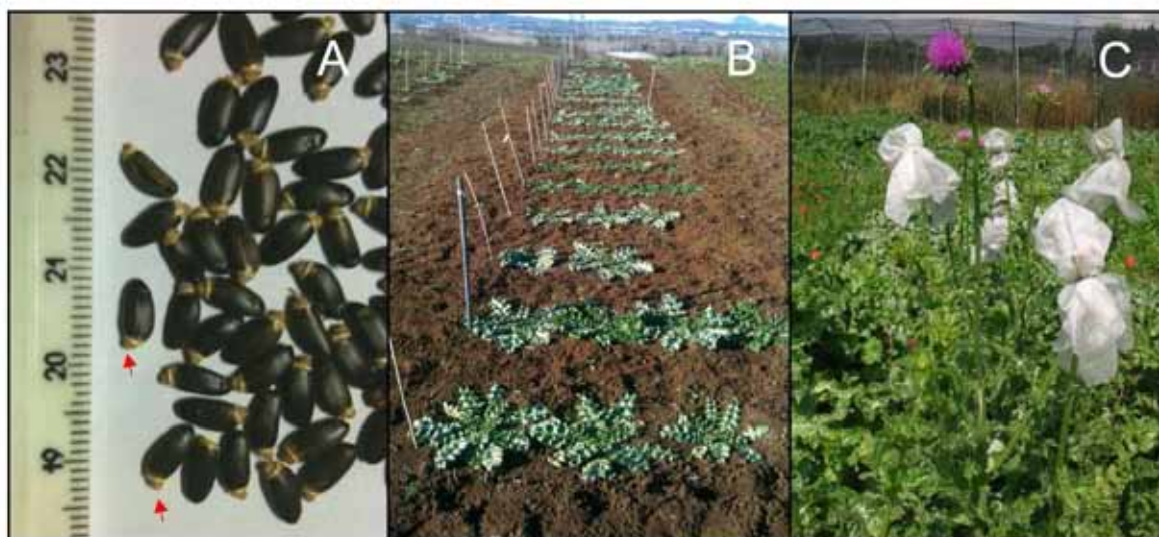


Figura 3 Conservazione della collezione di *Silybum marianum* (L.) Gaertn. A, semi di cardo mariano, le frecce indicano l'elaiosoma; B, genotipi durante la fase di moltiplicazione del seme in condizioni di pieno campo; C, fiori isolati mediante cappucci di tessuto non tessuto al fine di evitare il possibile incrocio tra le diverse accessioni presenti in campo.

Tabella 1 Elenco delle accessioni attualmente conservate presso il CRA-CIN di Bologna.

ACCESSIONE N°	LOC. PRELIEVO	ISTITUZIONE DI ORIGINE / ORIGINE
BVAL901047	AUSTRIA	AGES - Austrian Agency of Health and Food Safety (Linz, Aust.)
RCAT074006	BELGIO	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT069989	CANADA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
SIL4	COREA	IPK - Inst. of Plant Gen. and Crop Plant Res. (Gatersleben, Ger.)
RCAT040360	GERMANIA EST	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT057475	GERMANIA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT077005	GERMANIA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT74067	GERMANIA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT071128	INGHILTERRA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
ALBERESE	ITALIA	Prelievo diretto in campagna
OR. BOT. NAPOLI	ITALIA	Orto botanico di Napoli
OR. BOT. SIENA	ITALIA	Orto botanico di Siena
PELAGO	ITALIA	Prelievo diretto in campagna
TORMANCINA	ITALIA	Prelievo diretto in campagna

RCAT040356	POLONIA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT040357	POLONIA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT057474	REP. CECA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT071195	REP. CECA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
BVAL901578	ROMANIA	AGES - Austrian Agency of Health and Food Safety (Linz, Aust.)
SIL 9	SCON.	IPK - Inst. of Plant Gen. and Crop Plant Res. (Gatersleben, Ger.)
SIL1	SCON.	IPK - Inst. of Plant Gen. and Crop Plant Res. (Gatersleben, Ger.)
SIL10	SCON.	IPK - Inst. of Plant Gen. and Crop Plant Res. (Gatersleben, Ger.)
SIL2	SCON.	IPK - Inst. of Plant Gen. and Crop Plant Res. (Gatersleben, Ger.)
SIL8	SCON.	IPK - Inst. of Plant Gen. and Crop Plant Res. (Gatersleben, Ger.)
RCAT074546	SPAGNA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)
RCAT040358	UNGHERIA	Research Centre for Agrobotany (Tapioszele, Ung.)

SCON., Sconosciuta.

I genotipi oggetto della presente collezione sono in studio per quello che riguarda i diversi aspetti produttivi e qualitativi della coltura al fine di valutarne le capacità produttive e di stimare la variabilità genetica disponibile all'interno della specie. Questa attività consentirà di improntare futuri programmi di miglioramento genetico per lo sviluppo di una coltura industriale alternativa all'interno del paradigma della bioraffineria.

1.9 Bibliografia

- Abdel-Moniem A.S.H., 2002. The seed-head weevil, *Larinus latus* Herbst (Coleoptera: Curculionidae) as a new record in Egypt on the milk thistle, *Silybum marianum* (L.) (Asteraceae: Compositae). Archives of Phytopathology and Plant Protection 35: 157-160.
- Adzet T., Coll M.R., Iglesias J., Pugmacia M. 1987. Selection and improvement of *Silybum marianum*. 1. Characterization of populations from different origins. Plant Physiology and Biochemistry 25: 129-135.
- Andrzejewska J., Sadowska K., Mielcarek S. 2011. Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. Industrial Crops and Products 33: 462-468.
- Asghari-Zakaria R., Panahi A.R., Sadeghizadeh M. 2008. Comparative study of chromosome morphology in *Silybum marianum*. Cytologia 73: 327-332.
- Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 8: 101-105.
- Barclay A.S., Earle F.R. 1974. Chemical analyses of seeds III, oil and protein content of 1253 species. Economic Botany 28: 178-236.
- Berner D.K., Paxson L.K., Bruckart W.L., Luster D.G., McMahon M., Michael J.L. 2002. First report of *Silybum marianum* as a host of *Puccinia punctiformis*. Plant Disease 86: 1271.
- Bode A.M., Dong Z. 2009. Signal transduction molecules as targets for cancer prevention. Science Signaling 2: mr2.
- Curioni A., Garca M., Alfonso W., Arizio O. 2002. Milk thistle harvest prediction through the external characteristics of the heads. Acta Horticulturae 569: 257-261.
- Danin A., Yom-Tov Y. 1990. Ant nests as primary habitats of *Silybum marianum* (Compositae). Plant Systematics and Evolution 169: 209-217.
- Desplaces A., Choppin J., Vogel G. 1975. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. Arzneimittelforschung 25: 89-96.
- Dodd J. 1989. Phenology and seed production of variegated thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., in Australia in relation to mechanical and biological control. Weed Research 29: 255-263.
- Dvorak Z., Kosina P., Walterova D., Simanek V., Backhleda P., Ulrichova J. 2003. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. Toxicology Letters 137: 201-212.
- El-Mallah M.H., El-Shami S.M., Hassanein M.M. 2003. Detailed studies on some lipids of *Silybum marianum* (L.) seed oil. Grasas y Aceites 54: 397-402.
- Fraschini F., Demartini G., Esposti D. 2002. Pharmacology of silymarin. Clinical Drug Investigation 22: 51-65.

- Gabay R., Plitmann U., Danin A. 1994. Factors affecting the dominance of *Silybum marianum* L. (Asteraceae) in its specific habitats. *Flora* 189: 201-206.
- Garaev E.A., Movsumov I.S., Gazizov F.Yu. 2010. Neutral lipids from *Silybum marianum* seeds. *Chemistry of Natural Compounds* 46: 629-630.
- Ghavami N., Ramin A.A. 2007. Salinity and temperature effects on seed germination of milk thistle. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38: 2681-2691.
- Groves R.H., Kaye P.E. 1989. Germination and phenology of seven introduced thistle species in southern Australia. *Australian Journal of Botany* 37: 352-359.
- Hetz E., Liersch R., Schieder O. 1995. Genetic investigations on *Silybum marianum* and *S. eburneum* with respect to leaf colour, outcrossing ratio, and flavonolignan composition. *Planta Medica* 61: 54-57.
- Holm L.G., Pancho J.V., Herberger J.P., Plucknett D.L. 1979. A geographical atlas of world weeds. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Kamm B., Kamm M. 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 137-145.
- Karkanis A., Bilalis D., Efthimiadou A. 2011. Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medical weed. *Industrial Crops and Products* 34: 825-830.
- Khan M.A., Blackshaw R.E., Marwat K.B. 2009. Biology of milk thistle (*Silybum marianum*) and the management options for growers in north-western Pakistan. *Weed Biology and Management* 9: 99-105.
- Khan M.A., Marwat K.B. 2006. Impact of crop and weed densities on competition between wheat and *Silybum marianum* Gaertn. *Pakistan Journal of Botany* 38: 1205-1215.
- Khan R., Khan M.A., Waheedullah, Waqas M., Khan A.M., Hussain Z., Khan A., Raza M.A. 2011. Allelopathic potential of *Silybum marianum* L. against the seed germination of edible legumes. *Pakistan Journal of Weed Science and Research* 17: 293-302.
- Knott S.G. 1971. Nitrite poisoning in livestock. *Queensland Agricultural Journal* 97: 485-489.
- Koksal E., Gulcin I., Beyza S., Sarikaya O., Bursal E., 2009. *In vitro* antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 24: 395-405.
- Kyriakidis N.B., Katsiloulis T. 2000. Calculation of iodine value from measurements of fatty acid methyl esters of some oils: comparison with the relevant american oil chemists society method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 1235-1238.
- Lee J.I., Narayan M., Barrett J.S. 2007. Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 845: 95-103.
- Malekzadeh M., Mirmazloum S.I., Rabbi Anguorani H., Mortazavi S.N., Panahi M. 2011. The physicochemical properties and oil constituents of milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn. cv. Budakalászi) under drought stress. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 1485-1488.
- Martin R.J., Lauren D.R., Smith W.A., Jensen D.J., Deo B., Douglas J.A. 2006. Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle (*Silybum marianum*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34: 239-245.
- Michael P.W. 1968. Perennial and annual pasture species in the control of *Silybum marianum*.
- Montemurro P., Fracchiolla M., Lonigro A. 2007. Effects of some environmental factors on seed germination spreading potentials of *Silybum marianum* Gaertner. *Italian Journal of Agronomy* 3: 315-320.
- Nyireddy S., Szucs Z., Antus S., Samu Z. 2008. New components from *Silybum marianum* L. fruits: a theory comes true. *Chromatographia Supplement* 68: S5-S11.
- Octave S., Thomas D. 2009. Biorefinery: toward an industrial metabolism. *Biochimie* 91: 659-664.
- Pignatti S. 1982. *Flora d'Italia*. Vol. 3, p. 163, Edagricole, Bologna.
- Pook E.W. 1983. The effect of shade on the growth of variegated thistle (*Silybum marianum* L.) and cotton thistle (*Onopordum* sp.). *Weed Research* 23: 11-17.
- Potkanski A., Kowalczyk J., Nowak W., Czuderna M., Michalak S. 2001. Effect of milk thistle (*Silybum marianum* L.) endosperm in the diet for cows on milk yield and fatty acid profiles. *Journal of Animal and Feed Sciences* 10: 83-89.
- Ramasamy K., Agarwal R. 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer*

Letters 269: 352–362.

- Rasic S., Stefanic E., Stefanic I. 2009. Plant for bees: *Silybum marianum*. Journal of Apicultural Research 48: 298-299.
- Rottoli M. 2000. Zafferano selvatico (*Carthamus lanatus*) e cardo della Madona (*Silybum marianum*), piante raccolte o coltivate nel Neolitico a "La Marmotta"? . Bullettino di Paleontologia Italiana 91-92: 47-61.
- Sindel B.M. 1991. A review of the ecology and control of thistles in Australia. Weed Research 31: 189–201.
- Singh R.P., Agarwal R. 2009. Cosmeceuticals and silibinin. 2009. Clinics in Dermatology 27: 479-484.
- Souissi T., Berner D.K. Smallwood E.L. 2005. First report of smut caused by *Microbotryum silybum* on inovy thistle. Plant Disease 89: 1242.
- Starvaggi Cucuzza L., Motta M., Miretti S., Macchi E., Martignani E., Accornero P., Baratta M. 2010. Positive effect of silymarin on cell growth and differentiation in bovine and murine mammary cells. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 94: 111-117.
- Sulas L., Ventura A., Murgia L. 2008. Phytomass production from *Silybum marianum* for bioenergy. Options Méditerranéennes 79: 487-490.
- Tedesco D., Tava A., Galletti S., Tameni M., Varisco G., Costa A., Steidler S. 2004. Effects of Silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science, 87: 2239-2247.
- Tutin T. et al. (eds). 1976. Flora Europaea. Vol. 4, p. 249, Cambridge University Press, Cambridge.
- Young J.A., Evans R.A., Hawkes R.B. 1978. Milk thistle (*Silybum marianum*) seed germination. Weed Science 26: 395–398.

LA COLLEZIONE DI MICROORGANISMI D'INTERESSE AGRO ENERGETICO*

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Rosa Marchetti, Dr. Giacinto Della Casa e Dr. Riccardo Aleandri; col contributo del Dr. Ciro Vasmara

CRA - SUI Unità di ricerca per la suinicoltura

Via Beccastecca, 345 – 41018 San Cesario sul Panaro (MO)

Riassunto

Nell'ambito del progetto SoS-ZOOT "Modelli di sostenibilità degli allevamenti zootecnici", finanziato dal MiPAAF, è stata avviata una ricerca sulla produzione microbica d'idrogeno e metano da effluenti d'allevamento. Quest'attività ha costituito la premessa per l'allestimento di un laboratorio di microbiologia anaerobica. Il laboratorio, col contributo di finanziamenti dedicati, potrà essere finalizzato alla collezione di microorganismi anaerobici d'interesse agro-energetico. In questo articolo si passano in rassegna i componenti a metabolismo anaerobico delle popolazioni microbiche dei reattori per la produzione di biogas, con particolare riferimento agli Archaea produttori di metano e ai microorganismi produttori d'idrogeno mediante fermentazione al buio. Vengono considerati anche i microorganismi ammonio-ossidanti, benché non siano produttori di gas d'interesse energetico, per il loro potenziale interesse applicativo nell'abbattimento dei livelli di azoto ammoniacale nei digestori anaerobici. Viene descritta in breve la dotazione strumentale necessaria a un laboratorio di microbiologia anaerobica, i primi risultati dell'attività di selezione al laboratorio CRA-SUI e le prospettive di sviluppo e applicazione.

Summary

Within the framework of the SOS-ZOOT project (Sustainability models for animal husbandry) financially supported by MiPAAF, a research on microbial production of methane and hydrogen from animal waste was undertaken. This activity has allowed us to setup a laboratory of anaerobic microbiology. The laboratory, receiving devoted financial support, will be finalized to the collection of anaerobic microorganisms of agro-energetic interest. In this paper we review the anaerobic components of the microbial populations of anaerobic digesters, with particular emphasis on methanogenic Archaea and on hydrogen-producing bacteria via dark fermentation. The ammonium-oxidizing microorganisms are also mentioned - even though they are not biogas-producers - due to their exploitation potential in removing ammonium N from anaerobic digesters. The indispensable instrumental equipment needed to carry out this kind of research is also described, as well as the preliminary results of the microbial selection activity at CRA-SUI and the development perspectives.

Parole chiave

Metano, idrogeno, Archaea, anammox, batteri idrolitici

Keywords

Methane, hydrogen, Archaea, anammox, hydrolytic bacteria

1 Microorganismi anaerobici d'interesse agro-energetico

1.1 Produttori di metano e d'idrogeno

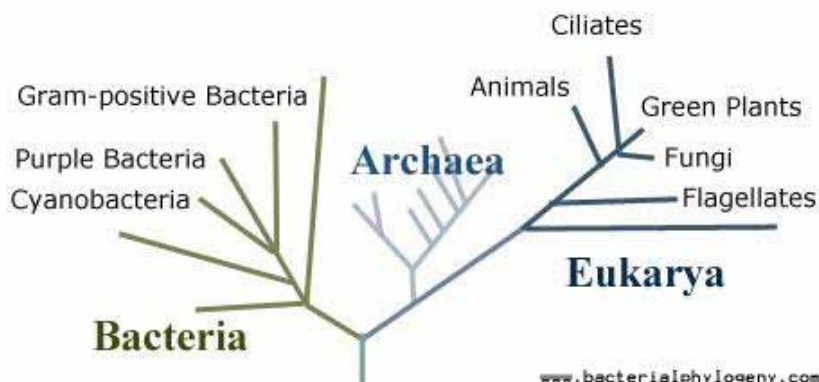
Negli ultimi anni abbiamo assistito a un enorme aumento d'interesse nei confronti delle tecnologie per la produzione di energia da fonti rinnovabili, come possibilità di contenere l'emissione di gas serra e quindi i cambi climatici associati all'uso di combustibili fossili. Queste tecnologie sono basate essenzialmente su processi termochimici o biologici. Le tecnologie biologiche (biotecnologie) sfruttano l'abilità dei microorganismi di produrre molecole d'interesse energetico. La digestione anaerobica per la produzione di biogas è la tecnologia più diffusa. Fino ad oggi il principale componente d'interesse energetico nel biogas è stato il metano. Tuttavia, recentemente, è aumentata l'attenzione verso la possibilità di sfruttare lo

* doi:10.4458/0986-27

stesso substrato destinato alla produzione di metano anche per la produzione d'idrogeno. Da tutto ciò deriva che l'interesse nei confronti dei microrganismi produttori di energia da biomasse sta vivendo una fase di crescita esplosiva.

Il metano è prodotto da microrganismi (metanigeni) appartenenti al dominio degli Archaea. Questo dominio è stato individuato alla fine degli anni '70, grazie agli studi basati su tecniche molecolari del ricercatore americano Carl Woese (Woese et al., 1990). Anche se i microrganismi appartenenti al dominio degli Archaea condividono, con i Batteri, la mancanza di nucleo e di organelli intracellulari, il dominio degli Archaea occupa tuttavia, nel cosiddetto "albero della vita" (Fig. 1), una posizione filogeneticamente più evoluta e più vicina a quella degli Eucarioti (dominio in cui rientrano anche gli animali e le piante).

Figura 1 Collocazione degli Archaea nell'albero della vita (dal sito: Bacterial (Prokaryotic) Phylogeny Webpage (April 2007). <http://www.bacterialphylogeny.com/index.html>)



Il dominio degli Archaea include microrganismi capaci di vivere in ambienti estremi (ad esempio ad alte temperature, incompatibili con la sopravvivenza della maggior parte degli esseri viventi, oppure ad elevate concentrazioni saline) e, per l'appunto, i microrganismi metanigeni, i quali hanno bisogno per sopravvivere e per crescere di condizioni di anaerobiosi strettissima. Le modalità principali di produzione di metano sono le seguenti:

- I) Da idrogeno e anidride carbonica: $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 > \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
- II) Da acetato: $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} > \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$
- III) Da composti metilici:
 - a. $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 > \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$
 - b. $4\text{CH}_3\text{OH} > 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

La prima trasformazione è a carico dei *metanigeni idrogenotrofi* (quasi tutte le specie di Archaea appartenenti al gruppo dei metanigeni sono in grado di attuarla), mentre la seconda, con acetato come substrato, viene condotta dai *metanigeni acetoclastici* (solo 2 generi: *Methanosarcina* e *Methanosaeta*). Alcune specie di metanigeni possono utilizzare formiato, etanolo, ossido di C come substrati per la produzione di metano.

L'idrogeno può essere ottenuto per via biologica da alghe (fotosintesi) o mediante fermentazione al buio. La fermentazione al buio appare più promettente essenzialmente in quanto gli impianti richiedono meno spazio, rispetto a quelli per la produzione d'idrogeno mediante trasformazione diretta dell'energia solare.

I microrganismi produttori di idrogeno per fermentazione al buio sono batteri appartenenti a generi e a specie diverse, con diverso grado di reattività alla presenza di ossigeno nell'ambiente di crescita. I generi con un numero più elevato di specie capaci di effettuare la trasformazione sono *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*. Altre specie, spesso termofile, sono attualmente oggetto di studio (Wang e Wan, 2009). Glucosio, saccarosio e amido sono i substrati più studiati e utilizzati per la produzione d'idrogeno. Tuttavia recentemente l'attenzione è stata diretta all'uso di substrati organici complessi, inclusi i liquami (Zhu et al., 2009). I sottoprodotti di fermentazione più abbondanti sono etanolo, acetato, propionato e butirato. Su tipo e presenza percentuale dei sottoprodotti influisce anche la natura del substrato.

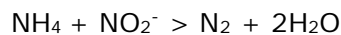
1.2 Le popolazioni dei reattori anaerobici

Metanigeni e produttori d'idrogeno sono solo due componenti, ancorché fondamentali, della popolazione dei digestori per la produzione di biogas. Il biogas deriva dalla degradazione della sostanza organica in condizioni anaerobiche. Durante la digestione anaerobica la sostanza organica è convertita a metano via acido acetico, acidi grassi a corta catena, H₂ e CO₂. Sono stati riconosciuti come responsabili della degradazione almeno 4 gruppi microbici, che lavorano in stretto sinergismo, e in cui prevalgono microorganismi idrolitici, fermentativi acidogeni, acetogeni e metanigeni. I microorganismi idrolitici frammentano molecole organiche complesse (proteine, cellulosa, lipidi) in monomeri solubili (amminoacidi, glucosio, acidi grassi). Questa fase è relativamente lenta. I batteri acidogeni convertono zuccheri, amminoacidi e acidi grassi ad acidi organici a corta catena (ad es., acido acetico, propionico, formico, lattico), alcoli e chetoni, acetato, CO₂ e H₂. L'acetato è il prodotto principale della fermentazione dei carboidrati. I batteri acetogeni convertono gli acidi grassi (ad es. propionico, butirrico) e gli alcoli in acetato, H₂ e CO₂, che sono usati dai metanigeni. Gli acetogeni richiedono basse tensioni di idrogeno per la conversione degli acidi grassi. Con pressione parziale di H₂ relativamente alta la formazione di acetato è ridotta. Gli omoacetogeni sintetizzano acetato partendo da CO₂ e H₂. I metanigeni hanno crescita lenta (da 2 gg a 35 °C fino a 50 gg a 10 °C). Circa il 70% del metano formato deriva dalla conversione dell'acetato (metanigeni acetoclastici), mentre l'altro 30% deriva dalla riduzione della CO₂ attraverso l'idrogeno (metanigeni idrogenotrofi). Microorganismi acidogeni e metanigeni lavorano in simbiosi, in quanto gli acidogeni rimuovono l'ossigeno che sarebbe letale per i metanigeni e forniscono loro molecole a basso peso molecolare, mentre i metanigeni abbassano la concentrazione di idrogeno e degli acidi che, in caso di accumulo eccessivo, avrebbero un effetto inibitorio sugli acidogeni stessi.

1.3 I microorganismi anaerobici ammonio-ossidanti

Questi microorganismi non producono molecole d'interesse energetico, ma attualmente sono oggetto di grande interesse per la loro capacità di trasformare l'ammonio in N molecolare, in condizioni anaerobiche. Nei reattori di digestione anaerobica la presenza di quantità elevate di ammonio, che si verifica in particolare quando vengono usati effluenti di allevamento come substrato di digestione, costituisce un problema, essenzialmente per due ragioni: i) in specifiche condizioni ambientali l'N ammoniacale può diventare ammoniacale, che è tossica per i microorganismi del digestore; ii) elevate concentrazioni di ammonio complicano la gestione del digestato (intendendosi con questo termine quel che rimane dalla produzione di biogas). Essa infatti prevede necessariamente una destinazione ad uso agronomico (fertilizzazione delle colture), la quale è vincolata - come quella degli effluenti d'allevamento non trasformati - al rispetto della normativa che recepisce la Direttiva Nitrati (91/676/CEE). La possibilità di abbattere i livelli d'ammonio nei digestori mediante ricorso a microorganismi anaerobici ammonio-ossidanti fornirebbe una soluzione al problema.

I microorganismi ammonio-ossidanti anaerobici ossidano l'ammonio in assenza di ossigeno, utilizzando nitrito come accettore di elettroni:



Anche batteri nitrificanti aerobici (ad es. *Nitrosomonas*) possono effettuare questa trasformazione, in condizioni anossiche particolari.

Il processo, postulato negli anni '60-'70 su basi teoriche e riconosciuto come fondamentale per il ciclo dell'azoto negli oceani, è stato confermato sperimentalmente per la prima volta nel 1995 a Delft, in Olanda, in un reattore di denitrificazione per il trattamento di acque reflue, e chiamato ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation; Mulder et al., 1995). A differenza della denitrificazione, l'anammox si verifica anche in assenza di sostanza organica (chemiolitoautotrofia); di fatto, la presenza di sostanza organica può rappresentare un fattore inibente. Il microorganismo inizialmente identificato come responsabile della reazione è membro dei *Planctomycetes* (Strous et al., 1999). Più recentemente, nell'ambito dei *Planctomycetes*, sono state identificate 5 ramificazioni principali (proposte come nuovi generi) di batteri anammox: *Brocadia*, *Kuenenia*, *Jettenia*, *Scalindua* e *Anammoxoglobus*, che si differenziano per il tipo di habitat preferito dalle specie che vi sono incluse. Ancor più di

recente anche alcuni Archaea, appartenenti al gruppo dei *Crenarchaeota*, sono stati riconosciuti come capaci di ossidazione dell'ammonio (Könneke et al., 2005) e ottenuti in coltura.

L'ottenimento di colture pure di organismi anammox è ritenuto molto difficile a causa dei lunghi tempi di generazione. Tuttavia, con tecniche particolari, è riportata la possibilità di ottenere arricchimenti purificati oltre il 99.5%. E' inoltre possibile identificare e caratterizzare le comunità anammox in ecosistemi naturali e antropizzati mediante tecniche molecolari (ad esempio, *fluorescence in situ hybridization* e *polymerase chain reaction*). Infine, le cellule dei microorganismi anammox contengono un organello membranoso, l'anammoxosoma, contenente lipidi peculiari, i ladderani, che possono essere usati come marcatori della presenza di microorganismi anammox in campioni ambientali.

1.4 Collezioni di riferimento nel mondo

Il vorticoso progresso delle conoscenze sulla produzione biologica di metano e d'idrogeno conferisce alla disponibilità di materiale genetico selezionato un enorme interesse industriale. Esistono già industrie che commercializzano enzimi (tratti da microorganismi) per l'agevolazione delle fasi preliminari di digestione anaerobica. Tuttavia gli enzimi non hanno capacità di adattamento alle specifiche condizioni ambientali, possibile invece qualora si usino consorzi microbici selezionati. Esistono anche brevetti per il controllo microbiologico della digestione anaerobica.

Delle categorie microbiche più rappresentate nei digestori quella dei metanigeni è particolarmente difficile da studiare e da mantenere, a causa delle particolari esigenze metaboliche (anaerobiosi stretta). Per questo la tendenza dei gruppi di ricerca interessati agli Archaea è, da un lato, quella di concentrarsi sull'uso di tecniche di studio "culture-independent", basate essenzialmente sulla caratterizzazione molecolare delle comunità microbiche; dall'altro, il ricorso a servizi di Collezione per l'ottenimento di isolati "controllati". Pertanto, sia dal punto di vista della ricerca di base, sia di quella applicata, è d'importanza fondamentale il poter disporre di isolati microbici in purezza, da poter moltiplicare e studiare a piacimento nella loro integrità cellulare, fisiologica e metabolica.

Le difficoltà di coltivazione e mantenimento degli Archaea spiegano perché pochi laboratori di microbiologia siano attrezzati per lavorare coi metanigeni. Solo un numero limitato di collezioni ospita ceppi di Archaea (Le più importanti nel mondo: ATCC (USA), DSMZ (Germania), OCM (USA), JCM (Giappone)). In Italia pochi gruppi di ricerca studiano i metanigeni d'interesse agro-ambientale (DISTAM-UNIMI, DISTA-UNIBO, DISTAAM-UNIMOL) e non risulta che, per ora, siano state istituite collezioni ufficiali di metanigeni.

1.5 Il laboratorio di microbiologia anaerobica

La manipolazione dei microorganismi in un laboratorio di microbiologia avviene essenzialmente mediante due approcci: quello tradizionale che prevede la loro coltivazione su idonei mezzi di crescita, previo isolamento dagli ambienti naturali e arricchimento mediante uso di substrati selettivi ed il metodo cosiddetto "culture-independent", che prescinde dalla coltivazione e mira alla caratterizzazione dei componenti delle popolazioni microbiche mediante specifiche tecniche molecolari e, più recentemente, mediante combinazione di più tecniche molecolari ("omics platforms"; Zhang et al., 2010).

1.5.1 Approccio tradizionale

La prima preoccupazione nella gestione di microorganismi anaerobici è la rimozione dell'ossigeno, a livello delle più piccole tracce. Per questa ragione è necessario che il laboratorio sia attrezzato con sistemi di distribuzione e dispensazione dei gas atti a modificare lo spazio di testa delle colture con gas inerti (in genere, miscele di N_2+CO_2 o CO_2+H_2), nonché di sistemi di rimozione di tracce di O_2 dai gas utilizzati per modificare lo spazio di testa. La coltivazione su mezzo liquido si basa a tutt'oggi sulle tecniche proposte da Hungate negli anni '50 (Hungate, 1950). Quella su mezzo solido richiede la disponibilità di camere anaerobiche (Foto 1). La composizione dei gas è determinata mediante gascromatografo con detector a conducibilità termica. Poiché i metanigeni sono autofluorescenti, in quanto specificamente dotati del coenzima F_{420} , che nella forma ossidata assorbe a 420 nm con fluorescenza blu-

verde, la disponibilità di un microscopio a epifluorescenza consente di emettere diagnosi su identità e densità delle cellule ispezionate.



Foto 1 Una camera anaerobica per la coltivazione dei microorganismi in assenza di ossigeno.

1.5.2 Approccio molecolare

Numerosi strumenti genetici sono stati sviluppati per l'uso con diversi microorganismi metanogenici.

Si elencano i metodi di trasformazione efficiente, i marcatori selezionabili e controsclezionabili, i plasmidi navetta autoreplicanti, i trasposoni, la rimozione mirata di geni, il sequenziamento dei genomi. Tuttavia l'analisi genetica dei metanigeni è di sviluppo relativamente recente, ed è praticata solo da un numero ridotto di laboratori, il che offre ampie opportunità di ampliamento della ricerca nel settore. Inoltre i metanigeni si prestano come modelli genetici per lo studio dell'intero dominio degli Archaea. I membri del genere *Methanosarcina*, per le loro caratteristiche metaboliche, sono considerati come particolarmente adatti allo scopo. In effetti il genoma di *Methanosarcina acetivorans* (Fig. 2), assunto come organismo modello, è stato completamente sequenziato (Galagan et al., 2002). I genomi di altri metanogeni (*Methanocella paludicola*, *Methanobrevibacter ruminantium*) sono stati caratterizzati più recentemente.



Figura 2 *Methanosarcina acetivorans* in una foto al microscopio elettronico (J. G. Ferry, <http://science.psu.edu/news-and-events/2002-news/Ferry8-2002.htm>)

1.6 Primi isolamenti presso il lab CRA-SUI

Il CRA-SUI, che istituzionalmente porta avanti attività di ricerca riguardante tutti gli aspetti dell'allevamento suino, ha recentemente avviato un'attività di adeguamento della struttura a lavorare nel settore della valorizzazione degli effluenti di allevamento a fini energetici. Tale adeguamento ha incluso, anche grazie ad acquisti di attrezzature resi possibili nell'ambito del progetto SOS-ZOOT, a finanziamento MiPAAF, l'allestimento di un laboratorio di microbiologia anaerobica. Ulteriori contributi finanziari nell'ambito del progetto MiPAAF BIODATI-Collezioni consentiranno di mantenere e caratterizzare gli isolati che si rendano via via disponibili nel corso e dopo conclusione delle attività SOS-ZOOT. In Tab. 1 è riportato un riepilogo degli isolati ottenuti nel primo anno di attività del progetto. Tutti gli isolati provengono da serbatoi di stoccaggio di effluenti da allevamento suino. Per ragioni connesse con l'attività di ricerca SOS-

ZOOT, la selezione ha per ora privilegiato l'isolamento di microorganismi capaci di utilizzare substrati particolari (scotta, glicerolo, cellulosa) e consorzi di metanigeni acetoclastici.

Tabella 1 Tipo e numerosità degli isolati anaerobici da effluenti d'allevamento

Popolazione	Numero di isolati	Numero di ceppi puri
Cellulosolitici	9	3
Acidogenici	27	10
Acetogenici	10	2
Metanigeni acetoclastici	13	-

1.7 Prospettive

La disponibilità di materiale genetico noto presenta interesse in studi di base (ad esempio, strategie globali di fisiologia ed evoluzione cellulare) e per applicazioni biotecnologiche. I metanigeni, oltre al noto contributo alla produzione di biogas, hanno molte altre applicazioni come fonti di nuovi prodotti farmaceutici e antimicrobici, per la produzione di beta-amminoacidi e vitamine, per la sintesi di enzimi termostabili, e come catalizzatori nella *bioremediation*. Anche i batteri produttori di enzimi litici extracellulari sono oggetto di grande attenzione, nel controllo biologico dell'inquinamento ambientale, in medicina, nell'industria alimentare. Infine, per le ragioni già esposte nel paragrafo 1.3, grande importanza potrebbe avere l'ottenimento di arricchimenti microbici capaci di convertire l'ammonio in N molecolare. Obiettivo a medio termine dell'attività di collezione vorrebbe pertanto essere l'attivazione di un servizio di distribuzione di isolati, possibilmente riconosciuto ufficialmente, avente come fruitori enti pubblici di ricerca (interessati sia ad attingere alla collezione, sia a richiedere la conservazione di materiale isolato da loro), gestori d'impianti di digestione anaerobica, ma anche industria alimentare, industria delle fermentazioni.

1.8 Ringraziamenti

L'attività di collezione è stata avviata nell'ambito del progetto MiPAAF SOS-ZOOT (Scheda MAREA: Produzione di idrogeno e metano da effluenti di allevamento) e ha ricevuto supporto finanziario dal MiPAAF (progetto BIODATI, scheda COLMAR "Collezione di microorganismi d'interesse agro-energetico")

1.9 Bibliografia

- Galagan J.E., Nusbaum C., Roy A., Endrizzi M.G., Macdonald P., et al., 2002. "The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity." *Genome Res* 12:532-42.
- Hungate R.E., 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1-49.
- Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.
- Mulder A., van de Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G., 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16:177-184.
- Strous M., Fuerst J. A., Kramer E. H., Logemann S., Muyzer G., van de Pas-Schoonen K. T., Webb R., Kuenen J. G., and Jetten M. S., 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400:446-449.
- Wang J., Wan W., 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 34: 799-811.
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis, M. L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *ML. Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12):4576-9.
- Zhang W., Li F., Nie L., 2010. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology*, 156, 287-301.
- Zhu J., Li Y., Wu X., Miller C., Chen P., Ruan R., 2009. Swine manure fermentation for hydrogen production *Biores. Technol.* 100:5472-5477.

COLLEZIONE DI ECOTIPI DI CANNA COMUNE (*ARUNDO DONAX L.*)*

Responsabili Scientifici: Dr. Mario Di Candilo, Dr. Enrico Ceotto

CRA–CIN Centro di ricerca per le colture industriali
Via di Corticella, 133 – 40128 Bologna

Riassunto

La canna comune (*Arundo donax L.*) è considerata una delle migliori specie per la produzione di biomassa lignocellulosica ad uso energetico nei paesi del Sud Europa. In particolare, può essere destinata alla conversione termo-elettrica, per combustione, e/o alla produzione di bioetanolo di seconda generazione, attraverso idrolisi della cellulosa in zuccheri semplici e fermentazione di questi ultimi. Inoltre, la fibra estratta dai culmi può essere impiegata per la produzione della carta. Il lavoro evidenzia le numerose caratteristiche positive della specie, quali: elevata capacità di adattamento a tutti i tipi di suolo, compresi quelli marginali e salini; ciclo perennante; elevata rusticità; resistenza agli stress idrici anche severi; ridotte esigenze di concimazione, grazie alla traslocazione dei nutrienti, in autunno, dalle foglie ai rizomi, per utilizzarli successivamente in primavera alla ripresa vegetativa; elevata efficienza fotosintetica e notevoli capacità produttive; capacità di costituire validi *carbon sinks* nel terreno; bilancio energetico molto positivo. Inoltre, viene commentata la principale criticità della canna comune, rappresentata dalla sterilità fiorale: caratteristica che limita la propagazione della specie in quanto può riprodursi solo per via agamica, ma che nel contempo costituisce un vantaggio in termini di resa in biomassa, poiché la pianta può destinare tutti gli assimilati alla produzione di fusti e foglie e non in parte alla formazione ed al riempimento dei semi. In ragione dei requisiti di questa specie e del crescente interesse per la sua coltivazione è stata realizzata una collezione di ecotipi prelevati da piccoli canneti spontanei in 12 regioni italiane e a Lanzarote in Spagna, al fine di valutare la variabilità entro specie. Nel lavoro viene, altresì, descritta la morfologia della pianta ed illustrati i primi risultati relativi alla caratterizzazione biometrica e produttiva degli ecotipi collezionati.

Summary

Giant reed (*Arundo donax L.*) is considered one of the best suited species for producing lignocellulosic biomass, to be used for energy purpose, in the countries of South Europe. In particular, it can be used for generating electricity and heat, via combustion, and/or to obtain second generation ethanol, via hydrolysis of cellulose into sugars and subsequent fermentation of these compounds. Moreover, the fiber of giant reed can be used for producing paper. In this contribute we highlight the favorable traits of the species, notably: adaptability to all types of soils, including marginal and salt-affected soils; perennial behavior, rusticity, tolerance to severe drought stress; low fertilization requirement due to nutrient translocation, during Autumn from leaves to rhizomes, and the reverse in the subsequent spring; high photosynthetic capacity and high productivity; ability to increase soil carbon sinks and convenient energy balance. Moreover, it is discussed the main critical point of giant reed, represented by floral sterility: this trait limits the propagation potential of the crop, that is obligated vegetative, but still represent an advantage in terms of productivity, because the plant can use all the assimilates for producing leaves and stems rather than diverting it to flowers and seeds. On the basis of the interesting traits of the species, a collection of ecotypes was undertaken by collecting plant material in the wild among 12 Italian regions and Lanzarote in Spain. The scope was to assess the intra-specific variability on the same environment. In this contribution are also described the morphology of the plant and reported the first results regarding the biometric characteristics and the biomass yield of the several ecotypes.

Parole chiave

Canna comune, ecotipi, biomassa lignocellulosica, caratterizzazione produttiva

Keywords

Giant reed, ecotypes, lignocellulosic biomass, productivity characterization

* doi:10.4458/0986-37

1 Inquadramento botanico, origine e diffusione

La canna comune è una pianta erbacea perenne rizomatosa, appartenente alla famiglia delle *Poaceae* (*Graminaceae*), subfamiglia, *Arundinoideae*, tribù *Arundineae*, genere *Arundo*. Secondo alcune fonti (Polunin and Huxley, 1987) sarebbe originaria del Sud-Est asiatico, si sarebbe poi diffusa in tutti i paesi del Bacino Mediterraneo, in Nord e Sud America e in Australia (Perdue, 1958, Zohary, 1962). In Italia è diffusa allo stato spontaneo un po' ovunque, nel piano come nei terreni declivi, fino a quote di 800 m circa.

1.1 Caratteristiche della specie

La parte ipogea della pianta è composta da un ricco sistema di rizomi, dal quale dipartono le radici, mentre la parte epigea è composta da fusti (culmi).

Il rizoma, generalmente di rilevanti dimensioni, ha un aspetto nodoso e ramificato (Foto 1): presenta gemme primarie e secondarie dalle quali si sviluppano i culmi, e gemme di prolungamento che danno luogo a nuovi rizomi (Onofri, 1940). Le gemme primarie alla ripresa vegetativa danno origine a canne "maggenghe"; le gemme secondarie invece germogliano più tardi (giugno-luglio) originando le canne "agostane".

I culmi sono eretti, cilindrici, suddivisi in nodi e internodi cavi, di lunghezza e spessore decrescenti dal basso verso l'alto. In un solo ciclo vegetativo essi possono raggiungere altezze di 6-7 m ed un diametro basale di 10-40 mm (Foto 2).

Le foglie sono alterne, con guaina amplessicaule, lamina lineare-lanceolata di colore verde glauco (Foto 3). L'infiorescenza è una pannocchia piumosa, fusiforme, di colore variabile dal verde pallido al violaceo, ha una lunghezza di 30-60 cm e viene emessa all'apice del culmo in settembre-ottobre. È formata da spighe peduncolate, ciascuna delle quali porta generalmente tre fiori (Foto 4).

Il frutto (seme) è indeiscente, tipico delle graminacee (Foto 4). Tuttavia, in molte aree ove l'*Arundo* vegeta non produce semi fertili (Perdue, 1958; Boose and Holt, 1999; Dudley, 2000; Di Tomaso and Healey, 2003) a causa della sterilità florale provocata dalla mancata divisione delle cellule madri delle megaspore (Bhanwra *et al.*, 1982).



Foto 1 a,b,c. Caratteristiche del rizoma: grosso, nodoso e articolato (a), provvisto di un fitto sistema radicale (b) e di gemme principali ben differenziate (c).

La pianta ha ciclo C_3 , ma le sue capacità fotosintetiche e produttive sono superiori ad altre piante a ciclo C_4 (Beale and Long, 1995; Rossa *et al.*, 1998; Christou, 2001). Possiede sorprendenti capacità di adattamento a tutti i tipi di suolo, compresi quelli marginali e salini (Peck, 1998), riesce a vegetare per lunghi periodi in condizioni estreme di contenuto idrico del terreno, dalle più aride alle più umide (Ranney and Mann, 1994; Lewandoski *et al.*, 2003). Tollera valori di pH compresi fra 5 e 8.7 (Di Tomaso, 1998). La coltura ha ridotte esigenze di input colturali (Vecchiet and Jodice 1996; Cosentino *et al.*, 2005), grazie a peculiari caratteristiche della pianta, quali: i) ciclo perennante, che elimina i costi energetici annuali necessari per le lavorazioni del terreno e per la semina; ii) elevata efficienza d'uso dell'azoto; iii) traslocazione dei nutrienti, in autunno, dalle foglie ai rizomi (Bell, 1997) per utilizzarli successivamente in primavera alla ripresa vegetativa; iii) forte riduzione delle perdite per

lisciviazione dei nitrati, grazie alla copertura del terreno per un lungo periodo dell'anno (Tolbert *et al.*, 1998; Pimental e Krummel, 1987).



Foto 2 a,b,c,d,e. Caratteristiche dei culmi di *Arundo donax*: portamento eretto (a), altezza imponente (b), suddivisione in nodi e internodi (c) e sezioni trasversale (d) e longitudinale (e), quest'ultima evidenzia i setti in corrispondenza dei nodi e le cavità internodali.

L'*Arundo* si contraddistingue anche per rusticità: non presenta particolare suscettibilità a patogeni ed insetti, perciò non necessita di alcun trattamento chimico di difesa. I culmi e le foglie di questa specie contengono numerosi composti chimici, fra i quali vari alcaloidi e molto silicio (Jackson and Nunez, 1964; Perdue, 1958), elementi che indubbiamente la proteggono dai parassiti di ogni genere.



Foto 3 a,b,c. Particolari delle foglie di *Arundo donax*, le immagini evidenziano: l'inserimento alterno sul culmo (a), la guaina amplessicaule (b) e la lamina lineare-lanceolata (c).

Sotto il profilo produttivo, la canna comune in diverse prove svolte in territorio nazionale ha evidenziato notevoli potenzialità (Di Candilo *et al.*, 2005; Cosentino *et al.*, 2005; Angelini *et al.*, 2005). Inoltre, studi recenti hanno messo in risalto le capacità di *A. donax* nel risanamento o decontaminazione ambientale di siti inquinati da sostanze organiche e metalli pesanti (Kos *et al.*, 2003; Mirza *et al.*, 2010). La coltura di questa specie si contraddistingue anche per la sua capacità di accumulare rilevanti quantitativi di carbonio nel terreno (McLaughlin and Walsh 1998; Ceotto and Di Candilo, 2011).



Foto 4 a,b,c. L'infiorescenza dell'*Arundo donax* è una pannocchia piumosa, fusiforme, di colore variabile dal verde pallido al violaceo (a,b). I semi sono sterili, piccoli, molto leggeri e di colore scuro (c).

1.2 Propagazione della specie

La canna comune è una specie a propagazione agamica obbligata, tramite rizomi, talee di culmo o piantine micro propagate (Foto 5).

Alcuni autori hanno messo in evidenza che la sterilità fiorale è una caratteristica molto favorevole per le piante destinate a produrre biomassa ad uso energetico (Ragauskas *et al.*, 2006). Infatti, mentre le piante che producono granella dedicano molta energia, sotto forma di assimilati, alla formazione ed al riempimento dei loro organi riproduttivi, le piante da biomassa nelle quali la fioritura avviene molto tardivamente a fine stagione, ovvero eliminata del tutto, possono invece destinare tutti i loro assimilati alla produzione di foglie e culmi. Esempi di questa seconda strategia sono la canna comune ed il miscanto. Secondo Johnson *et al.* (2006) il vantaggio della sterilità fiorale è duplice: da un lato tutti i carboidrati e le proteine vengono impiegati per produrre nuove foglie e fusti; dall'altro lato l'assenza di semi evita che la pianta possa comportarsi come una infestante negli appezzamenti vicini. D'altro canto, la sterilità fiorale rappresenta la maggiore criticità dell'*Arundo*, in quanto limita fortemente la propagazione della specie, oltre a ridurre drasticamente la formazione di variabilità genetica (Mariani *et al.*, 2010).



Foto 5 a,b,c. Organi di propagazione dell'*Arundo*: rizoma (a), talee di culmo radicate (b) e piantine micro-propagate (c).

L'utilizzo dei rizomi, come metodo d'impianto del canneto, dà ottimi risultati dal punto di vista tecnico, ma risulta molto oneroso, inoltre richiede l'espianto distruttivo di un'ampia superficie di piante madri, non sempre disponibili. L'impiego delle piantine micro-propagate, anche se un po' meno oneroso dei rizomi, comporta un costo d'impianto ancora elevato (non meno di 4.500 euro ad ettaro solo per l'acquisto delle piante). D'altra parte, la tecnica basata sull'impiego di

talee di culmo è ancora in fase di studio e messa a punto, dato che spesso ha lasciato a desiderare per uniformità di emergenza.

1.3 Destinazioni d'uso

In ragione delle numerose positive caratteristiche sopra evidenziate la canna comune è considerata una delle migliori specie per la produzione di biomassa lignocellulosica ad uso energetico nei paesi del Sud Europa (Lunnan A., 1997; Foti e Cosentino, 2001; Shatalov e Pereira, 2002; Di Candilo *et al.*, 2008). Più in particolare, la biomassa può essere destinata alla conversione termo-elettrica, per combustione, e/o alla produzione di etanolo di seconda generazione, attraverso idrolisi della cellulosa in zuccheri semplici e fermentazione di questi ultimi (Hamelinck *et al.*, 2005). Inoltre, la fibra estratta dai culmi può essere impiegata per la produzione della carta (Shalatov and Pereira, 2006).

Storicamente la canna veniva utilizzata come tutore nella viticoltura, nell'attività vivaistica ed in quella orticola, inoltre veniva impiegata per la costruzione di coperture e canestri (Foto 6).

L'utilizzazione industriale di questa pianta è stata avviata per la prima volta in Italia tra il 1935 ed il 1964 dalla Snia-Viscosa che brevettò un procedimento per la produzione di rayon viscosa e carta a partire da pasta di cellulosa ricavata dai culmi (Facchini, 1941). Attualmente a Crescentino (Vercelli) è in costruzione, da parte della multinazionale Mossi & Ghisolfi, un impianto per la produzione industriale di 40.000 tonnellate annue di bioetanolo di seconda generazione, utilizzando la biomassa della canna comune. A tale scopo è già stato avviato l'allestimento delle coltivazioni di *Arundo* in un raggio di 40 chilometri dallo stabilimento industriale, per una superficie complessiva che in un biennio dovrebbe raggiungere 4.500 ha.



Foto 6 a,b,c. Destinazioni moderne e storiche dell'*Arundo donax*: rotoballe per produzione di energia termo-elettrica (a), tutori per piante orticole (b, foto Angelini), impiego per costruzione di cesti e canestri (c).

1.4 Raccolta e conservazione degli ecotipi.

In ragione dei numerosi requisiti della canna comune e del crescente interesse per la sua coltivazione a fini energetici, presso il CRA-CIN è stata realizzata una collezione di 23 ecotipi di questa specie, per valutarne la variabilità. Tali materiali sono stati prelevati da piccoli canneti spontanei in 12 regioni italiane, dal Piemonte alla Sicilia, e a Lanzarote, in Spagna.

In tabella 1 sono riportate le coordinate geografiche dei siti di prelievo dei cloni.

La collezione è conservata in vivo (Foto 7) presso l'azienda sperimentale del CRA-CIN ad Anzola dell'Emilia (Bologna), nella Bassa Pianura Padana (Lat. 44°32'N, Long. 11°80'E, 38 m. a.s.l.).

Il terreno è franco-limoso, classificato come "Udifluventic Haplustepts fine silty, mixed mesic" (Soil Survey Staff, 2003).

Il contenuto utile di umidità del terreno è di circa 106 mm per m di profondità.

Il clima è sub-continentale a causa della distanza dal mare che è di circa 200 km.

La piovosità media annua del sito è di circa 600 mm.

Tabella 1 Coordinate geografiche dei siti di prelievo degli ecotipi di *A. donax* collezionati presso l'azienda sperimentale del CRA-CIN, ad Anzola dell'Emilia (BO).

Origine	Coordinate geografiche
Budrio (BO)	44° 32' 17.33" N, 11° 32' 04.93" E
Piazza Armerina (EN)	37° 23' 00.45" N, 14° 22' 11.25" E
Osimo (AN)	43° 29' 09.93" N, 13° 28' 56.67" E
S. Severo (FG)	41° 41' 26.88" N, 15° 22' 37.44" E
Villa S. Giovanni (RC)	38° 13' 01.41" N, 15° 38' 12.90" E
Arezzo (AR)	43° 28' 16.32" N, 11° 51' 47.02" E
Marina di Bibbona (LI)	43° 14' 40.93" N, 10° 32' 03.27" E
Trebbo di Reno (BO)	44° 34' 41.33" N, 11° 21' 42.20" E
Fontane Bianche (SR)	36° 58' 17.40" N, 15° 13' 03,00" E
Capo d'Orlando (ME)	38° 09' 48.26" N, 14° 44' 46.01" E
Pisa-Livorno	43° 38' 21.59" N, 10° 22' 28.54" E
Cervia (RA)	44° 15' 36.28" N, 12° 21' 05.00" E
Rutigliano (BA)	41° 00' 39.86" N, 17° 00' 14.07" E
Pontecagnano (SA)	40° 38' 40.50" N, 14° 52' 24.68" E
Villasor (CA)	39° 22' 43.40" N, 8° 56' 37.68 E
Castel Maggiore (BO)	44° 34' 40.80" N, 11° 21' 42.12" E
Lanzarote (isole Canarie)	28° 07' 29.36" N, 15° 25' 48.03" W
Torviscosa (UD)	45° 49' 23.16" N, 13° 16' 40.44" E
Umbertide (PG)	43° 18' 23.40" N, 12° 20' 15.00" E
Fregene (RM)	41° 51' 11.81" N, 12° 11' 36.09" E
Asti (AT)	44° 54' 03.11" N, 8° 12' 24.53" E

1.5 Tecnica culturale adottata

Il trapianto dei materiali collezionati è stato realizzato il 23 aprile 2008 secondo uno schema a blocco randomizzato, con due ripetizioni e parcelle di 15 m² (3 m x 5 m). I rizomi sono stati interrati ad una profondità di 15 cm circa e a distanze di 0.60 m fra le file e 0.60 m sulla fila, per una densità d'investimento pari a 2.8 m⁻².

Antecedentemente al trapianto il terreno è stato arato (in estate), fresato (in autunno), erpicato (in primavera) e concimato con 100 kg ha⁻¹ di P₂O₅. Nel primo anno la tecnica di coltivazione ha previsto: i) un intervento irriguo (40 mm) subito dopo il trapianto, allo scopo di favorire una pronta ed uniforme emergenza dei culmi; ii) l'apporto di 100 kg ha⁻¹ di azoto (nitrato ammonico) dopo l'emergenza; iii) l'eliminazione delle erbe infestanti tramite lavorazione meccanica nelle interfile (fresatura) e manuale sulle file (sarchiatura). Dal secondo anno in poi, con la coltura ormai ben insediata, non vi è stata più alcuna esigenza di irrigazione, né di diserbo; pertanto, l'unico intervento culturale annualmente adottato consiste nella concimazione della coltura, apportando 100 kg ha⁻¹ di azoto alla ripresa vegetativa della coltura (metà aprile).

La raccolta della biomassa viene eseguita annualmente durante l'inverno (gennaio-febbraio). In tale occasione, per ciascun ecotipo vengono rilevate le caratteristiche biometriche dei culmi

(densità d'investimento, altezza, diametro e numero di nodi culmo⁻¹), la produzione di biomassa per unità di superficie e la relativa umidità. Sulla base di questi ultimi caratteri viene calcolata la resa in sostanza secca.



Foto 7 a,b. Parziale veduta della collezione di ecotipi di *Arundo donax* in conservazione presso l'azienda sperimentale del CRA-CIN ad Anzola dell'Emilia-BO (a), uno di essi si differenzia vistosamente da tutti gli altri per il colore variegato delle foglie (b).

1.6 Caratterizzazione dei materiali

Per i caratteri rilevati nel primo triennio (2008-2010) l'analisi della varianza (ANOVA) ha evidenziato effetti significativi indotti dagli anni e dai cloni, senza alcuna interazione fra i due fattori. Riguardo alle annate (Tab. 2) sono stati riscontrati: i) incrementi rilevanti del numero di culmi m⁻² sia nel secondo che nel terzo anno (+60.2 e +11.0%, rispettivamente); ii) aumento dell'altezza dei culmi (+23.1% e +4.7%, rispettivamente nel 2009 e 2010); iii) incremento del numero di nodi culmo⁻¹; e iv) aumento della produzione di sostanza secca (+101.6 e +10.7%). La coltura nel primo anno ha investito soprattutto nel suo insediamento, pertanto l'espressione dei caratteri produttivi è stata modesta; nel secondo e terzo anno, invece, grazie alla disponibilità di un apparato radicale ben sviluppato e alle abbondanti sostanze di riserva immagazzinate nei rizomi, ha potuto mostrare performance nettamente superiori.

I cloni si sono differenziati per i caratteri biometrici (Tab. 3) e produttivi (Tab. 4). Relativamente ai primi si sono avute differenze significative per: numero di culmi m⁻², altezza e diametro dei culmi, numero di nodi culmo⁻¹ e percentuale di piante fiorite. Le maggiori fittezze (circa 34 culmi m⁻²) sono state rilevate per i cloni "Osimo-1" e "Osimo-2"; va osservato tuttavia che la stragrande maggioranza di essi hanno evidenziato valori non dissimili. Analogo discorso vale per l'altezza dei culmi: a fronte del clone "Cervia", che si è contraddistinto per la maggiore taglia (433 cm), altri 16 cloni hanno raggiunto altezze analoghe (342-390 cm). Per il diametro basale dei culmi sono stati rilevati valori compresi fra 15.5 mm, per il clone "Fregene", e 19.5 mm per "Castelmaggiore". Similitudini ancora più ampie fra cloni sono state riscontrate per il numero di nodi culmo⁻¹; Infatti, il clone "Cervia", con il valore tendenzialmente più elevato (36.5 nodi culmo⁻¹) non si è differenziato da altre 19 accessioni. La fioritura delle piante è sempre stata molto scarsa e irregolare, mediamente ha interessato solo il 7.8% dei culmi. Gli ecotipi che hanno emesso il maggior numero di infiorescenze sono stati "Asti" e "Cervia" (42% dei culmi), non hanno fiorito affatto, invece, i cloni "Torviscosa", "Umbertide" e "Osimo-2".

La produzione di biomassa fresca in media ha raggiunto 70 t ha⁻¹, con oscillazione compresa fra 61 e 80 t ha⁻¹, rispettivamente per gli ecotipi "Asti" e "Castel Maggiore". L'umidità media della biomassa al momento del taglio è stata del 52%, senza differenze di rilievo fra la maggior parte degli ecotipi. La produzione media di sostanza secca ha raggiunto 33 t ha⁻¹ circa, con variazione compresa fra 29 e 38 t ha⁻¹, rispettivamente per i cloni "Fregene" e "Cervia".

Tabella 2 Effetti medi delle annate sui caratteri biometrici e produttivi dei cloni

Caratteri		2008	2009	2010
Culmi m ⁻²	(n.)	17.6 c	28.2 b	31.3 a
Altezza dei culmi	(cm)	306.1 b	376.7 a	394.3 a
Nodi culmo ⁻¹	(n.)	29.7 b	37.3 a	34.5 a
Biomassa fresca	(t ha ⁻¹)	40.9 b	74.4 a	93.8 a
Umidità	(%)	53.5 a	48.5 b	54.7 a
Sostanza secca	(t ha ⁻¹)	19.0 b	38.3 a	42.4 a

A lettere diverse della stessa riga corrispondono valori statisticamente differenti per P≤0.05 (test di Tukey).

Tabella 3 Percentuali di piante fiorite

Cloni	2009	2010	Medie*
Asti-AT	67.5	16.5	42.0 a
Torviscosa-UD	0.0	0.0	0.0 c
Budrio-BO	0.0	9.0	4.5 c
Trebbo di Reno-BO	2.5	10.5	6.5 bc
Castel Maggiore-BO	0.5	5.0	2.7 c
Cervia-RA	55.0	28.0	41.5 a
Pisa-PI	0.0	5.5	2.7 c
Arezzo-AR	1.0	2.5	1.7 c
Marina di Bibona-LI	0.0	4.5	2.2 c
Umbertide-PG	0.0	0.0	0.0 c
Fregene-RM	12.5	31.5	22.0 b
Osimo 1-AN	0.0	1.0	0.5 c
Osimo 2-AN	0.0	0.0	0.0 c
S.Severo-FG	1.5	12.5	7.0 bc
Rutigliano-BA	0.5	8.5	4.5 c
Pontecagnano-SA	0.0	4.0	2.0 c
Villa S.Giovanni-RC	0.0	2.5	1.2 c
Villasor-CA	3.0	10.0	6.5 bc
Capo D'Orlando-ME	0.0	2.0	1.0 c
Fontane Bianche-SR	9.0	11.0	10.0 bc
Piazza Armerina-EN	6.0	18.0	12.0 bc
Lanzarote-Spagna	0.5	3.5	2.0 c

Foto 8 Veduta di un ecotipo della collezione al termine della stagione di crescita dicembre 2011).



Tabella 4 Caratteristiche biometriche dei cloni collezionati

Cloni	Culmi m ⁻² (n)	Altezza culmi (cm)	Diametro culmi (mm)	Nodi culmo ⁻¹ (n.)
Asti-AT	23.3 fi	382.3 bd	17.5 ad	34.2 ac
Torviscosa-UD	29.5 bd	340.5 cg	17.0 ad	34.7 ac
Budrio-BO	21.8 gi	367.3 bf	18.2 ad	33.7 ac
Trebbo di Reno-BO	22.0 gi	374.0 be	18.3 ad	31.8 ac
Castel Maggiore-BO	24.0 fi	375.2 be	19.5 a	34.7 ac
Cervia-RA	20.0 hi	432.8 a	18.8 ac	36.5 a
Pisa-PI	27.5 cf	342.5 bg	18.0 ad	33.8 ac
Arezzo-AR	33.7 ab	342.3 bg	16.0 cd	33.8 ac
Marina di Bibona-LI	28.8 ce	332.2 eg	17.5 ad	33.5 ac
Umbertide-PG	31.8 ac	345.2 bg	16.5 bd	34.0 ac
Fregene-RM	22.0 gi	309.0 g	15.5 d	30.3 c
Osimo 1-AN	34.5 a	324.3 fg	15.5 d	30.5 bc
Osimo 2-AN	34.3 a	349.5 bg	16.2 cd	32.5 ac
S.Severo-FG	23.2 fi	344.3 bg	18.3 ad	33.2 ac
Rutigliano-BA	24.5 bh	371.8 bf	19.3 ab	35.5 ac
Pontecagnano-SA	19.7 i	365.7 bf	19.2 ab	35.8 ab
Villa S.Giovanni-RC	25.8 dg	372.3 bf	17.5 ad	32.8 ac
Villasor-CA	20.3 hi	386.7 ac	18.7 ac	36.0 a
Capo D'Orlando-ME	26.0 dg	348.2 bg	18.0 ad	35.0 ac
Fontane Bianche-SR	23.0 fi	389.8 ab	19.3 ab	35.3 ac
Piazza Armerina-EN	22.8 fi	365.0 bf	18.2 ad	34.3 ac
Lanzarote-Spagna	27.0 df	337.5 dg	17.3 ad	31.8 ac
Medie	25.7	359.0	17.7	33.8

Lettere comuni nella stessa colonna indicano valori non significativamente diversi per $P \leq 0.05$ (test di Tukey).

Tabella 5 Caratteristiche produttive dei cloni in collezione

Cloni	Biomassa fresca (t ha ⁻¹)	Umidità (%)	Sostanza secca (t ha ⁻¹)
Asti-AT	60.9 b	50.3 ab	30.5 bd
Torviscosa-UD	64.4 b	52.0 ab	31.1 bd
Budrio-BO	62.3 b	52.2 ab	29.9 cd
Trebbo di Reno-BO	66.3 ab	52.2 ab	31.7 ad
Castel Maggiore-BO	79.8 a	52.9 ab	37.4 ab
Cervia-RA	73.7 ab	48.3 b	38.4 a
Pisa-PI	75.1 ab	53.6 ab	34.9 ad
Arezzo-AR	73.9 ab	49.9 ab	36.8 ac
Marina di Bibona-LI	72.4 ab	52.1 ab	34.9 ad
Umbertide-PG	71.4 ab	52.2 ab	33.9 ad
Fregene-RM	63.3 b	54.2 a	28.8 d
Osimo 1-AN	66.5 ab	53.5 ab	30.8 bd
Osimo 2-AN	69.1 ab	52.9 ab	32.4 ad
S.Severo-FG	66.6 ab	53.7 ab	30.4 bd
Rutigliano-BA	69.1 ab	53.3 ab	32.2 ad
Pontecagnano-SA	70.5 ab	50.5 ab	35.2 ad
Villa S.Giovanni-RC	70.5 ab	51.3 ab	34.7 ad
Villasor-CA	69.8 ab	50.2 ab	35.0 ad
Capo D'Orlando-ME	68.8 ab	52.6 ab	32.4 ad
Fontane Bianche-SR	74.7 ab	52.7 ab	35.4 ad
Piazza Armerina-EN	72.1 ab	53.4 ab	33.4 ad
Lanzarote-Spagna	72.2 ab	54.9 a	31.9 ad
Medie	69.7	52.2	33.3

A lettere comuni della stessa colonna corrispondono valori non significativamente diversi per $P \leq 0.05$ (test di Tukey).

1.7 Ampliamento della collezione

È in corso l'ampliamento della collezione attraverso la raccolta di nuovi materiali di provenienza estera, con l'obiettivo di includere in essa maggiore variabilità.

1.8 Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo finanziario del MiPAAF, nell'ambito del progetto di ricerca BIOSEA.

1.9 Bibliografia

- Angelini L.G., Ceccarini L., Bonari E., 2005. Biomass yield and Energy balance of giant reed (*Arundo donax* L.) cropped in central Italy as related to different management practices. *Europ. J. Agronomy* 22: 375-389.
- Beale C.V. and Long S.P., 1995. Can perennial C4-grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? *Plant Cell Environ* 18: 641-650.
- Bell G.P., 1997. Ecology and management of *Arundo donax*, and approaches to riparian habitat restoration in southern California. In: Brock J.H., Wade M., Pysek P, Green D. (eds). *Plant invasions: studies from North America and Europe*. Leiden, The Netherlands, Backhuys Publishers, 103-113.
- Bhanwra R.K., Choda S.P., Kumar S., 1982. Comparative embryology of some grasses. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 48:152-162.
- Boose A.B., Holt J.S., 1999. Environmental effects on asexual reproduction in *Arundo donax*. *Weed research*. 39 (2):117-127.
- Ceotto E., Di Candilo M., 2011. Medium-term effect of perennial energy crops on soil organic carbon storage. *Italian Journal of Agronomy* 6:e33:14-19.
- Christou M., 2001. Giant reed in Europe. In: *Proceedings of the First World Conference on Biomass for Energy and Industry*, Sevilla , Spain, 5-9 June 2000, pp. 2089-2091.
- Cosentino S., Foti S., Venturi G., Giovanardi R., Copani V., Mantineo M., D'Agosta G., Bezzi G., Mazzocco T., 2005. Colture erbacee annuali e poliennali da biomassa per energia di possibile coltivazione in Italia. *Agroindustria* 1, 35-48.
- Di Candilo M., Ceotto E., Diozzi M., 2008. Comparison of 7 ligno-cellulosic biomass feedstock species: 6-years results in the Low Po Valley. In: Rossi Pisa P. (ed.) *10th Congress of the European Society of Agronomy, Bologna, Multi-functional Agriculture, Agriculture as a Resource for Energy and Environmental Preservation*. *Italian Journal of Agronomy*, Vol. 3, No. 3 suppl., 481-482.
- Di Candilo M., Cesaretti C., Ranalli P., Diozzi M., Pasini P., 2005. Colture da biomassa nel bolognese: produzione e conversione energetica. *Agroindustria* 1, 27-34.
- Di Tomaso J.M., 1998. Biology and ecology of giant reed. In: Bell, Carl E., ed. In: *around and salt cedar: the deadly duo: proceedings of a workshop on combating the tore from around and salt cedar*; 1998 June 17; Ontario, CA: University of California, Cooperative Extension: 1-5.
- Di Tomaso J.M., Healey E.A., 2003. Aquatic and riparian weeds of the west. *University of California – Agriculture and Natural Resources Publication* 3421, 254-262.
- Dudley T.L., 2000. *Arundo donax* L. In *Invasive Plants of California's Wildlands*, 53-58. Eds C.C. Brossard, J.M. Randall and M.C. Hoshovsky. Berkeley, California: University of California Press.
- Facchini P., 1941. La canna gentile per la produzione della cellulosa nobile, l'impresa agricolo-industriale di Torviscosa, SNIA VISCOSA, Milano.
- Foti S., Cosentino, S.L., 2001. Colture erbacee annuali e poliennali da energia. *Rivista di Agronomia* 35: 200-215.
- Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* 28:384-410.
- Jackson G.C. and Nunez J.R., 1964. Identification of silica present in the giant-reed (*Arundo donax* L.). *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico* 48: 60-62. [46766].
- Johnson M., Dudley T., Burns C., 2006. Seed production in *Arundo donax* L. *California: Invasive Plant Council* 14:12-13.

- Kos B., Greman H. and Lestan D., 2003. Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant Soil Environ.* 49:548-553.
- Lewandoski L., Scurlock J.M.O., Lindvall E., Christou M., 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass & Bioenergy* 25:335-381.
- Lunnan A., 1997. Agriculture based biomass Energy supply-a survey of economic issues *Energy Policy* 25:573-582.
- Mariani C., Cabrini R., Danin A., Piffanelli P., Fricano A., Gomarasca S., Di Candilo M., Grassi F., Soave C., 2010. Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.): a promising weedy energy crop. *Annals of Applied Biology* 157:191-202.
- McLaughlin S.B. and Walsh M.E., 1998. Evaluating environmental consequences of producing herbaceous crops for bioenergy. *Biomass and Bioenergy* 14:317-324.
- Mirza N., Mahmood Q., Pervez A., Ahmad R., Farooq R., Shah M.M., Azim M.R., 2010. Phytoremediation potential of *Arundo donax* in arsenic-contaminated synthetic wastewater. *Bioresour Technol.* 101:5815-9.
- Onofri A., 1940. La canna comune (*Arundo donax* L.), Ed. INC.
- Peck G.G., 1998. Hydroponic growth characteristics of *Arundo donax* L. under salt stress. In: Bell, Carl E., ed. In: *Arundo and saltcedar: the deadly duo: Proceedings of workshop on combating the threat from arundo and saltcedar; 1998 June 17; Ontario, CA. Holtville, CA: University of California, Cooperative Extension: 71.*
- Perdue R.E., 1958. *Arundo donax* – source of musical reeds and industrial cellulose. *Economic Botany* 12:368-404.
- Pimental D. and Krummel J., 1987. Biomass energy and soil erosion: assessment of resource costs. *Biomass* 14:15-38.
- Polunin O., Huxley A., 1987. *Flowers of the Mediterranean.* Hogarth Press, London.
- Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick Jr W.J., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T., 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311:484-489.
- Ranney J.W. and Mann L.K., 1994. Environmental considerations in energy crop production. *Biomass and Bioenergy* 6 (3):211-228.
- Rossa B., TuAers A.V., Naidoo G., von Willert D.J., 1998. *Arundo donax* L. (Poaceae)—a C₃ species with unusually high photosynthetic capacity. *Botanica Acta* 111:216-21.
- Shalatov A.A. and Pereira H., 2006. Papermaking fibers from giant reed (*Arundo donax*) by advanced ecologically friendly pulping and bleaching technologies. *BioResources* 1(1): 45-61.
- Shatalov A.A. and Pereira H., 2002. Influence of stem morphology on pulp and paper properties of *Arundo donax* L. *Ind. Crops and Prod.* 15:77-83.
- Soil Survey Staff, 2003. *Keys to Soil Taxonomy*, 9th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.
- Tolbert V.R., Thornton F.C., Joslin J.D., Bock B.R., Bandaranayake W.E., Tyler D., Pettry D., Green T.H., Makik R., Bingham L., Houston A.E., Shires M., Dewey J. and Schoenholtz S., 1998. Soil and water quality aspects of herbaceous and woody energy crop production: lessons from research-scale comparison with agricultural crops. *Proc. BioEnergy '98: Expanding Bioenergy Partnership, Madison, Wisconsin, October 4-8, 1998.*
- Vecchiet M., Jodice R., 1996. Experiments in the production of giant reed (*Arundo donax* L.) biomass. *Biomass for energy and the environment.* In: *Proceedings of the Ninth European Bioenergy Conference*, vol. 1: 70-77.
- Zohary, M. 1962. *Plant life of Palestine.* Ronald Press, New York. COM(2007) 354 final.

COSTITUZIONE, MANTENIMENTO E VALORIZZAZIONE DI UNA COLLEZIONE DI LINEE DI RICINO (*RICINUS COMMUNIS* L.)*

Responsabile Scientifico: Dr. Andrea Del Gatto; contributo di Lorella Mangoni

CRA–CIN Centro di ricerca per le colture industriali

Via Cagiata, 90 – 60027 Osimo (AN)

Riassunto

Innanzitutto vengono illustrate le principali caratteristiche morfologiche e biologiche della specie, oltre alle essenziali esigenze ambientali. Vengono poi effettuati alcuni cenni sull'origine e diffusione della specie che da esotica ha conosciuto una progressiva introduzione sul territorio europeo grazie alle caratteristiche del suo olio che ne rendono possibile l'impiego in una vasta gamma di utilizzazioni industriali. In Italia il lavoro su questa specie è iniziato nei primi anni Ottanta del secolo scorso, con progetti finanziati dal Ministero dell'Agricoltura. L'attività è consistita nella domesticazione della specie adattandola alle nostre condizioni pedo-climatiche e selezionando un ideotipo in grado di coniugare elevata produttività, brevità del ciclo biologico, statura ridotta e maggiore contemporaneità di maturazione tra i racemi, solitamente troppo scalare, cercando di adeguare il più possibile i genotipi alla meccanizzazione della raccolta. Lo studio dell'attitudine combinatoria generale e specifica del materiale ottenuto ha portato all'identificazione di numerose linee inbred monoiche e ginoiche in grado di adattarsi all'areale italiano e di essere utilizzate per l'ottenimento di valide combinazioni ibride. Purtroppo successivamente, a causa dell'interruzione di finanziamenti specifici e del mancato decollo su larga scala della coltura in ambito nazionale, si è dovuto soprassedere alla riproduzione del materiale ottenuto. Solo a partire dall'ultimo biennio si è potuto intraprendere, grazie alla partecipazione al Progetto RGV/FAO, un'azione di recupero del materiale esistente provvedendo alla sua moltiplicazione e ringiovanimento, eseguendo anche un lavoro di caratterizzazione secondo i criteri dettati dallo stesso progetto.

Summary

Firstly, the species' main morphological and biological features are explained, as well as the essential environmental requirements. Some mention is then made about the origin and spread of the species, which despite being exotic has gradually been introduced in the European territory thanks to its oil's features, which allow its use in a wide set of industrial utilizations. In Italy, work on this species started in the early 80s of the past century with projects financed by the Ministry of Agriculture. The activity consisted in the species' domestication adapting it to our pedoclimatic conditions and selecting an ideotipo able to combine high productivity, brevity of biological cycle, lowered height and greater growth contemporariness among racemes, which is usually too scaled, in order to adapt as much as possible the genotypes to the harvesting mechanization. The study of the general and specific combining ability of the obtained material has led to the identification of many monoicous and ginoicous inbred lines able to adapt to the Italian area and to be used to obtain valid hybrid combinations. Unfortunately afterwards, because of the interruption of specific funds and the failed take-off on a large scale of cultivation in Italy, the reproduction of the obtained material had to be deferred. Only starting from the past two years, thanks to the participation at the RGV/FAO Project, a recovery of the existing material has been possible, along with its multiplication and progressive renewal, also performing a work of characterization according to the project's criteria.

Parole chiave

Attitudine generale e specifica alla combinazione (AGC e ASC), linea inbred ginoica, linea inbred monoica, racemo, capsula, contenuto di olio, acido grasso

Key words

General and specific combining abilities (GCA and SCA), ginoicous inbred line, monoicous inbred line, raceme, capsule, oil content, fatty acid

* doi:10.4458/0986-49

1.1 Inquadramento botanico, morfologico e biologia

Il genere *Ricinus* appartiene alla famiglia delle Euphorbiaceae; nell'ambito della specie (*Ricinus communis* L.) sono riconosciute sei sub-specie (Moshkin, 1986): *communis*, *sinensis*, *zanzibarinus*, *persicus*, *indicus*, *ruderalis*, al cui interno sono classificate ben venticinque varietà. È una pianta perenne, erbacea o arbustiva, ad accrescimento indeterminato. Presenta un robusto apparato radicale fittonante, foglie peltato-palmate disposte alternate su fusto e ramificazioni. Il fusto principale, dopo la formazione di un certo numero di nodi, variabile a seconda della varietà, termina con una infiorescenza di tipo racemiforme. Dopo la formazione del primo racemo, dai nodi sottostanti si sviluppano ramificazioni di primo ordine che a loro



volta terminano con un'infiorescenza [FOTO 1]; dai nodi delle ramificazioni di primo ordine è poi possibile lo sviluppo di ramificazioni di ordine superiore. L'altezza della pianta, nei tipi coltivati, è variabile e compresa tra i 50-60 cm delle forme nane (dwarf) ed i 2 o 3 metri delle forme normali.

Foto 1 Racemo apicale di pianta ornamentale di ricino con capsule spinose rosa

La specie è comunemente monoica e l'infiorescenza è fornita nella parte superiore di fiori femminili e in quella inferiore di fiori maschili; tuttavia sono riscontrabili anche piante ginoiche nelle quali tutto l'asse del racemo è ricoperto da fiori femminili [FOTO 2]. Nel ricino non è stata reperita una vera e propria maschiosterilità, ma l'esistenza di forme con assenza di fiori maschili (ginoicismo) permette di ottenere racemi e quindi piante completamente femminili. Tre tipi di piante femminili sono attualmente conosciuti: il tipo "N", quello "S" e il "NES". Nel tipo "N" (Claassen e Hoffman, 1950; Zimmerman e Parkey, 1954) la femminilità delle piante è dovuta alla condizione omozigote di un allele recessivo (ff); nella situazione eterozigote (Ff) le piante sono normali, cioè monoiche. Tale tipo di femminilità viene mantenuta con unioni fratello (Ff)-sorella (ff) con le quali si ottengono discendenze in cui le piante femminili sono presenti al 50%. Nella produzione di ibridi F₁ utilizzando tale tipo di femminilità è necessario eliminare le piante monoiche nelle linee portaseme prima dell'antesi.

Nel tipo S (Shifriss, 1956; 1960; 1973; Brigham, 1961) le piante, inizialmente tutte femminili, reversiono più tardi verso il tipo monoico. Questo fenomeno può avvenire in qualsiasi momento successivo alla emissione del primo racemo. La selezione per tale tipo di femminilità viene eseguita coltivando le piante in una località isolata spazialmente e lasciando riprodurre le piante ginoiche e le piante che reversiono il più tardi possibile. La progenie di tali piante, in funzione della costituzione genetica, della pressione di selezione applicata e del numero di cicli di selezione attuati può fornire il 60-95% di piante inizialmente femminili. La genetica del ginoicismo di tipo S non è stata risolta, ma si considera che dipenda da un sistema poligenico con effetti di dominanza ed epistasia.

Foto 2 Particolare dell'infiorescenza di pianta di ricino ginoica



Nel tipo NES a fiori maschili sparsi tra i fiori femminili (interspersed) i geni per il ginoicismo sono accompagnati da geni modificatori (s), che possono presentare penetranza in funzione delle alte temperature (Zimmerman e Smith, 1966). Tali geni modificatori, indipendentemente dai geni f, quando manifestano

penetranza, fanno comparire, all'interno del racemo femminile, fiori maschili sparsi in numero variabile, che consentono l'impollinazione. Per il mantenimento di tale tipo si selezionano piante femminili da un reincrocio e si pone la progenie in isolamento spaziale in un ambiente caldo e con una stagione vegetativa lunga; si eliminano prima della fioritura sia le piante tendenti al monoicismo, sia quelle che presentano troppi fiori maschili sparsi. Viene quindi raccolto il seme proveniente da piante femminili con pochi fiori. Questo, in opportune condizioni culturali, dovrebbe produrre il 100% di piante femminili e consentire di realizzare ibridi senza ricorrere al gravoso lavoro di eliminazione delle piante monoiche. Tra i meccanismi che consentono l'ottenimento di linee quasi completamente femminili quello NES è considerato il migliore (Anonimo, 1964). I frutti sono capsule triloculari, spinose o inermi, che contengono tre semi ovoidi, macchiettati, depressi dal lato interno, provvisti di caruncola biloba, contenenti fino al 50-60% di olio sulla sostanza secca [FOTO 3]. Il ricino è una pianta perenne semi-tropicale; il suo ciclo tende alla poliannualità anche se nei nostri ambienti le gelate e le basse temperature della stagione autunno-invernale determinano la morte della pianta. In ogni fase del suo ciclo biologico presenta notevoli esigenze termiche richiedendo temperature comprese tra i 20° e i 26°C, mentre temperature molto alte (40°C e oltre) alla fioritura, anche per un breve periodo, causano il disseccamento dei fiori.

Foto 3 Semi di ricino di diverse varietà: da destra NANO 15/86, Smarald, Hale e Doskaja



La pianta cresce e produce in qualsiasi tipo di suolo, fatta eccezione per quelli troppo argillosi e/o mal drenati poiché è sensibile all'eccesso di umidità. Suoli eccessivamente fertili favoriscono troppo la crescita vegetativa, protraggono la fioritura, prolungano il periodo di maturazione, influenzando negativamente sulla produzione di semi.

1.2 Origine e diffusione della specie

Reperti archeologici nell'Asia sud-occidentale pare abbiano dimostrato la coltivazione del ricino sin dal 6000 a.C. (1), ma la prima testimonianza scritta del ricino nel mondo ebraico-cristiano la si può trarre dalla sacra scrittura, dove, nell'Antico testamento, se ne fa esplicita menzione (Giona, 4, 6s). Dopo la notorietà conosciuta nel mondo antico il ricino, successivamente, quasi scomparve, a causa dell'interesse dimostrato dai viaggiatori portoghesi, spagnoli, francesi, inglesi e olandesi nei secoli XV-XVII per nuove essenze oleaginose come girasole, colza, cartamo, soia, sesamo, lino. Soprattutto nella seconda metà dell'Ottocento, con l'isolamento della ricinina (1854: Touson; 1975: Lessona, della ricinoleina (1985: Julliard), della ricineloidina (1897: Meyer), la pianta cominciò a recuperare terreno e nel Novecento si cominciò a sfruttarla per uso industriale. La coltivazione del ricino ebbe un certo sviluppo in Italia nel periodo autarchico (5-10.000 ettari), per poi venire abbandonata, nei primi anni '50 (Vannozzi, 1984) per la mancanza di varietà idonee (scarsa precocità e poliracemia, unitamente a produzioni non remunerative). Sul finire degli anni Settanta del secolo scorso il fabbisogno mondiale era arrivato a circa 1,6 milioni di quintali di semi. Negli anni Ottanta, oltre il 60% della superficie coltivata nel mondo (circa 1,5 milioni di ettari) era concentrata in India e Brasile, a cui facevano seguito Cina, URSS e Thailandia. Attualmente la produzione di seme supera stabilmente il milione di tonnellate; Cina e India ne sono i maggiori produttori. Sotto la spinta della crescente domanda e del consistente aumento del prezzo sui mercati internazionali, oltre che dalla drastica riduzione delle esportazioni attuata dai paesi tradizionalmente produttori (soprattutto l'India), nel nostro Paese la specie è divenuta a pieno titolo oggetto di numerosi studi a partire dal progetto "Oleaginose" finanziato dal MAF in cui la coltura è stata inclusa a pieno titolo (Venturi, 1983), con le finalità di saggiare, oltre che le possibilità offerte dal miglioramento genetico per l'ampliamento del panorama varietale (Vannozzi, 1983; Laureti, 1987), il comportamento bio-agronomico di alcune accessioni di provenienza estera (Laureti, 1981; Vannozzi et al., 1982; Vannozzi et al., 1983), nonché le possibilità di perfezionamento della tecnica colturale (Baracchi, 1981; Laureti, 1982 e 1983; Marras, 1984).

1.3 Destinazione d'uso

L'olio di Ricino è considerato un prodotto strategico nella maggior parte dei Paesi occidentali e viene impiegato in oltre ottocento applicazioni industriali per prodotti quali materie plastiche, vernici, cosmetici, rivestimenti e resine; opportunamente raffinato trova impiego in campo medico come lassativo, in campo farmaceutico come emolliente e solvente accoppiato (la presenza di una lunga catena carboniosa, unita ad un ossidrile, lo rende compatibile con olii, cere, resine; gomme e polimeri) e nell'industria cosmetica. Numerosi sono gli impieghi dell'olio di ricino raffinato nel campo delle vernici: lacche per metalli, legno, carta. Viene largamente impiegato nel campo degli adesivi e dei plastificanti. Il seme ne contiene il 45-55%, costituito per l'85-90% da acido ricinoleico che, per la presenza del doppio legame e l'alto peso molecolare, gli conferisce un basso punto di fusione (5°C) e un bassissimo punto di solidificazione (da 12 a -18°C). Rispetto ai derivati del petrolio presenta numerosi vantaggi: minore viscosità a temperature basse e più basso punto di fusione (utile per una più facile accensione dei motori), mantenimento delle caratteristiche anche ad alte temperature, inferiore volatilità (con conseguente riduzione delle perdite per evaporazione). La maggior durata (per la migliore stabilità chimica) e la non tossicità ne fanno un eccellente lubrificante per macchine che operano in condizioni particolari (come nelle zone artiche) e nell'industria aeronautica. Inoltre, non essendo essiccativo e non irritando la pelle, viene utilizzato anche per prodotti farmaceutici e dermatologici (Laureti, 1998). Il sottoprodotto della lavorazione, non è utilizzabile per l'alimentazione animale, a causa della presenza della ricina, potente citotossina, nei pannelli e farine di estrazione, mentre può essere impiegato come fertilizzante del terreno.

1.4 Reperimento materiale genetico

La struttura di Osimo ha intrapreso l'attività di miglioramento genetico sul ricino intorno agli anni '80, con il progetto "Oleaginose", finanziato dal Ministero dell'Agricoltura. Essendo una specie di origine esotica, il lavoro è stato finalizzato alla costituzione di varietà ed ibridi idonei alle condizioni climatiche del nostro Paese. Il materiale di partenza è stato donato dagli Stati

Uniti (MC Nair 506, Pacific, Hale, Dale, Lynn, Cnes1) e da Israele (H22) e solo a metà degli anni '90, dalla Francia (HD 912, H531, HD 913, Pronto). Tutte le varietà introdotte dall'estero erano caratterizzate da un ciclo vegetativo eccessivamente lungo per le nostre condizioni climatiche. In primis perciò si è intrapreso un lavoro di screening per identificare i tipi in grado di sostenere una selezione per la riduzione del ciclo biologico ed il miglioramento dei caratteri in grado di avvicinarne la pianta ai canoni di allevamento intensivo-meccanizzato.

1.5 Valutazione e studio del materiale in selezione

Le varietà di ricino presenti in Italia e negli altri paesi europei, nel 1978, anno in cui la coltura è stata oggetto di attenzione da parte della comunità europea, che ne ha tentato la reintroduzione, ritenendola, come negli USA, una pianta strategica, erano state costituite per un'agricoltura in cui l'intervento manuale dell'uomo era determinante, specialmente per la raccolta. Nel panorama varietale americano esistevano ibridi dwarf che arrivavano a produrre 20 q/ha (Mc Nair 506), in quello israeliano altri che avevano una potenzialità produttiva superiore (Hazera 22), ma erano comunque inadatti alla meccanizzazione della raccolta, perché troppo alti o con maturazione troppo scalare tra racemi, o ciclo colturale troppo lungo. Le prime valutazioni dei materiali esistenti hanno permesso di tracciare un'ideotipo, per le condizioni colturali italiane ed europee, che presentasse, insieme a una buona produttività (oltre i 30q/ha), una taglia della pianta contenuta (intorno al metro). Lo sviluppo di cultivar ibride ha richiesto innanzitutto la selezione di linee maschiosterili (ginoiche); nel corso degli anni sono quindi state selezionate 15 linee ginoiche: CNES1, 10/83, 16/83, 18/83, 10/83 dw, 10/83 inerme, 10/83 tardivo, 31/86, 59/86, H22, CNES1 succ., 10/83 x 18/83, CNES1 x 18/83, 103 inter., H529. Nel contempo è stato necessario individuare linee impollinanti che combinarsero bene con le femminili. Dal lavoro di selezione e di autofecondazione delle linee di partenza si è perciò passati allo studio dell'attitudine combinatoria generale e specifica del materiale ottenuto che ha portato all'identificazione di circa 50 linee inbred monoiche in grado di adattarsi all'areale italiano e di essere utilizzate per l'ottenimento di combinazioni ibride sperimentali.

1.6 Valorizzazione del materiale genetico

Annualmente, a partire dal 1985, sono stati costituiti numerosi ibridi sperimentali attraverso la realizzazione di appositi campi di riproduzione isolati che sono stati sottoposti a valutazione agronomica in prove ripetute in diversi anni, in asciutto e in irriguo (Laureti, 1995; Laureti e Fedeli, 1995). Da un primo lavoro di confronto varietale ne sono stati rilasciati due, entrambi a taglia alta, denominati Castore e Polluce, con produttività comparabile al miglior ibrido israeliano, ma molto più precoci. Successivamente ne sono stati individuati altri due a taglia bassa, Riscio e Negus, con produttività comparabile o superiore ai migliori ibridi francesi (Tab. 1) costituiti nello stesso periodo (Laureti e Marras, 1995; Laureti et al., 1998; Laureti, 1998). Nel 1994 per tutti è stata inoltrata al Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste domanda di iscrizione al Registro Nazionale, ma la Commissione sementi non ha ritenuto opportuna la redazione ex novo di un apposito registro per la catalogazione delle stesse (Tab. 2).

1.7 Conservazione del materiale genetico

I numerosi progetti di ricerca nazionali ed internazionali finalizzati cui la struttura ha partecipato e l'intenso lavoro di miglioramento genetico intrapreso negli anni passati hanno consentito la selezione di un cospicuo numero di individui (linee ed ibridi) di cui, purtroppo, a causa dell'interruzione di finanziamenti specifici ed il mancato decollo su larga scala della coltura in ambito nazionale, si è dovuto soprassedere alla riproduzione. Solo a partire dall'ultimo biennio si è potuto intraprendere, grazie alla partecipazione al Progetto RGV/FAO, un'azione di recupero del materiale esistente provvedendo alla sua moltiplicazione e ringiovanimento. A tale scopo sono state effettuate semine mirate alla riproduzione in isolamento spaziale delle linee in dotazione e delle combinazioni ibride più interessanti.

Tabella 1 Caratteristiche agronomiche delle cultivar sperimentate nel 1997.

Cultivar	Produzione		Olio	Produzione olio	Altezza piante	
	asciutto	irriguo			asciutto	irriguo
	(q ha ⁻¹ ss)				%	(q ha ⁻¹ ss)
101	12,7 j	30,2 be	48,9 ei	10,6 ch	90 ko	138 eh
125	12,6 j	22,5 fh	48,3 fi	8,5 gh	80 no	110 hn
131	11,9 j	24,4 ef	49,6 dg	9,0 eh	87 mo	108 hn
Negus	13,7 j	25,0 df	51,3 bd	10,0 ch	80 no	122 fk
Riscio	11,2 j	24,0 eg	47,6 hi	8,4 fh	84 no	143 eg
1100	12,0 j	21,0 fi	50,0 cf	8,3 gh	73 o	97 jo
HD 912	17,5 gj	36,3 ab	53,3 a	14,6 ab	89 lo	122 fk
B9	13,6 j	23,7 eg	47,1 i	8,8 eh	84 no	148 ef
114 fc	10,9 j	22,9 fg	47,5 hi	8,1 h	85 no	132 fi
114 fp	13,9 j	26,6 cf	49,6 dg	10,1 ch	93 ko	143 eg
Pronto	15,2 ij	27,4 cf	43,9 j	9,4 dh	100 io	130 fi
H 913	16,3 hj	39,9 a	53,2 a	15,3 a	122 fk	190 bd
Castore	15,1 ij	33,1 bc	51,9 ac	12,7 ac	132 fi	225 a
1028	15,7 ij	27,7 cf	51,5 ac	11,3 cf	128 fj	225 a
1006	16,4 hj	32,5 bc	51,3 bd	12,8 ac	122 fk	202 ac
Polluce	12,9 j	23,6 eg	52,1 ab	9,6 dh	119 fm	225 a
H 530	14,2 ij	29,9 be	50,6 be	11,2 cg	112 gn	217 ab
H 529	15,0 ij	31,8 bc	51,7 ac	12,2 bd	97 jo	163 de
H 526	14,2 ij	31,4 bd	48,0 gi	11,1 cg	100 io	127 fj
H 531	13,8 j	32,2 bc	49,8 eh	11,5 ce	120 fl	183 cd
Medie	13,9	28,3	49,8	10,7	100	158

Tabella 2 Breve descrizione degli ibridi proposti per l'iscrizione al Registro nazionale

NOME	DESCRIZIONE
CASTORE	Ibrido semplice, ottenuto dall'incrocio tra una linea ginoica alta, verde e cerosa, con peduncolo della capsula ramificato, tardiva e a capsule spinose, indicata con la sigla 700, e una linea alta, verde, cerosa, con peduncolo della capsula non ramificato, a capsule spinose. E' un ibrido molto produttivo, tardivo, verde ceroso, con alcune piante monoracemiche e altre con due racemi, che può raggiungere in irriguo o in buone condizioni idriche i 2 metri di altezza. Le capsule risultano indeiscenti a maturità.
POLLUCE	Ibrido semplice ottenuto dall'incrocio tra una linea ginoica alta, verde e cerosa, con peduncolo della capsula non ramificato, capsule spinose e una linea monoica alta, verde, senza cera e con peso del seme medio-alto. L'ibrido, medio tardivo e produttivo, può presentare deiscenza delle capsule se dopo la maturazione viene lasciato troppo a lungo in campo.
RISCIO	Ibrido semplice ottenuto da una linea ginoica rossa, senza cera, dwarf, a capsule spinose, selezionata a sua volta da un polincrocio di germoplasma americano, e da una linea dwarf, verde, senza cera, capsule inermi. L'ibrido, verde ceroso, presenta una produttività comparabile con quella delle migliori cultivar; spinoso, è suscettibile alla caduta delle capsule per attacchi di Botrytis in autunni molto piovosi e umidi.
NEGUS	Ibrido semplice, ottenuto dall'incrocio tra la linea ginoica del Riscio e N 15, dwarf, verde senza cera, a capsule spinose. Presenta, a sua volta, portamento dwarf, colorazione verde senza cera e capsule spinose; monoracemico quando coltivato in condizioni di ridotte disponibilità idriche, presenta 2-3 racemi in irriguo; è uno dei più stabili ibridi conosciuti e nelle prove comparative è sempre risultato il più produttivo o statisticamente non differente dal migliore; La sua resa oscilla da 1,5 t ha ⁻¹ in asciutto fino a 3,2 t ha ⁻¹ in irriguo.

1.7.1 Riproduzione di linee inbred

Nel 2009 si è proceduto alla prima semina del materiale in giacenza presso la struttura di Osimo. Nella nursery sono state approntate file, distanti almeno 70 cm, di 20 poste ogni accessione, cercando di distribuire per ognuna un quantitativo di seme sovrabbondante a causa della incerta vitalità germinativa dello stesso, provvedendo a successive risemie per quelle non emerse [FOTO 4].



Foto 4 Nursery di ricino con file distanti 70 cm

Alla fioritura si è provveduto a selezionare le più rispondenti alle caratteristiche della linea e ad isolarne il racemo principale con sacchetti di carta Kraft chiusi ed assicurati alla pianta alla base dell'infiorescenza, rinnovandoli ogni qual volta si deterioravano per favorirne l'autofecondazione al sicuro da possibili inquinamenti [FOTO 5 e 6].



Foto 5 Piante nella fase appena precedente l'antesi



Foto 6 Per evitare inquinamenti le infiorescenze vengono isolate con sacchetti di carta

Alla maturazione [FOTO 7] i racemi sono stati recisi e le capsule sgusciate manualmente. I semi sono stati pesati e catalogati. Per ottenere un maggior quantitativo di seme di alcune

linee intervenenti nella formula di alcuni ibridi, gli anni successivi si è operato seminando le singole linee in campi dedicati isolati.

1.7.2 Riproduzione di seme ibrido tramite incrocio manuale

A partire dal 2010 si è iniziata la riproduzione delle combinazioni ibride, che, a causa delle esigue disponibilità dei parentali, si è dovuta eseguire manualmente. La semina è stata effettuata binando i parentali (linea ginoica e monoica) alla cui fioritura si è operato l'isolamento con gli appositi sacchetti (in funzione delle condizioni ambientali, la maggior parte dei fiori femminili sono aperti e recettivi da 5 a 7 giorni dopo l'insacchettamento). L'impollinazione è stata eseguita al momento della recettività degli stigmi, prelevando con una pinzetta i fiori maschili e sfregandoli sui femminili. Ogni qual volta questi ultimi presentavano una recettività scalare è stato necessario ripetere l'operazione dopo qualche giorno. Per la raccolta si è proceduto come descritto sopra.

1.7.3 Produzione in isolamento spaziale

La produzione di seme ibrido su più larga scala è stata realizzabile solo per quelle combinazioni di cui si era riusciti a produrre un congruo quantitativo di seme. A tale scopo si è ritenuto utile predisporre campi di riproduzione isolati spazialmente con un singolo impollinante. In questi sono state seminate file alternate di impollinanti e di portaseme in rapporto di 1 a 5. Le piante fuori tipo sono state eliminate poco prima della fioritura. E' opportuno rispettare una distanza da altre coltivazioni di ricino di almeno 800 m ispezionando e rimuovendo qualsiasi pianta spontanea o ornamentale compatibile nel raggio di tale distanza. Separati a maturità i racemi raccolti sul portaseme da quelli sull'impollinante, il cui seme servirà al mantenimento della linea, la sgusciatura delle singole capsule, liberate dal rachide manualmente, è stata effettuata avvalendosi di una apparecchiatura fatta realizzare dalla Struttura appositamente per coadiuvare l'operazione [FOTO 8].



Foto 7 Capsule di ricino a maturità



Foto 8 Macchina sgusciatrice

1.7.4 Conservazione in ambiente controllato

Allo scopo di prolungare il periodo di vitalità germinativa delle partite di seme annualmente riprodotte, si sono inoltre intrapresi i lavori di sistemazione di un'apposita camera di essiccazione e stoccaggio per la migliore conservazione del materiale prodotto ogni anno. Dove i semi vengono conservati in buste di carta riposte in scatoloni di cartone disposti su scaffalature metalliche. È stata inoltre intrapresa l'opera di conservazione a lungo termine riponendo la semente in buste di plastica sigillate sottovuoto dopo essere preventivamente stato sottoposto a trattamento con appositi prodotti anticrittogamici che ne salvaguardino la sanità.

1.8 Caratterizzazione del materiale genetico

Parallelamente al lavoro di moltiplicazione conservativa è stata intrapresa un'attività di caratterizzazione morfo-fenologica dei genotipi disponibili, sulla stregua di quanto indicato dalle direttive del Progetto RGV/FAO. In primis sono stati individuati i necessari indicatori, considerando i principali caratteri descrittivi della specie. Dal 2010, quindi, sono state effettuate semine dedicate alla caratterizzazione in file opportunamente spaziate per facilitare i rilievi specifici. Il lavoro intrapreso ha già portato alla descrizione di un certo numero di linee di ricino (Tabelle 3 e 4).

Tabella 3 Caratteristiche fenologiche e biometriche e disponibilità in seme di linee di ricino.

Linee	Durata intervallo			Altezza fusto	Nodi	Peso 1000	Disponibilità seme
	semina-emergenza	semina-fioritura	semina-maturazione				
	(d)			(cm)	(n)	(g)	(g)
CNES1	21	81	141	90	12	-	12,30
HD 529	22	83	143	105	12	389,5	7,4
18/83	20	79	139	150	12	261,4	36,1
H22	24	84	144	150	15	314,7	10,7
1000Ca.ro.	25	86	146	145	11	574,2	23,5
H 22	20	78	138	145	10	274,9	50,6
DONSKAJA	20	77	137	115	12	297,1	42,8
SMARALD	20	79	139	100	10	233,3	15,8
HD 91.2	25	87	147	35	7	322,7	16,5
F.S.NOMEn.8	23	84	144	80	8	282,7	34,4
NOVISAD	23	83	143	125	7	482,1	15,3
IAC 226	22	82	142	135	14	383,3	16,1
NANO15/86	21	80	140	55	8	373,8	50
GUARANY	24	83	142	135	16	431,9	40,6
FS 1-4	29	91	150	150	9	390,9	13,6
HALE	24	83	142	90	7	410,2	110,6
PRONTO	26	88	148	125	9	407,5	39,6

Tabella 4 Caratteristiche morfologiche di linee di ricino.

Linee	Foglia			Fusto		Racemo	Habitus:
	dimensioni	colorazione antocianica	cera	colorazione antocianica	cera		
CNES1	grande	presente	assente	presente	assente	spinoso	dwarf
HD 529	piccola	presente	presente	presente	presente	spinoso	dwarf
18/83	media	presente	presente	assente	presente	spinoso	non dwarf
H22	piccola	presente	presente	presente	presente	spinoso	non dwarf
1000Ca.ro.	media	presente	assente	presente	assente	spinoso	non dwarf
H 22	media	assente	presente	assente	presente	spinoso	non dwarf
DONSKAJA	piccola	assente	presente	assente	presente	spinoso	non dwarf
SMARALD	piccola	assente	presente	assente	presente	spinoso	non dwarf
HD 91.2	media	presente	presente	presente	presente	spinoso	dwarf
F.S.NOMEn.8	media	presente	presente	presente	presente	spinoso	non dwarf
NOVISAD	media	assente	presente	assente	presente	spinoso	non dwarf
IAC 226	grande	presente	presente	presente	presente	spinoso	non dwarf
NANO15/86	media	assente	assente	assente	assente	spinoso	non dwarf
GUARANY	grande	presente	presente	presente	presente	spinoso	non dwarf
FS 1-4	grande	presente	assente	presente	assente	spinoso	non dwarf
HALE	grande	assente	presente	assente	presente	spinoso	dwarf
PRONTO	grande	assente	assente	assente	assente	spinoso	non dwarf

1.9 Bibliografia

- (1) Enciclopedia Agraria Italiana, Ramo editoriale degli agricoltori, Roma, 1980, 10, 456-460.
- Anonimo, 1964, Notice of release of CNES-1 castorbean to plant breeders, California Agricultural Experiment Station and USDA-ARS.
- Baracchi E., 1981 Il ricino. L'Informatore Agrario, 41, 17633-17636.
- Brigham R.D., 1961, TSP 10, a dwarf internode S-pistillate castorbean line for possible use in producing F₁, Hybrids, CR 62-61, USDA-ARS-CRD and Texas Agricultural Experiment Station.
- Claassen C.E., Hoffman A., 1950. The inheritance of the pistillate character in castors and its possible utilization in the production of commercial hybrids seed. Agronomy Journal, 42, 79-82.
- Fedeli A.M. e Laureti D., 1995. Il ricino: una coltura antica che si ripropone. L'Informatore Agrario ,LI (15), 39-43.
- Laureti D. 2002. Nuove Cultivar di ricino (*Ricinus communis* L.) ad internodo normale e corto Agroindustria, 3:159-163. presentato al XXXIII Convegno Annuale Societa' Italiana di Agronomia *Le colture "non alimentari"* Legnaro (PD) 20-23 Settembre 1999, 207-208.
- Laureti D., 1981, Prove di confronto fra cultivar di ricino, Sementi elette, 3,23-28.
- Laureti D., 1982, Nuove varietà e attuali tecniche colturali del ricino. Agricoltura Ricerca, 14, 47-49.
- Laureti D., 1983, Distanza tra le file e densità d'investimento, L'Informatore Agrario, 23, 26242-26244.
- Laureti D., 1983, Quota di alloincrocio nel ricino nell'Italia centrale. Atti convegno nazionale sulle piante oleaginose, Bari 29-30 novembre 1983, 387-394.
- Laureti D., 1987, Valutazione dell'attitudine generale alla combinazione in *Ricinus communis* L., Rivista di Agronomia 1,50-53.
- Laureti D., 1995. Genotype and genotype x environment interaction effects on yield and yield components in castor (*Ricinus communis* L.). Journal of Genetics & Breeding. 49,27-30.
- Laureti D., 1998. Characteristic of castor (*Ricinus communis*, L.) cultivars. 5th ESA Congress, Nitra, Slovacchia. 151-152.
- Laureti D., Marras, G., 1995. Irrigation of castor (*Ricinus communis* L.) in Italy. European Journal of Agronomy,4 (2) 229-235.
- Laureti D.1998. Ricino (*Ricinus communis*, L.). In Oleaginose non alimentari. Edagricole, 59-
- Marras G.F., La tecnica colturale del ricino. L'Informatore Agrario, 21, 71-73.
- Moshkin V.A.,1986. Castor. Oxonian press Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- Shifriss O., 1956, Sex instability in *Ricinus*, Genetics, 41, 265-280.
- Shifriss O., 1960, Conventional and unconventional systems controlling sex variations in *Ricinus*, Journal of Genetics,57,361-388.
- Shifriss O., 1973, The drooping syndrome of *Ricinus*, Journal of Heredity, 64, 351-355.
- Vannozi G.P., 1983, Le tecniche colturali adottate negli Stati Uniti, L'Informatore Agrario, 23, 26211-26212.
- Vannozi et al., 1982, Caratteristiche agronomiche e produttive di alcune cultivar di ricino di recente costituzione, Agricoltura Italiana n.1/2, 57-74.
- Vannozi et al., 1983, Obiettivi della ricerca per varietà ed ibridi adatti all'Italia, l'Informatore Agrario, 23, 26213-26216.
- Vannozi G.P. 1984. Ricino: la coltura e le sue prospettive. L'Italia Agricola, 121 n.1, 180-189.
- Venturi G., 1983, Molti pro giocano a favore del rilancio della coltura. Ci sarà un rilancio? L'Informatore Agrario 23, 26209-26210.
- Zimmerman L.H. e Parkey W., 1954. Pistillate F₁ castorbeans: their possible significance in producing commercial hybrid seed, Agronomy Journal, 46, 287.
- Zimmerman L.H. e Smith J. D., 1966, Production of F1 seed in castorbeans by use of sex genes sensitive to environment, Crop Science, 6,406-409.

COSTITUZIONE, MANTENIMENTO E VALORIZZAZIONE DI UNA COLLEZIONE DI LINEE DI GIRASOLE (*HELIANTHUS ANNUUS L.*)*

Responsabile Scientifico: Dr. Andrea Del Gatto

CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali,
Via Cagiata, 90 – 60027 Osimo (AN)

Riassunto

Dopo alcuni cenni sulla classificazione botanica del girasole, vengono illustrate le principali caratteristiche morfologiche e biologiche della specie, nonché le essenziali esigenze ambientali. La scoperta del carattere che determina alte concentrazioni di acido oleico nell'olio ha portato alla individuazione di due tipi distinti in base alla composizione in acidi grassi dell'olio: quelli con alto contenuto di acido linoleico (43-61%) e quelli ad alto contenuto di acido oleico (> 80%); il lavoro di breeding si è perciò indirizzato in due filoni principali ad essi dedicati. L'attività di selezione di linee inbred e la costituzione di combinazioni ibride è iniziato a partire da popolazioni derivate da varietà di origine russa (Vniimk, Peredovik, Cerneanka), nel primo caso, da una popolazione F₃ fornita dall'Istituto de Agricultura Sostenible di Cordoba (Spagna), nel secondo. In entrambi i casi annualmente sono state costituite numerose decine di popolazioni F₂, estratte da ibridi commerciali, utilizzate per la selezione di nuove linee maschiosterili (A), mantenitrici (B) e ristoratrici (R). Successivamente si è effettuato lo studio dell'attitudine generale e specifica alla combinazione (AGC e ASC) delle linee costituite dalla Sezione, per scegliere tester da utilizzare in successivi programmi di selezione, oltre a verificare il valore intrinseco degli ibridi. Dieci di questi, di cui uno alto oleico, sono stati iscritti nel Registro nazionale delle varietà. Attualmente è in atto, anche grazie al finanziamento del Progetto RGV/FAO un processo di mantenimento e progressivo svecchiamento del materiale posseduto, in modo da recuperare l'energia germinativa del seme ed un lavoro di caratterizzazione secondo i criteri dettati dallo stesso progetto.

Summary

After a brief description of the botanical classification of sunflower, the main morphological and biological trait, as well as climatic requirements of the species are highlighted. The discovery of the character capable of controlling the expression of high concentrations of oleic acid in the lipid fraction of seeds has allowed the spotting of two different kinds basing on the fatty acid composition in the lipid fraction: those with high linoleic acid content (43-61%) and those with high oleic acid content (> 80%); the breeding was therefore addressed in two main areas dedicated to them. The inbred lines selection activity and the formation of hybrid combinations started, in the first case, from populations derived from Russian varieties (Vniimk, Peredovik, Cerneanka), and from a F₃ population provided by de Agricultura Sostenible Institute of Cordoba (Spain) in the second case. Both cases have annually seen the formation of many dozens of F₂ populations, extracted from commercial hybrids and used for the selection of new male-sterile (A), maintainer (B), restorer (R) lines. Afterwards the general and specific attitude to the combination (AGC and ASC) of the lines formed by the Section has been studied, in order to choose testers for following selection programs, other than verify the hybrids' intrinsic value. Ten of these, one of which is high oleic, have been registered in the national Register of varieties. Currently, also thanks to the Project RGV/FAO financing, a process of maintaining and progressive renewal of the possessed material is in operation, in order to recover the basal energy of the seed and, along with a description work according to the project's criteria.

Parole chiave: Attitudine generale e specifica alla combinazione (AGC e ASC), linea inbred, maschiosterile (A), mantentore (B), ristoratore (R), contenuto di olio, acido grasso, alto oleico

Keywords: General and specific combining abilities (GCA and SCA), inbred line, male sterile (A), maintainer (B), restorer (R), oil content, fatty acid, high oleic

* doi:10.4458/0986-50

1.1 Inquadramento botanico, morfologia e biologia

Il girasole (*Helianthus annuus* L.) è una dicotiledone appartenente alla famiglia delle Compositae, subfamiglia delle Tubuliflorae, tribù delle Heliantheae. Il nome generico (*Helianthus*) deriva da due parole greche "helios" (sole) e "anthos" (fiore) in riferimento all'eliotropismo tipico di questa pianta. Il nome specifico (*annuus*) indica il tipo di ciclo biologico (annuale). Presenta un apparato radicale fittonante, con numerose radici laterali fibrose e robuste, capace di espandersi fino a 2 m di profondità (la maggior parte è sviluppato nei primi 45 cm). Il fusto, solitamente non ramificato, costituito da 10-15 nodi, ha portamento eretto e presenta un'altezza variabile, in relazione al genotipo e alle condizioni colturali, normalmente compresa fra 1,5-2,5 m. Le foglie, di colore verde glauco, in numero variabile, sono semplici, munite di un lungo picciolo, cordate od ovate, acute, dentate. La loro emissione si arresta quando alla base del verticillo fogliare terminale compare il bottone fiorale (1-2 cm di diametro), in guisa di una struttura a forma di stella, che, con il procedere dell'accrescimento, aumenta di dimensioni allontanandosi progressivamente dal piano delle ultime foglie e mantenendo una posizione orizzontale. L'infiorescenza terminale, unica, è un capolino ("calatide") costituito da un ricettacolo disciforme circondato da una doppia o plurima serie di brattee; porta da 1500 a 3000 fiori, di cui quelli periferici, sterili (60-80) sono muniti di una grande ligula gialla (Fig 1).

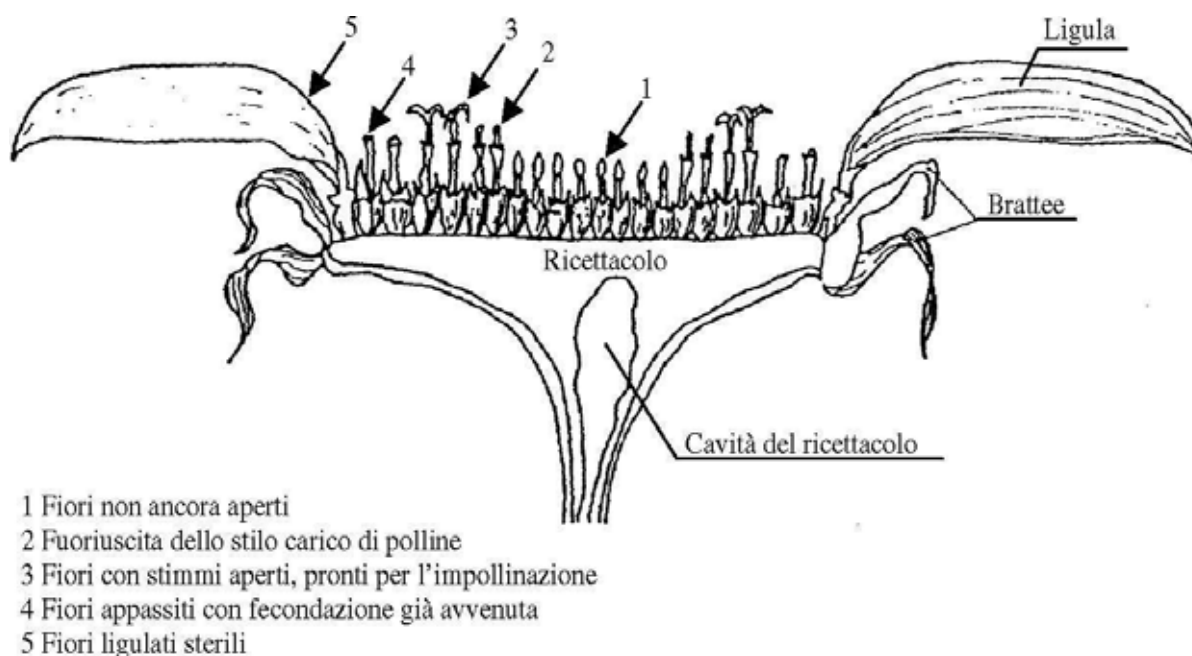


Figura 1 Sezione schematica del capolino del girasole (da Bonciarelli, 1987).

Negli altri fiori l'emissione degli stili carichi di polline e la recettività degli stimmi si realizzano scalaramente, procedendo dai fiori più esterni verso quelli posti al centro del disco. Per questi, pertanto, essendo gli ultimi ad essere fecondati, è possibile che le successive fasi di allegazione e di formazione degli acheni avvengano in condizioni di accentuato stress idrico, termico e di competizione con i frutti già in via di sviluppo. Di conseguenza molti fiori posti al centro del capolino potrebbero non allegare, dando luogo ad una zona centrale priva di acheni utili. Tale area improduttiva (impropriamente detta "sterile") può essere più o meno ampia in dipendenza della intensità delle condizioni ambientali avverse e della varietà. La fecondazione è allogama (fecondazione incrociata entomofila, anemofila) e porta alla formazione di un frutto (achenio) di forma allungata, romboidale, contenente il seme, di colore variabile (grigio scuro, bruno-nerastro, con striature bianche o bianco-argentee). Allo stadio di maturazione fisiologica il dorso del capolino è di colore giallo-bruno, gran parte delle foglie sono secche, il tasso di umidità degli acheni è superiore al 35%. Successivamente la perdita di acqua dei tessuti del capolino e degli acheni è molto rapida, e può procedere al ritmo di 2 punti percentuali al

giorno. Il seme: costituisce il 70-75% del peso dell'achenio. Esso contiene il 50-65 % di olio con varia composizione acidica (40-50% nell'intero achenio) e il 24-35 % di proteine.

1.2 Origine e diffusione della specie

Si ritiene che la specie abbia avuto origine in Centro America e si sia diffusa in epoche remote nei territori attualmente facenti parte dell'Arizona e del Nuovo Messico, estendendosi poi verso le aree settentrionali degli attuali Stati Uniti. Nel 1510 una spedizione spagnola riportò alcuni acheni dal Nuovo Messico che vennero seminati in un orto botanico di Madrid; dalla Spagna il girasole si sarebbe poi diffuso rapidamente in Europa come pianta ornamentale. Sul finire del '700, in Russia, venne riconosciuta la sua importanza per la produzione di olio alimentare, ma solo nel 1830 iniziò l'estrazione di olio su scala industriale e, con essa, la veloce espansione su scala mondiale. Nell'ultimo decennio la produzione di semi di girasole è quasi decuplicata; in Europa il grosso della produzione si concentra in Francia (un milione e mezzo di tonnellate) e Ungheria (ottocentocinquantamila tonnellate). Seguono la Spagna e, a distanza, l'Italia, dove la coltura, estesa nel 1970 solamente su 4.000 ettari, ha trovato un ottimo areale di diffusione con produzioni sufficientemente costanti da un anno all'altro, raggiungendo, nel 1990, i 148.000 ettari. Nonostante la sfavorevole situazione congiunturale degli ultimi anni e le mutevoli condizioni innescate dalla politica agricola comunitaria, la superficie investita a girasole si è attestata nelle ultime due campagne sopra i 120.000 ettari, con un concentrazione in tre regioni, Umbria, Marche e Toscana (Frascarelli, 2011). Negli ultimi anni dello scorso secolo, le favorevoli condizioni allo sviluppo del girasole avevano incrementato notevolmente il numero delle cultivar immesse nella rete di commercializzazione; tale tendenza non si è invertita, tanto che alle 583 varietà già censite nel 2010 se ne annoveravano altre 157 proposte per l'iscrizione al Registro Nazionale, 93 delle quali per il primo anno di valutazione e 64 per il secondo (MIPAAF, S.I.A.N., 2010). La notevole gamma di genotipi che vivacizza il ritmo del ricambio varietale (Monotti *et al.*, 2001), però, risulta prevalentemente di provenienza estera, selezionata quindi per ambienti a profilo climatico diverso dai comprensori nei quali è diffusa la coltura in Italia (Pirani e Del Gatto, 1995; Monotti *et al.*, 2004).

1.3 Esigenze ambientali

Pianta originaria dei climi temperati ha esigenze termiche modeste, intermedie tra barbabietola da zucchero e mais. Presenta uno "zero di vegetazione" di circa 0 °C e allo stadio di plantula resiste senza danno a temperature di alcuni gradi sotto lo zero; è adatta ad essere coltivata in ciclo autunno-primaverile. Può germinare a temperature molto basse, ma per evitare di incorrere in nascite scalari e lente si può asserire che nasca accettabilmente bene quando il terreno, alla profondità di semina, abbia raggiunto i 10°C. Molto adattabile a diversi terreni (sani sotto l'aspetto idraulico) rifugge da quelli acidi ($6 < \text{pH} < 8$); l'unica vera esigenza è che il terreno sia profondo e con buona ritenzione idrica. Il girasole non è particolarmente aridoresistente né possiede consumi idrici unitari più bassi di altre specie; è però in grado di produrre discretamente quando altre vengono danneggiate dalla deficienza idrica. Il suo massimo fabbisogno idrico è compreso tra i 20 giorni precedenti la fioritura ai 25 giorni dopo; anticiparne la semina significa traslare le fasi maggiormente sensibili allo stress idrico (formazione e riempimento degli acheni) prima che la stagione divenga particolarmente secca.

1.4 Destinazione d'uso

Fin dalla sua introduzione in Europa l'oleaginosa è stata sempre coltivata come pianta a prevalente destinazione alimentare, sia animale che umana, per l'utilizzo diretto dell'achenio, adoperato come mangime per uccelli e roditori, o venduto, preventivamente tostato, come snack o impiegato nell'arricchimento di insalate, o dell'olio ottenuto dalla sua spremitura e destinato alla costituzione di condimenti, da solo o in miscela con altre frazioni oleose, o in friggitoria. La scoperta del carattere che controlla l'espressione di elevate concentrazioni di acido oleico nella frazione lipidica, indotto per mutazione (Soldatov, 1976) e la selezione di varietà dotate di tale caratteristica, ha aperto a questa coltura una nuova frontiera nei possibili impieghi, sia in campo alimentare umano (food), che animale (feed), che industriale (non

food), (Del Gatto e Laureti, 2006), portando alla individuazione di due tipi distinti in base alla composizione dell'olio in acidi grassi:

- tipi ad alto contenuto di acido linoleico (convenzionali) (43-61%);
- tipi ad alto contenuto di acido oleico (> 80%).

1.5.1 Reperimento materiale genetico

Il materiale di partenza per il lavoro di selezione, miglioramento e conservazione eseguito presso la struttura di Osimo risale ai primi anni '80 del secolo scorso, quando furono reperite delle popolazioni derivanti da varietà di origine russa del tipo Vniimk, Peredovik, Cerneanka. Il lavoro di autofecondazione e selezione portò alla costituzione di alcune popolazioni di base omogenee da cui poter estrarre linee inbred in grado di dare vita a combinazioni ibride adatte all'ambiente italiano in grado di migliorare le rese nei comprensori elianticoli tradizionali e permettere l'estensione della coltivazione della composita in altri. Uno dei modi per incrementare nelle nuove costituzioni varietali il valore genotipico ed economico di un carattere desiderato, infatti, è quello di impiegare linee inbred per la preparazione di ibridi che esprimano eterosi per la capacità produttiva (Barcaccia *et al.*, 2006; Kovačik e Škaloud, 1972; Putt, 1965): tale fenomeno può favorire, in alcuni casi, un incremento produttivo superiore anche al 30% rispetto alla popolazione varietale di base (Fick, 1975). Furono perciò selezionate linee impollinanti maintainer (B) dotate delle omologhe maschiosterili citoplasmatiche (A) e altre dotate dei geni per la ristorazione della fertilità pollinica (R). A partire dal 1996 annualmente sono state costituite numerose decine di popolazioni F₂, estratte da ibridi commerciali, utilizzate per la selezione di nuove linee R, B ed A. L'impiego di tale materiale, oltre che fornire una sorgente di variabilità genetica relativamente economica, offre il vantaggio del compendio degli sforzi di selezione di precedenti breeders e, quindi, necessita di un lavoro inferiore di quello che occorrerebbe per ottenere risultati da razze selvatiche (Laureti e Del Gatto, 2001a). Un'opportuna sperimentazione ha confermato l'utilità di selezionare linee da popolazioni ottenute dagli ibridi migliori, nonché la necessità di approfondire ulteriormente la ricerca di appropriati combinatori per quelle derivanti da varietà molto produttive, ma che non avevano fornito apprezzabili performance nelle prime combinazioni utilizzate. Il lavoro successivo ha permesso di evidenziare due partner idonei (CMS 243 e CMS 150/9-17) fra i trentatré a disposizione, per una popolazione di ottima provenienza, che non aveva prodotto test-cross altrettanto buoni con le migliori linee A a larga AGC (Laureti e Del Gatto, 2002; 2004).

1.5.2 Valutazione e studio del materiale in selezione

Poiché di per se il comportamento produttivo delle linee parentali degli ibridi non è un indicatore attendibile della loro idoneità alla costituzione di combinazioni performanti (Ortegon Morales *et al.*, 1992) è necessario affrontare preventivamente lo studio dell'attitudine combinatoria delle stesse (Miller e Fick, 1997; Serieys, 1992, 1994) e ottenere materiale idoneo in maniera più mirata e veloce. L'attività è essenzialmente consistita nello studio dell'attitudine generale e specifica alla combinazione (AGC e ASC) delle linee costituite dalla Sezione, per scegliere tester da utilizzare in successivi programmi di selezione, oltre a verificare il valore intrinseco degli ibridi sperimentali (Laureti e Del Gatto, 2001b). Sono state evidenziate alcune linee dotate di elevata AGC sia R che A, che sono state utilizzate per la produzione, ogni anno, con il materiale via via in selezione, di centinaia di test-cross che, dopo una valutazione preliminare in parcelle ridotte, in asciutto ed in irriguo, sono stati inseriti in un programma di sperimentazione pluriennale in due località (Osimo-AN e Budrio-BO), utilizzando parcelle più grandi, in tre ripetizioni, per la riconferma del loro valore agronomico [FOTO 1]. Alcuni genotipi hanno evidenziato performance produttive non diverse statisticamente da quelle dei migliori testimoni commerciali, scelti da una graduatoria redatta nell'ambito di una rete di prove nazionali, allestita annualmente nelle principali aree elianticole italiane, alla quale partecipa la Sezione di Osimo, facendosi apprezzare, inoltre, per la durata del ciclo biologico, inferiore a quello delle cultivar di confronto, dimostrando peculiarità in grado di soddisfare più esigenze di pianificazione colturale (Laureti *et al.*, 1997; Laureti e Del Gatto, 1998; Del Gatto e Laureti, 1998; Laureti e Del Gatto, 2000; Del Gatto e Laureti, 2002).



Foto 1 Panoramica di una prova agronomica presso il CRA-CIN di Osimo

1.5.3 Valorizzazione del materiale genetico

La sperimentazione dell'ultimo decennio del secolo scorso ha evidenziato ibridi competitivi con i migliori commerciali, che possiedono peculiarità in grado di farli apprezzare nella valorizzazione dei diversi areali ed ordinamenti produttivi, soddisfacendo più esigenze di pianificazione colturale. Nove di questi, in diversi anni, sono stati proposti per la iscrizione al Registro nazionale e hanno superato positivamente le prove previste (Tab 1).

Tabella 1 Ibridi di girasole iscritti al Registro nazionale

NOME	REGISTRAZIONE	DESCRIZIONE
Ausonia	D.M. del 20/03/1995 G. U. n. 73 del 28/03/1995	Ibrido derivante da linee selezionate in ambiente italiano, presenta una debole colorazione antocianica dell'ipocotile, foglie cordiformi a dentellatura regolare, capolino di diametro medio, inclinato a maturità. Dotato di discrete capacità produttive, si fa apprezzare per lo sviluppo contenuto e la brevità del ciclo vegetativo
Esperia	D.M. del 20/03/1995 G. U. n. 73 del 28/03/1995	Genotipo frutto, come il precedente, del lavoro di selezione intrapreso nell'ambito del Progetto di ricerca sulle oleaginose del Ministero dell'Agricoltura e Foreste, presenta, rispetto a questo, un più lungo sottoperiodo fioritura-raccolta, una taglia leggermente più ridotta ed un superiore tenore d'olio negli acheni
Kappa	D.M. del 06/03/1996 G. U. n. 68 del 21/03/1996	Derivante dall'incrocio tra una linea maschiosterile (CMS) selezionata da una popolazione sintetica ed un ristoratore della fertilità pollinica (RHA) selezionato

		dall'I.S.C.I., di vigoria accentuata, raggiunge dimensioni notevoli, ma, grazie alla robustezza del fusto e alla buona capacità di ancoraggio, non presenta problemi di allettamento né di stroncamento. Le foglie, di dimensioni e numero medio, presentano una leggera lucentezza della lamina ed una bollosità molto debole o assente. La calatide, di forma convessa, che a maturità assume un portamento semi-inverso, può raggiungere dimensioni notevoli con una ridotta area sterile. Alle notevoli capacità produttive unisce un elevato contenuto di olio negli acheni
Sigma	D.M. del 06/03/1996 G. U. n. 68 del 21/03/1996	La varietà ha avuto origine dall'incrocio tra una linea maschiosterile derivata da una popolazione a libera impollinazione (Cernianka) ed un ristoratore selezionato nell'ambito istituzionale. Estremamente vigorosa, di taglia alta, presenta un ciclo colturale leggermente più breve della costituzione precedente, per un'inferiore durata del sottoperiodo fioritura-maturazione. E' ottima produttrice di acheni, dal prevalente colore grigio striato, con un tenore di olio leggermente inferiore a quello di Kappa
Tea	D.M. del 06/03/1996 G. U. n. 68 del 21/03/1996	Varietà a ciclo breve, presenta una accentuata precocità di fioritura, cui fa seguito un sottoperiodo fioritura-maturazione fra i più lunghi fra quelli dei rispettivi ibridi appartenenti alla stessa classe di precocità, che permette un lungo periodo di accumulo e la possibilità di sfruttare al meglio le disponibilità idriche dell'ambiente di coltivazione, anche se scarse, e fornire produzioni interessanti
Mito	D.M. del 06/03/1996 G. U. n. 68 del 21/03/1996	L'ibrido è caratterizzato da ottima uniformità, taglia media, fusto molto robusto. Le foglie, ben sviluppate, si presentano via via meno ampie nella porzione apicale. La pianta presenta ottima resistenza allo stroncamento e all'allettamento. L'apparato radicale, ben sviluppato, è in grado di approfondirsi notevolmente. La calatide, di buon diametro, presenta gli acheni serrati in ranghi molto compatti. Il loro contenuto in olio è prossimo al 50%. La pianta, che presenta un ciclo medio con una accentuata precocità di fioritura, permette di ottenere buone produzioni anche in ambienti pedoclimaticamente difficili (zone ventose, siccitose o con scarsa fertilità). L'ibrido è stato commercializzato dalla ditta Deltaseed dal 1999
Gamma	D.M. del 06/03/1996 G. U. n. 68 del 21/03/1996	Ibrido caratterizzato da un ottimo sviluppo vegetativo con produzione di una gran massa fogliare: le foglie presentano un'ampia superficie laminare anche nella porzione apicale. Il fusto, molto robusto, presenta un'ottima resistenza allo stroncamento ed all'allettamento, grazie anche al buon ancoraggio fornito da un apparato radicale molto sviluppato, nonostante la pianta, data la sua vigoria, presenti una taglia medio-alta. La calatide, di buone dimensioni, presenta gli acheni disposti in ranghi molto compatti ed una ridotta area sterile centrale. Il contenuto in

		olio degli acheni, superiore al 50%, consente a Gamma di ottenere interessanti produzioni oleiche ettariali. L'ibrido è stato commercializzato dalla ditta Deltaseed dal 1999
Elly	D.M. del 06/03/1996 G. U. n. 68 del 21/03/1996	La varietà ha avuto origine dall'incrocio fra una linea maschiosterile, derivata da una pianta liberamente impollinata, autofecondata ed incrociata con un CMS ed un ristoratore della fertilità pollinica selezionato per resistenza alla peronospora da autofecondazione di ibridi commerciali. Di taglia medio-alta, presenta una calatide regolare, non inclinata a maturità, con buona fertilità, un'epoca di fioritura media ed un ciclo medio-precoce. Si distingue per l'elevato tenore d'olio degli acheni. Le caratteristiche vegetative, la lunghezza del ciclo biologico, l'ottimo apparato radicale gli consentono una buona produttività, una buona resistenza allo stress idrico ed un'ottima stabilità di produzione
Lapo	D.M. del 06/03/1996 G. U. n. 68 del 21/03/1996	Originato dall'incrocio fra una linea maschiosterile, derivata da una pianta liberamente impollinata, autofecondata ed incrociata con un CMS ed un RHA della fertilità pollinica selezionato per resistenza alla peronospora da autofecondazione di ibridi commerciali, è caratterizzato da un ciclo medio-precoce, foglie apicali ampie e rade, capolino regolare a portamento inverso, alla maturazione. Di taglia medio-alta, fornisce discrete produzioni in acheni ed olio

1.6.1 Reperimento materiale genetico alto oleico (AO)

Nel 1997 è stato intrapreso un processo di selezione di varietà alto oleico a partire da popolazioni F₃ fornite dall'Istituto de Agricultura Sostenible di Cordoba (Spagna) e da popolazioni F₂ di ibridi commerciali. Inoltre, prendendo come materiale di partenza i genotipi convenzionali precedentemente selezionati, nel 1998 è stato intrapreso un lavoro di trasferimento del carattere alto oleico in sei linee B ed altrettante R, convenzionali, di cui già era stata associata la buona attitudine generale alla combinazione. Nel 2002 si è intrapreso un lavoro di costituzione di popolazioni maintainer alto oleico dall'incrocio fra tre linee B con tale caratteristica, 27/4-1, 27/6-1 e 47/6-6 precedentemente selezionate, utilizzandole come portaseme previa castratura manuale, e due ibridi scelti fra i più produttivi di una graduatoria stilata nell'ambito di una rete di prove di valutazione varietale a cui partecipa annualmente l'Unità di Osimo. A partire dal 2003 si è proceduto all'estrazione di popolazioni F₂ da ibridi commerciali alto oleico con buone performance produttive. Buona parte del lavoro è stato svolto nell'ambito dell'attività ordinaria e del progetto straordinario "Tecniche Innovative Sostenibili di produzione e trasformazione delle colture Energetiche e Non food" (TISEN) finanziato dal MiPAAF.

1.6.2 Valutazione e studio del materiale AO in selezione

Il materiale fornito dal Prof. Fernandez Martinez è stato assoggettato ad una verifica preliminare per il contenuto in acido C 18:1, in base a rifrattometria. Successivamente è stato sottoposto ad un test per il riscontro della resistenza alla peronospora (*Plasmopara helianthi* Novot.), notoriamente considerata una tra le più diffuse e pericolose malattie per il girasole (Vranceanu, 1977). I semi da testare sono stati posti a germinare e, raggiunta la nuova radichetta i 5 mm di lunghezza, i germi sono stati immersi per almeno due ore in una sospensione di zoosporangi, prelevati da piante malate, per provocarne l'infezione. Trapiantate

in vaso, le piccole plantule sono state lasciate crescere fino all'emissione di due foglie vere, quando si è effettuata la valutazione della comparsa della malattia. Questo lavoro ha portato all'individuazione di 58 linee impollinanti maintainer (B) e 43 restorer (R) che sono state valutate per attitudine combinatoria con un tester comune ad elevata AGC: le migliori linee B sono state avviate ad un programma di reincrocio per la costituzione delle rispettive linee maschiosterili citoplasmatiche, che sono state impiegate per la produzione di ibridi sperimentali che, dopo una valutazione preliminare in parcelle ridotte, in asciutto ed in irriguo, sono stati inseriti in un programma di sperimentazione pluriennale in due località (Osimo-AN e Budrio-BO), utilizzando parcelle più grandi, in tre ripetizioni, per la riconferma del loro valore agronomico. I ristoratori sono stati valutati ulteriormente con un altro tester, questa volta alto oleico. Ciò ha permesso di individuare buoni individui con combinazioni specifiche interessanti (Laureti e Del Gatto, 2001c, Del Gatto e Laureti 2001a, 2001b). Il lavoro di introduzione del carattere alto oleico in linee precedentemente selezionate ha comportato numerosi cicli di castrazione, reincrocio e progeny test con l'ausilio gascromatografico per la verifica della presenza del carattere alto oleico che hanno permesso di ottenere linee maintainer dotate di questo carattere sulle quali, successivamente, si è operato per l'ottenimento del corrispondente maschiosterile. Nello stesso ambito è stata effettuata la selezione di omozigoti per il controllo del carattere alto oleico in linee ristoratrici e maintainer selezionate da due popolazioni alto oleico, già costituite da germoplasma spagnolo, e altre ristoratrici, ottenute da ibridi commerciali molto produttivi. I vari cicli di autofecondazione e selezione con relative prove di progenie per il controllo del carattere alto oleico con la tecnica del mezzo seme hanno portato all'individuazione di tredici linee ristoratrici e cinque maintainer omozigoti per il carattere desiderato (Del Gatto e Laureti, 2006). Su tutti gli individui selezionati è stata effettuata la valutazione dell'AGC e ASC. Dall'analisi "line x tester" con il metodo sviluppato da Kempthorne (1957) e applicato da Singh e Chaudhary ne sono state individuate alcune idonee alla costituzione di valide combinazioni ibride e all'impiego come tester in future valutazioni (Del Gatto e Laureti, 2005a; Del Gatto et al., 2005; 2005b). Va aggiunto che per ottenere più cicli riproduttivi del girasole nello stesso anno, procedimento utile nell'accelerazione di alcuni passaggi del processo di miglioramento che, magari, comporterebbero un impegno di almeno 4 o 5 generazioni nelle quali non sono vincolanti le performance ottenute per il processo selettivo (per esempio, l'aumento dell'omozigosi attraverso l'autofecondazione o il reincrocio senza valutazione del comportamento del genotipo in funzione dell'ambiente) si è messa a punto una metodologia con cui è stato possibile realizzare due generazioni di girasole nello stesso anno, con produzioni che, seppure contenute, possono comunque considerarsi idonee per i fini del miglioramento genetico -tenendo presente che lo scopo della pratica non è quello di ottenere una produzione quali-quantitativamente comparabile a quella ordinaria ed economicamente valida, ma solo l'avanzamento generazionale del materiale- fornendo, grazie alla semplicità ed economicità del metodo, un valido strumento per accelerare i programmi di breeding (Laureti e Del Gatto, 2003; Del Gatto e Laureti, 2004).

1.6.3 Valorizzazione del materiale genetico AO

Le linee rilasciate negli anni sono state utilizzate per la produzione di centinaia di combinazioni ibride sperimentali che, dopo una valutazione preliminare in loco (Del Gatto, 2006), sono state inserite in un programma di sperimentazioni in diverse località (es. in Tab 2) per la conferma del loro valore agronomico (Del Gatto e Laureti, 2005b).

Tabella 2 Caratteri fenologici, biometrici e produttivi nelle prove effettuate a Budrio (BO) e Osimo (AN) nel 2004.

Ibrido	Semina- fioritura	Semina- Maturazione	Altezza (cm)	Peso 1000acheni (g)	Produzione acheni (q ha ⁻¹)		Contenuto olio s.s. (%)		Produzione olio s.s. (q ha ⁻¹)											
					Osimo	Budrio	Osimo	Budrio	Osimo	Budrio										
Sanbro	81	l	141	m	166	eg	58,4	be	38,7	dl	40,7	dg	44,7	w	52,8	fn	15,8	lq	19,5	bf
Gloriasol	85	g	149	hl	165	eg	43,9	hi	26,8	tu	34,5	mq	51,2	iq	56,0	af	12,5	uv	17,6	el
Isar	82	i	138	m	150	hi	64,1	ab	31,7	qs	32,9	ps	49,5	ou	55,8	af	14,3	pu	16,7	io
Tenor*	84	h	152	eh	144	hi	54,8	ef	31,6	qs	32,9	ps	45,7	vw	52,2	go	13,1	su	15,6	lr
Marko*	88	d	160	a	159	fg	48,2	gh	29,3	su	39,2	di	51,9	gp	54,0	ci	13,8	qu	19,3	cg
Trisum 860*	86	f	147	il	159	fg	63,2	ac	32,7	ps	44,9	bc	45,6	w	52,2	go	13,5	ru	21,4	ac
Crono	90	b	155	bf	174	de	52,0	fg	33,9	nr	40,8	dg	48,3	qv	51,3	hq	14,9	nt	19,0	dh
Argo	90	b	159	ab	169	df	41,3	i	33,5	or	37,5	fn	47,6	rw	50,3	ms	14,5	pu	17,2	gm
Tirso	88	d	151	fi	174	de	51,6	fg	32,7	ps	41,5	ce	53,0	fm	57,3	ab	15,8	lq	21,6	ab
181/5-12 x 434-6-1	89	c	158	ac	212	ab	64,7	ab	36,3	ip	50,8	a	47,4	sw	48,9	pv	15,7	lq	22,6	a
181/5-34 x 434-6-1	88	d	157	ad	217	ab	54,3	eg	29,5	su	40,5	dh	47,5	rw	49,7	nt	12,8	tu	18,3	ei
OL9 x 1-12-1	87	e	150	gl	159	fg	43,3	hi	26,2	u	33,3	or	44,5	w	47,4	sw	10,6	v	14,4	pu
47/6-6 x XF 4735	86	f	155	bf	172	de	62,1	bc	36,3	ip	40,8	dg	50,4	ms	54,5	bh	16,7	io	20,3	be
47/6-6 x XF 4815	86	f	156	ae	166	eg	62,6	ac	33,3	or	41,6	ce	49,7	nt	53,7	dl	15,1	ms	20,3	be
47/6-6 x 11-1-1-1	87	e	153	dh	177	de	57,7	cf	34,4	mq	37,9	em	46,9	tw	57,2	ac	14,7	ot	19,7	bf
47/6-6 x 11-1-2-1	88	d	146	l	179	cd	53,2	g	30,5	rt	41,1	cf	51,6	hp	56,9	ad	14,3	pu	21,3	ac
47/6-6 x Oleik.3-3-3	85	g	154	cg	175	de	63,0	ac	36,0	ip	37,0	go	48,3	qv	56,6	ae	15,8	lq	19,1	dh
47/6-6 x Oleik.3-4-2	86	f	152	eh	170	df	61,7	bc	35,8	ip	33,4	or	52,0	gp	55,1	bg	17,0	hn	16,7	io
27/4-1 x 434/6-1-1	91	a	153	dh	225	a	64,3	ab	36,5	ip	36,8	ho	49,4	ou	50,7	lr	16,4	ip	17,0	hn
27/4-1 x 280/4-1-1	87	e	153	dh	190	c	68,5	a	35,1	lq	46,0	b	46,4	uw	49,6	nu	14,8	ot	20,8	ad
2849 x Oleik.3-4-2	87	e	154	cg	156	gh	55,0	ef	33,2	or	36,3	ip	46,7	tw	52,4	go	14,1	qu	17,3	gl
OL9 x 11-2-4-2	90	b	152	eh	174	de	48,2	gh	33,2	or	36,1	ip	55,1	bg	58,6	a	16,7	io	19,3	cg
OL9 x Oleik.2-1-1	88	d	150	gl	142	i	52,4	eg	33,6	or	41,9	cd	51,6	hp	53,5	em	15,8	lq	20,4	be
Media	87		152		173		56,0		36,1		36,1		51,1		51,1		16,8		16,8	

In neretto i testimoni ibridi commerciali; con l'asterisco quelli alto oleico

A lettere differenti corrispondono valori medi statisticamente diversi secondo il test della DMS per $P \leq 0,05$

Una di queste, proposta per l'iscrizione al Registro nazionale come ibrido alto oleico, ha ottenuto la registrazione nel 2004 (Tab 3).

Tabella 3 Ibridi di girasole AO iscritti al Registro nazionale

NOME	REGISTRAZIONE	DESCRIZIONE
Crono	D.M. del 17/03/2004 G. U. n. 76 del 31/03/2004	L'ibrido, ad alto contenuto di acido oleico nella frazione lipidica, deriva dall'incrocio fra una linea RHA dotata dello stesso carattere, selezionato dall'I.S.C.I nell'ambiente marchigiano, ed il CMS 89 (versione alto oleica del HA 89). Dotato di ciclo colturale medio-tardivo e di una notevole vigoria, presenta, nonostante una taglia medio-alta, una buona resistenza all'allettamento e allo stroncamento, grazie alla robustezza del fusto. Unisce ad un elevato e stabile contenuto di acido oleico, un ottimo tenore d'olio negli acheni. L'elevata produttività gli permette di competere efficacemente con le più diffuse varietà convenzionali (alto linoleico). Per le peculiarità e la discreta stabilità produttiva, Crono può essere considerato idoneo alla coltivazione nelle più vaste aree elianticole italiane

Linee maschiosterili e ristoratrici vengono utilizzate annualmente per la costituzione di combinazioni ibride sperimentali anche con materiale fornito da altre istituzioni che vengono costantemente valutate in prove agronomiche in asciutto o con l'ausilio irriguo, spesso in esperienze comuni (es. in Tab 4).

Tabella 4 Caratteri fenologici e morfologici, produzione d'acheni e olio e relativo contenuto delle prove effettuate ad Osimo (AN) nel 2011

Tesi	Durata periodo:				Altezza piante (cm)	Calatide:		Prod. acheni al 9% di umidità (q/ha)	Peso 1000 (g)	Olio s.s.:										
	sem.-fiorit.		fiorit.-mat			superficie (cm ²)	fertilità (%)			contenuto (%)	produzione (q/ha)									
	(d)																			
226 Ao x Dolia 2-45B	75	ad	53	f	128	jk	182	gj	224	af	92	bi	5,6	ae	27,3	fi	53,6	kl	47,9	be
226 Ao x Dolia 2-45 Az	74	a	48	cf	123	cg	163	ab	246	df	92	bi	5,5	ae	25,6	hj	42,9	ag	46,0	dj
226 Ao x Aurore II 5-4 AR	76	ae	49	df	125	dk	177	di	221	ae	91	ae	5,4	be	23,4	jk	43,5	bh	44,8	gk
226 Ao x Aurore II 5-4 Az	77	cf	47	ae	123	ch	160	a	224	af	91	af	5,5	ae	26,9	gj	45,3	ci	48,4	ad
226 Ao x Aurore II 5-4 B	75	ad	50	ef	125	dk	165	ad	196	ab	90	a	5,7	ac	23,9	ik	43,1	ag	47,4	cg
226 Ao x PROLEIC 204 Ao	76	ae	45	ad	120	ac	163	ac	212	ad	91	af	5,1	de	21,1	k	41,6	ad	44,1	ik
181/5-12 x 434/6-1-1 Ao	80	h	48	cf	128	k	210	k	210	ad	91	ae	5,7	ad	31,3	bd	48,9	hk	43,9	ik
181/5-12 x Blumix 1-1	79	gh	48	be	127	hk	183	hj	207	ac	90	ad	5,6	ad	29,5	bg	39,5	ab	46,5	ci
181/5-12 x Dolia 2-45 β	74	a	48	be	122	be	192	j	231	af	93	ej	5,9	ab	29,3	bg	44,6	bh	41,9	kl
181/5-12 x XF 4815 Ao	75	ac	47	ae	122	ad	190	ij	224	af	94	ik	5,7	ac	31,7	ac	48,4	gk	45,0	ej
47/6-6 Ao x 11 1-1-1 Ao	76	bf	44	ac	120	ac	166	ae	231	af	91	ag	5,1	de	24,8	hk	42,2	af	47,6	cg
47/6-6 Ao x Oleik 3-3-3 Ao	75	ac	44	ab	119	ab	179	fi	239	cf	93	hk	5,5	ae	28,5	ch	47,6	ej	43,9	ik
47/6-6 Ao x Dolia 2-45 Az	74	a	49	ef	124	ch	172	ah	222	ae	92	ci	5,3	be	25,5	hj	42,0	ae	44,9	fj
47/6-6 Ao x 1-12-3 P2.7 Ao	76	ae	43	a	119	ab	172	ah	261	fg	93	fj	5,3	ce	27,4	fi	44,0	bh	39,8	l
47/6-6 Ao x Oleik 2-1-1 Ao	78	fg	44	ac	122	ad	184	hj	227	af	92	di	5,3	ce	24,8	hk	40,8	ad	40,2	l
47/6-6 Ao x XF 4815 Ao	77	eg	47	ae	124	dj	165	ad	292	g	97	l	5,0	e	27,0	gj	58,2	l	44,0	ik
47/6-6 Ao x XF 4735 Ao	78	fg	45	ad	122	bf	166	ae	225	af	94	jk	5,8	ac	27,5	ei	43,7	bh	44,3	hk
47/6-6 Ao x 5-14-2 Ao	76	bf	46	ae	123	cg	177	dh	193	a	93	ej	5,8	ac	31,2	be	39,7	ac	43,6	ik
47/6-6 Ao x Pro 204 Ao	75	ad	43	a	118	a	168	af	199	ab	91	ag	5,6	ad	27,8	dh	40,9	ad	44,9	gj
EG 146 A x 434/6-1-1 Ao	82	ij	45	ae	128	ik	208	k	251	ef	92	bi	6,0	a	35,4	a	47,7	fj	47,6	cg
EG 146 A x XF 4735 Ao	83	j	44	ac	127	hk	173	bh	227	af	93	gj	5,9	ab	28,3	ch	48,5	gk	47,0	ch
EG 146 A x XF 4815 Ao	76	ae	48	be	124	ch	182	gj	234	bf	92	bi	6,0	a	32,9	ab	50,2	ik	50,6	ab
CMSOL9 x 434/6-1-1 Ao	83	j	43	a	126	fk	180	fj	195	ab	90	ab	6,0	a	25,2	hj	37,6	a	43,5	jk
CMSOL9 x XF 4815 Ao	80	h	44	ab	124	ci	176	ch	195	ab	92	ah	5,9	ab	26,0	gj	39,6	ab	50,9	a
CMSOL9 x XF 4735 Ao	81	hi	46	ae	127	hk	162	ab	196	ab	90	ac	5,9	ab	24,0	ik	39,5	ab	47,8	bf
PR 64 H 41*	75	ab	49	df	124	ch	162	ab	221	ae	95	kl	5,7	ad	30,9	bf	50,9	ik	44,3	hk
DORIANA	77	df	49	df	126	ek	169	abg	248	df	94	jk	5,8	ac	35,2	a	52,4	jk	49,2	ac
MAS 92.B	77	eg	49	df	126	gk	178	ei	201	ac	94	jk	5,6	ae	31,4	bd	46,5	di	43,8	ik
Media	77		47		124		176		223		92		28		45,1		45,5		11,6	
C.V.	0,8		3,2		1,6		4,1		17,4		1,3		6,2		4,4		2,3		6,1	

In neretto i testimoni ibridi commerciali; con l'asterisco quelli alto oleico

A lettere differenti corrispondono valori medi statisticamente diversi secondo il test della DMS per P ≤ 0,05

1.6 Conservazione del materiale genetico

I numerosi progetti di ricerca cui la struttura ha partecipato e l'intenso lavoro di miglioramento genetico intrapreso negli anni passati hanno consentito la selezione di numerose linee di girasole oltre la costituzione di combinazioni ibride competitive, alcune delle quali avviate all'iscrizione al Registro nazionale che impongono un lavoro di riproduzione conservativa. La mancanza di fondi specifici per la prosecuzione del lavoro intrapreso precedentemente ha frequentemente interrotto i programmi di ricerca, con inevitabile ripercussione negativa sul materiale in dotazione. La partecipazione al Progetto RGV/FAO ha permesso perciò di intraprendere un progressivo svecchiamento del materiale posseduto, la riproduzione delle linee non più coltivate da diversi anni in modo da recuperare l'energia germinativa del seme, in special modo per le linee parentali delle varietà che risultano iscritte al Registro nazionale. Nell'ultimo triennio si sono effettuate semine mirate alla riproduzione in isolamento spaziale e/o temporale delle linee A, B ed R in dotazione.



Foto 2a Le file delle linee in riproduzione sono impiantate con seme in eccesso per ottenere la densità desiderata con diradamento manuale



Foto 2b Le piante sono lasciate crescere liberamente fino allo stadio di bottone fiorale

1.7.1 Riproduzione in isolamento controllato

Il lavoro è consistito essenzialmente nella semina di file binate di partner maschiosterili e mantenitori appartenenti alla medesima linea, file singole per genotipi ristoratori della fertilità con almeno 15 poste/fila, dove la disponibilità di seme lo permetteva [FOTO 2], disponendo un solo seme per buca in caso di scarsità di seme, 2-3 acheni con disponibilità sufficiente, provvedendo successivamente, in quest'ultimo caso, allo stadio di 2-4 foglie, all'ottimizzazione dell'investimento tramite diradamento manuale. Alla fioritura i capolini delle piante sono stati isolati con sacchetti di cotone [FOTO 3] per evitare inquinamento e, secondo necessità, sono stati eseguiti incroci manuali (B x A) o favorita l'autofecondazione (R e B) per ottenere il quantitativo di seme utile alla conservazione e alla prosecuzione dell'attività [FOTO 4 e 5].



Foto 3 I capolini delle piante selezionate vengono coperti con sacchetti di cotone per salvaguardarne i fiori da possibili inquinamenti di polline estraneo. Per le linee R ed A a buona attitudine alla combinazione è stata effettuata la produzione di alcuni ibridi sperimentali per testarne successivamente le attitudini produttive in prove di valutazione agronomica.



Foto 4 Il polline viene prelevato manualmente per essere poi portato su piante portaseme (maschiosterili)



Foto 5 Se la pianta portaseme non presenta maschio sterilità genetica citoplasmatica, va operata la castratura manuale del capolino ricettore, eliminando quotidianamente, per almeno una settimana, le antere emesse in senso acropeto e solo successivamente operando l'impollinazione.

Si è quindi eseguita la raccolta, scalare, alla maturazione delle singole piante, procedendo alla sgranatura per ogni singolo capolino, avvalendosi di una specifica macchina ausiliaria, dotata di un rullo bullonato su cui comprimere la calatide e ottenere la "sgranatura" degli acheni [FOTO 6]; successivamente si è provveduto alla pulizia del seme, alla sua pesatura e al trattamento antiparassitario con prodotto antiperonosporico (metalaxyl), quindi al suo insacchettamento.



Foto 6 macchina a stazione fissa per la sgranatura delle calatidi di girasole

1.7.2 Riproduzione in isolamento spaziale (e/o temporale)

Nel caso di riproduzione di seme ibrido o di un quantitativo rilevante di alcune linee di maggiore fabbisogno è conveniente predisporre dei campetti di riproduzione isolati spazialmente (almeno 2.500 m) da altre possibili colture di girasole. Data la

diffusione della oleaginosa negli ordinamenti del Centro Italia, con la conseguente difficoltà di reperire spazi opportunamente distanziati, è opportuno adottare l'accorgimento di sfalsare le date di semina in tali campi rispetto a ipotetiche coltivazioni più o meno limitrofe [FOTO 7] per aumentare la sicurezza rispetto ad eventuali inquinamenti, fino alla metà di giugno, periodo oltre il quale il ciclo della composita rischia di protrarsi oltre il periodo utile stagionale, con ripercussioni negative nella fecondazione e allegazione, oltre alla crescita di suscettività all'attacco di patogeni come sclerotinia e macrophomina, in grado di compromettere il risultato produttivo.

1.7.3 Conservazione in ambiente controllato

Allo scopo di prolungare il periodo di vitalità germinativa e di sanità delle partite di seme annualmente riprodotte, si sono inoltre intrapresi i lavori di sistemazione di un'apposita camera di essiccazione e stoccaggio per la migliore conservazione del materiale prodotto ogni anno.



Foto 7: per una maggiore contemporaneità di fioritura le semine delle linee impollinanti vengono opportunamente distanziate da quelle delle linee portaseme

Il locale di circa 30 m³ è stato isolato termicamente e dotato di uno strumento deumidificatore e condizionatore in grado di mantenere una temperatura costante di circa 15°C ed abbassare l'umidità circostante al 14-15%. I semi vengono conservati in buste di carta riposte in scatoloni di cartone disposti su scaffalature metalliche. Tali accorgimenti permettono di mantenere ad una germinabilità accettabile le partite di seme anche per 5-8 anni. La stanza ospita anche un freezer a colonna con cassette per lo stoccaggio a lunga scadenza a -18°C. Tale conservazione va eseguita riponendo il materiale in buste di plastica in cui si è operato il vuoto. A tale scopo ci si è dotati di una macchina confezionatrice sottovuoto ad aspirazione esterna che permetterà di stivare il seme per la lunga conservazione preventivamente sottoposto a trattamento con appositi antiperonosporici ed insetticidi attraverso una macchina conciatrice ad umido per piccole quantità HEGE 11 della WINTERSTEIGER AG recentemente acquistata.

1.8 Caratterizzazione del materiale genetico

Parallelamente al lavoro di moltiplicazione conservativa è stato intrapresa un'attività di caratterizzazione morfo-fenologica dei genotipi disponibili, sulla stregua di quanto indicato dalle direttive del Progetto RGV/FAO. In primis sono stati individuati i necessari indicatori, tenendo in considerazione quanto elaborato per la descrizione dei materiali in corso di iscrizione al Registro nazionale delle varietà e facendo riferimento ai disciplinari UPOV. Dal 2011, quindi, sono state effettuate semine dedicate alla caratterizzazione in file opportunamente spaziate per facilitare il rilievo dei caratteri specifici. A completamento del lavoro sono stati eseguiti in laboratorio i necessari riscontri analitici per l'identificazione del contenuto in olio del seme e della sua composizione in acidi grassi. Il lavoro intrapreso ha già portato alla descrizione di un certo numero di linee di girasole (Tabelle 5, 6, 7, 8) dotate di un significativo corredo fotografico, esposto parzialmente nelle Foto 8-17.

Tabella 5 Caratteri biometrici, fenologici, contenuto in olio degli acheni e composizione acidica dello stesso

Linee	Durata intervallo (d)			Altezza (cm)	Olio s.s.(%)	Contenuto in acidi grassi (%):						
	semina- fioritura	fioritura- maturazione	semina- maturazione			Palmitico	Stearico	Oleico	Linoleico	Linolenico	Arachidico	Beenico
284 B	81	39	120	110	31,4	8,01	5,82	24,20	60,56	0,51	0,13	0,77
284 A	79	40	119	120	35,2	6,74	6,60	39,28	45,66	0,52	0,09	1,11
29UPR/20 Ao	79	39	118	125	40,5	4,29	2,36	88,42	3,47	0,28	0,30	0,88
29UPR/20 Ao	79	39	118	135	42,1	4,05	2,46	90,54	1,52	0,27	0,26	0,90
265 B	76	41	117	140	37,0	6,02	6,33	37,00	49,24	0,49	0,11	0,81
265 A	78	41	119	145	36,4	5,91	6,36	39,67	46,60	0,49	0,12	0,85
305/4 B	80	39	119	130	38,8	4,84	3,89	82,69	7,23	0,36	0,25	0,74
305/4 A	78	40	118	134	40,5	4,32	3,50	81,53	9,35	0,34	0,24	0,72
27/2-1 Ao B	84	34	118	130	47,2	4,42	3,83	88,22	2,01	0,36	0,21	0,95
27/2-1 Ao A	83	36	119	136	51,5	4,44	3,36	89,73	0,98	0,30	0,20	0,99
HAOL 9 B	85	34	119	137	46,2	4,31	3,54	89,35	1,48	0,33	0,22	0,77
HAOL 9 A	79	40	119	138	43,1	4,63	3,57	88,04	2,22	0,38	0,26	0,90
226 Ao B	79	41	120	123	38,9	4,33	2,95	89,68	1,73	0,29	0,25	0,77
226 Ao A	78	40	118	125	35,6	3,88	2,88	90,79	1,15	0,27	0,23	0,80
229/3 B	81	38	119	115	32,6	6,96	3,84	34,69	53,45	0,35	0,14	0,57
229/3 A	83	37	120	120	33,9	6,56	3,70	38,16	50,44	0,34	0,13	0,67
89 B	85	34	119	135	47,5	6,54	4,25	36,51	51,49	0,31	0,16	0,74
89 A	84	36	120	140	44,8	6,53	5,01	37,12	49,94	0,42	0,14	0,84
270 B	88	32	120	140	38,6	5,53	6,54	42,46	44,02	0,47	0,13	0,85
270 A	85	34	119	145	39,8	5,51	5,83	41,50	45,73	0,43	0,14	0,86
57/7-2 Ao B	83	35	118	125	38,7	5,98	3,64	41,63	47,56	0,33	0,15	0,71
57/7-2 Ao A	83	36	119	127	40,1	6,50	3,43	45,05	43,96	0,29	0,15	0,62
28 UPR B	85	35	120	140	42,1	6,17	5,02	45,43	42,25	0,35	0,13	0,65
28 UPR A	81	38	119	138	42,0	6,39	4,20	43,85	44,45	0,32	0,13	0,66
290 B	81	41	122	126	28,9	5,67	4,26	36,49	52,53	0,33	0,15	0,57
290A	83	37	120	130	28,5	5,71	4,05	34,23	55,02	0,28	0,13	0,58
27/4-1 Ao B	84	38	122	136	37,5	3,86	2,77	89,42	2,63	0,25	0,24	0,83

Costituzione, mantenimento e valorizzazione di una collezione di linee di girasole (*Helianthus annuus L.*)

27/4-1 Ao A	79	39	118	140	38,6	3,92	3,93	88,74	1,92	0,33	0,21	0,95
234 Ao B	84	35	119	137	42,9	5,69	2,88	30,59	59,87	0,25	0,17	0,55
234 Ao A	83	36	119	127	38,9	5,06	3,10	43,07	47,06	0,25	0,18	1,28
216/3-4 B	74	47	121	125	42,3	5,69	2,64	35,71	54,75	0,05	0,15	1,01
216/3-4 A	76	43	119	130	40,7	6,09	2,68	35,18	55,16	0,24	0,16	0,49
226 B	82	37	119	125	41,5	6,10	5,96	39,77	46,59	0,47	0,12	0,99
226 A	80	40	120	130	38,8	6,14	7,19	41,17	43,75	0,57	0,11	1,07
305 NP2 B	73	45	118	120	42,8	6,47	4,70	42,39	45,23	0,38	0,13	0,70
305 NP2 A	74	45	119	130	39,5	6,10	4,51	43,83	44,32	0,37	0,14	0,73
269 B	79	41	120	145	40,7	5,97	4,09	45,22	43,65	0,35	0,14	0,58
269 A	78	40	119	144	38,9	6,41	4,56	49,83	37,94	0,38	0,13	0,75
232/1-3 B	78	44	122	150	38,3	6,23	4,02	41,45	46,82	0,41	0,14	0,93
232/1-3 A	79	41	120	152	41,4	5,26	3,89	51,73	37,80	0,33	0,14	0,85
181/5-12 B	81	39	120	140	36,7	6,50	6,72	37,59	47,57	0,55	0,11	0,96
181/5-12 A	78	41	119	146	37,5	6,17	6,62	37,98	47,56	0,55	0,13	0,99
243 B	77	44	121	150	44,3	5,64	6,36	40,16	46,51	0,47	0,15	0,71
243 A	75	45	120	156	41,2	5,38	5,98	48,18	39,05	0,44	0,15	0,82
37 E Ao B	81	40	121	145	34,2	4,65	3,22	84,72	5,99	0,29	0,23	0,90
37 E Ao A	79	41	120	150	30,7	4,83	2,61	85,81	5,52	0,25	0,21	0,77
47/6-6 Ao B	84	37	121	152	39,6	4,06	4,00	87,56	2,81	0,32	0,24	1,01
47/6-6 Ao A	81	39	120	155	38,2	4,28	3,48	87,38	3,49	0,34	0,27	0,76
181/5-12 Ao	77	45	122	160	33,5	5,09	4,30	86,94	1,81	0,46	0,19	1,21
181/5-12 Ao	75	48	123	156	34,2	5,09	4,19	86,79	2,03	0,42	0,18	1,30

Tabella 6 Caratteri descrittivi di foglie fiori e brattee delle linee in dotazione

Carattere	Foglia					Fiori ligulati			Fiori tubulosi			Brattee		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Linee	dimensioni	Colore verde	bollosità	seghettatura	forma della parte distale	forma	Colore	Colore	colorazione antocianina dello stigma	intensità del carattere 9	colore verde della faccia esterna	forma	Portamento in rapporto al capolino	
284 B	m	m	l	m	tl	os	ga	g	a		m	ar	la	
284 A	m	m	l	m	tl	os	ga	g	a		m	ar	la	
29UPR/20 Ao B	m	m	a	m	tsl	f	ga	a	p	d	c	ar	na	
29UPR/20 Ao A	m	m	a	f	tsl	f	g	g	a		m	ar	na	
265 B	p	m	a	f	ts	f	g	a	a		c	ar	na	
265 A	m	m	l	f	tsl	f	g	a	a		m	ar	na	
305/4 B	p	c	a	i	lt	os	gc	a	a		c	ar	na	
305/4 A	g	m	a	g	tl	os	ga	g	a		c	ar	na	
27/2-1 Ao B	p	s	a	f	tsl	f	g	g	a		c	ar	na	
27/2-1 Ao A	g	s	a	m	tsl	f	g	g	a		c	ar	la	
HAOL 9 B	p	s	a	m	tsl	os	g	a	a		c	ar	la	
HAOL 9 A	m	m	l	g	tsl	os	g	g	a		m	ar	na	
226 Ao B	p	s	l	m	tsl	f	g	g	a		c	n	na	
226 Ao A	g	s	l	g	tsl	f	ga	g	a		m	ar	na	
229/3 B	p	m	a	i	tsl	os	g	g	a		m	ar	na	
229/3 A	p	m	a	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na	
89 B	p	m	a	f	tsl	f	g	g	a		m	ar	la	
89 A	p	m	a	g	tsl	f	g	g	a		m	ar	la	
270 B	m	c	a	f	tsl	f	gc	g	a		c	n	na	
270 A	m	c	a	f	tsl	f	gc	g	a		c	n	na	
57/7-2 Ao B	p	m	a	i	tsl	f	g	a	a		m	ar	na	
57/7-2 Ao A	p	m	a	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na	

28 UPR B	p	m	a	g	tsl	f	g	a	a		c	ar	na
28 UPR A	m	m	l	g	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
290 B	p	m	a	g	tsl	f	g	g	a		m	al	na
290°	p	m	a	m	tsl	f	g	g	a		m	al	na
27/4-1 Ao B	p	m	a	g	tsl	f	g	g	a		s	n	na
27/4-1 Ao A	g	m	a	g	tsl	f	g	a	a		m	ar	na
234 Ao B	p	c	a	f	ts	f	g	g	a		c	n	na
234 Ao A	p	c	a	f	ts	f	g	g	a		m	ar	na
216/3-4 B	p	m	l	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
216/3-4 A	p	m	l	i	tsl	f	g	g	a		m	al	na
226 B	p	m	l	i	tsl	f	g	g	a		m	al	na
226 A	p	m	a	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
305 NP2 B	p	c	a	i	tsl	f	g	g	a		c	ar	na
305 NP2 A	p	c	a	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
269 B	p	c	a	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
269 A	p	c	a	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
232/1-3 B	m	m	a	i	tlr	f	g	g	a		m	n	na
232/1-3 A	m	m	a	m	tsl	f	ga	g	a		s	n	na
181/5-12 B	p	c	a	m	tsl	f	ga	g	a		c	n	na
181/5-12 A	p	c	a	m	tsl	f	g	g	a		c	ar	na
243 B	m	m	m	m	tsl	f	g	g	a		c	ar	na
243 A	m	m	m	m	tsl	f	gc	g	a		m	ar	na
37 E Ao B	p	m	m	m	tsl	f	g	g	a		m	n	na
37 E Ao A	m	m	m	m	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
47/6-6 Ao B	p	c	a	f	tsl	os	g	g	a		m	ar	na
47/6-6 Ao A	p	c	a	f	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
181/5-12 Ao B	p	c	a	i	tsl	f	g	g	a		m	ar	na
181/5-12 Ao A	m	m	a	f	tsl	f	g	g	a		c	n	na

Tabella 7 Caratteri descrittivi di fusto, infiorescenza e seme delle linee in dotazione

Carattere n.	Ramificazioni		Capolino				Seme					
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Disponibilità (g)	
Linee	Presenza	tipo	portamento	taglia	dimensioni	forma	Colore principale	strature sul marginale	strature tra i margini	colore delle strature		
284 B	a		sa	p	m	ar	n	a	a	g	219,7	
284 A	a		sa	m	m	ol	n	a	a		184,0	
29UPR/20 Ao B	a		sa	p	m	ol	n	a	a	g	440,1	
29UPR/20 Ao A	a		sd	m	m	ol	n	a	a	g	510,0	
265 B	a		sd	p	g	ol	g	lm	lm	g	399,4	
265 A	a		sa	m	m	ol	n	lm	lm	g	285,4	
305/4 B	a		v	p	p	os	n	lm	a	g	194,2	
305/4 A	a		v	m	p	ol	n	a	lm		581,5	
27/2-1 Ao B	a		v	p	p	al	g	a	a	g	302,0	
27/2-1 Ao A	a		v	p	p	os	n	a	a	g	222,3	
HAOL 9 B	a		v	p	m	ol	n	lm	lm	g	555,6	
HAOL 9 A	a		sd	m	p	al	n	lm	a	g	195,5	
226 Ao B	a		sd	p	g	ol	n	a	a	g	415,4	
226 Ao A	a		sd	g	g	os	n	lm	a	g	556,1	
229/3 B	a		sd	p	g	os	g	lm	lm	g	284,9	
229/3 A	a		sd	p	m	ol	n	a	a	g	139,3	
89 B	a		v	p	m	ol	n	lm	lm	g	894,9	
89 A	a		v	p	m	ol	ms	a	a	g	218,6	
270 B	a		v	m	g	ol	n	lm	a	g	586,5	
270 A	a		v	m	m	ar	n	a	a	g	443,6	
57/7-2 Ao B	a		sd	m	m	ol	g	lm	lm	b	758,2	
57/7-2 Ao A	a		v	p	p	ol	ms	lm	lm	g	278,3	

28 UPR B	a		sd	p	m	ol	n	a	a	b	460,9
28 UPR A	a		sd	p	p	os	n	a	a	g	283,3
290 B	a		sd	p	m	ol	n	lm	a	g	210,5
290°	a		sd	p	m	ol	n	lm	lm	g	211,3
27/4-1 Ao B	a		i	m	g	ol	n	fm	lm	g	104,0
27/4-1 Ao A	a		sd	g	m	ol	n	lm	lm	g	580,8
234 Ao B	a		sa	p	m	ol	g	fm	lm	b	610,1
234 Ao A	a		sd	p	m	ol	a	fm	lm	b	649,9
216/3-4 B	a		sd	m	p	ar	n	a	a	g	321,3
216/3-4 A	a		i	p	p	ol	n	a	a		154,6
226 B	a		v	p	p	ar	n	a	a	g	207,0
226 A	a		v	p	m	ar	n	a	a	g	224,3
305 NP2 B	a		sa	m	m	os	gb	a	a		408,3
305 NP2 A	a		sd	g	m	ol	n	lm	a	g	404,4
269 B	a		sa	m	m	ol	g	lm	a	g	969,7
269 A	a		sa	m	m	ol	g	lm	a	g	11,5
232/1-3 B	a		sd	m	m	ar	n	lm	lm	g	405,8
232/1-3 A	a		sd	g	m	ar	n	lm	a	g	544,5
181/5-12 B	a		sd	m	m	os	n	a	a		111,0
181/5-12 A	a		sd	p	p	al	n	a	a	g	35,0
243 B	a		sd	g	m	ol	n	lm	lm	g	1220,7
243 A	a		sd	m	m	ol	n	lm	lm	g	366,3
37 E Ao B	a		sd	p	g	ol	n	lm	a	g	487,2
37 E Ao A	a		sd	m	g	os	n	lm	lm	g	432,8
47/6-6 Ao B	a		sa	m	g	ar	n	lm	a	g	550,4
47/6-6 Ao A	a		sa	m	m	ar	n	a	lm	g	157,8
181/5-12 Ao B	a		sa	p	p	os	n	a	a		116,3
181/5-12 Ao A	a		sd	m	m	al	n	a	a		36,0

Tabella 8 Legenda caratteri descrittivi

FOGLIA				
1	Dimensioni			
	piccola.....	p		
	media.....	m		
	grande.....	g		
2	Colore verde			
	chiaro.....	c		
	medio.....	m		
	scuro.....	s		
3	Bollosità			
	Assente o molto lieve.....	a		
	lieve.....	l		
	media.....	m		
	forte.....	f		
	molto forte.....	mf		
4	Seghettatura			
	isolata.....	i		
	fine.....	f		
	media.....	m		
	grossa.....	g		
	molto grossa.....	m		
5	Forma della parte distale			
	lanceolata.....	la		
	da lanceolata a triangolare stretta.....	lt		
	triangolare stretta.....	ts		
	da triangolare stretta a triangolare larga.....	tsl		
	triangolare larga.....	tl		
	da triangolare larga ad acuminata.....	tlc		
	da triangolare larga ad arrotondata.....	tlr		
	acuminata.....	ac		
	arrotondata.....	ar		
FIORITURA				
FIORI LIGULATI				
6	Forma			
	fusiforme.....	f		
	ovato stretta.....	os		
	ovato larga.....	ol		
	arrotondata.....	a		
7	Colore			
	avorio.....	av		
	giallo chiaro.....	gc		
	giallo medio.....	g		
	giallo arancio.....	ga		
	Arancio.....	ar		
	Porpora.....	p		
	bruno rossastro.....	b		
	multicolore.....	m		
FIORI TUBULOSI				
8	Colore			
	giallo.....	g		
	arancione.....	a		
	Porpora.....	p		
9	Colorazione antocianica dello stigma			
	Assente.....	a		
	presente.....	p		
10	Intensità della colorazione antocianica			
	debole.....	d		
13	Portamento in rapporto al capolino			
	non avvolgente o molto debolmente avvolg.....		na	
	leggermente avvolgente.....		la	
	fortemente avvolgente.....		fa	
PIANTA				
14	Ramificazioni			
	assenti.....		a	
	presenti.....		p	
15	Tipo di ramificazioni			
	solo basali.....		b	
	prevalentemente basali.....		pb	
	totali.....		t	
	prevalentemente apicali.....		pa	
	solo apicali.....		a	
CAPOLINO				
16	Portamento			
	orizzontale.....		o	
	inclinato.....		i	
	verticale.....		v	
	semireclinato con stelo diritto.....		sd	
	semireclinato con stelo arcuato.....		sa	
	reclinato con stelo diritto.....		rd	
	reclinato con stelo leggermente arcuato.....		rla	
	reclinato con stelo fortemente arcuato.....		rfa	
	ritorto.....		r	
17	Taglia			
	piccolo.....		p	
	medio.....		m	
	grande.....		g	
SEME				
18	Dimensioni			
	piccolo.....		p	
	medio.....		m	
	grande.....		g	
	molto grande.....		mg	
19	Forma			
	allungata.....		al	
	ovata stretta.....		os	
	ovata larga.....		ol	
	arrotondata.....		ar	
20	Colore principale			
	bianco.....		b	
	grigio-biancastro.....		gb	
	grigio.....		g	
	marrone chiaro.....		mc	
	marrone medio.....		m	
	marrone scuro.....		ms	
	nero.....		n	
	porpora.....		p	
21	Striature sul margine			
	assenti o molto lievemente marcate.....		a	
	lievemente marcate.....		lm	
	fortemente marcate.....		fm	
22	Striature tra i margini			
	assenti o molto lievemente marcate.....		a	
	lievemente marcate.....		lm	
	fortemente marcate.....		fm	

Costituzione, mantenimento e valorizzazione di una collezione di linee di girasole (Helianthus annuus L.)

media.....	m	23 Colore delle striature	bianco.....	b
forte.....	f		grigio.....	g
BRATTEE			marrone.....	m
11 Colore verde della faccia esterna			nero.....	n
chiaro.....	c			
medio.....	m			
scuro.....	s			
12 Forma				
nettamente allungata.....	al			
né nettamente all. né nettamente arrotondata....	n			
nettamente arrotondata.....	ar			



Foto 8a Linea inbred 269 B calatide in fioritura



Foto 8b Linea 269 B pianta intera



Foto 9a Linea inbred 232/1-3 B calatide in fioritura



Foto 9b Linea 232/1-3 B pianta intera



Foto 10a Linea inbred 305/4 A calatide a fine fioritura



Foto 10a Linea 305/4 A pianta intera



Foto 11a Linea inbred 270 B calatide in fioritura



Foto 11b Linea 305/4 B pianta intera

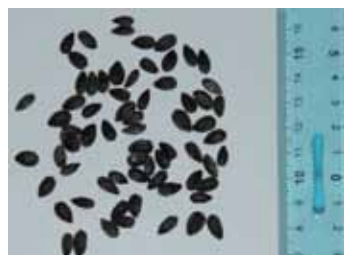


Foto 12 A partire da sinistra acheni delle linee 269 B, 232/1-3 B, 305/4 A, 270 B



Foto 13a Linea inbred 28 UPR B in piena fioritura



Foto 13b Linea 28 UPR B pianta intera



Foto 14a Linea inbred 89 B in fioritura



Foto 14b Linea 89 B pianta intera



Foto 15a Linea inbred 47/6-6 A a fine fioritura



Foto 15b Linea 47/6-6 pianta intera



Foto 16a Linea inbred HAOL9 A in fioritura



Foto 16b Linea HAOL9 A pianta intera

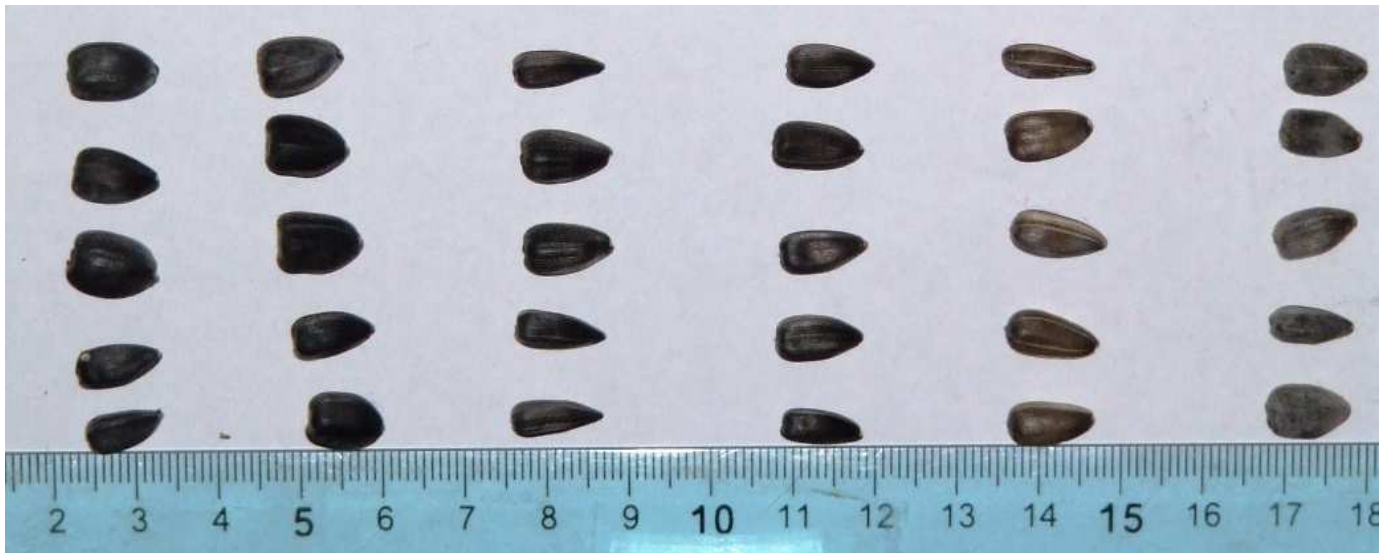


Foto17 Da sinistra acheni delle linee inbred B 28UPR, 47/6-6 AO, HAOL9, 89, 234 AO, 305/NP2

BIBLIOGRAFIA

- Barcaccia G., Lorenzetti S., Falcinelli M., 2006. L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica. *Dal seme*, 1, 32-38.
- Bonciarelli F., 1987. *Coltivazioni erbacee*. Edagricole Bologna.
- Del Gatto A., 2006. Valutazione di test-cross e combinazioni ibride di girasole. *Dal seme*, 3, 34-43.
- Del Gatto A., Angelini P., Laureti D., 2005b. Combining ability in new high oleic sunflower lines. *Proceedings of XLVIII SIGA Annual Congress, Potenza, 12-15/09/2005*.
- Del Gatto A., Laureti D., 2005a. Attitudine combinatoria in nuove linee di girasole alto oleico. *Agroindustria*, 4, 2, 161-165.
- Del Gatto A., Laureti D., 2005b. Attitudine combinatoria in nuove linee di girasole alto oleico. *Agroindustria*, 4, 2, 161-165.
- Del Gatto A., Laureti D., 2001a. Valutazione di nuove selezioni di girasole alto oleico. *Atti XXXIV Convegno SIA, "Strategie agronomiche al servizio della moderna agricoltura", Pisa 17-21 settembre 2001*, 161-162.
- Del Gatto A., Laureti D., 2001b. Specific combining ability of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) restorer lines. *Proceedings of the XLV SIGA Annual Congress, Salsomaggiore Terme, 26-29/09/2001, Session II*, 24.
- Del Gatto A., Laureti D., 2002. Nuove costituzioni di girasole selezionate in Italia. *Sementi elette*, XLVIII, 3, 34-38.
- Del Gatto A., Laureti D., 2004. Doppio ciclo nel miglioramento genetico del girasole. *Sementi elette*, L, 4, 30-32.
- Del Gatto A., Laureti D., 2006. Girasole alto oleico: impieghi e prospettive. *Dal seme*, 1, 88-90.
- Del Gatto A., Laureti D., 2006. Il miglioramento genetico del girasole alto oleico per la produzione di biodiesel. *Dal seme*, 1, 65-76.
- Del Gatto A., Mangoni L., Laureti D., 2005a. Germplasm with good combining ability for selecting RHA lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proceedings of XLVIII SIGA Annual Congress, Potenza, 12-15/09/2005*.
- Fick, G.N., 1975. Heritability of oil content in sunflower (*H. annuus* L.). *Crop Science*, 15, 77-78.
- Frascarelli A., 2011. Prevista una ripresa record per il girasole 2011. *L'informatore Agrario*, 11, 49-51.
- Kovačik A., Škaloud V., 1972. Combining ability and prediction of heterosis in sunflower (*H. annuus* L.). *Scientia Agriculture Bohemoslovaca, Tomus 4(XX)*, 4.
- Laureti D., Del Gatto A., 2001a. Selection of germoplasm with good combining ability in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proceedings of the XLV SIGA Annual Congress, Salsomaggiore Terme, 26-29/09/2001, Session II*, 24.
- Laureti D., Del Gatto A., 2001b. General and specific combining ability in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 24, 34, 1-16, 2001.
- Laureti D., Del Gatto A., 2001c. General and specific combining ability in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 24, 34, 1-16, 2001.

- Laureti D., Del Gatto A., 2003. Double cycle in sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding. Proceedings of the XLVII SIGA Annual Congress, Verona, 24-27/09/2003, Session II.
- Laureti D., Del Gatto A., 2004. Germplasm with good combining ability in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Proceedings 16th International Sunflower Conference, Fargo, ND USA, 539-541.
- Laureti D., Del Gatto A., Pieri S., 1997. Ibridi sperimentali di girasole (*Helianthus annuus* L.). Atti XLI Convegno Annuale SIGA 209-210.
- Laureti D., Del Gatto A., 2002. Selection of germoplasm with good combining ability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) II. roceedings of the XLVI SIGA Annual Congress, Giardini Naxos, Italy, 18-21/09/2002. ISBN 88-900622-3-1. 4.43.
- Laureti D., Monotti M., Conti D., Del Pino A.M., Pieri S., Ridoni G. 2006. Girasole: panorama varietale per il 2006. L'Informatore Agrario LXII 10, Speciale Girasole, 34-39.
- Miller J., Fick, G.N., 1997. The genetics of sunflower. Sunflower Technology and Production, 441-495. Madison. Wisconsin, USA.
- Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali - Sistema informativo agricolo nazionale, <http://www.sian.it/downloadpub/jsp/zfadlx001.jsp>, 24/01/2011.
- Monotti M., Laureti D., Conti D., Del Pino A.M., Pieri S., Ridoni G. 2004. Girasole: conferme e novità della sperimentazione varietale 2003. L'Informatore Agrario LX 10, Speciale Girasole, 47-55.
- Monotti M., Laureti D., Conti D., Del Pino A.M.; Pieri S., Ridoni G., 2001. Valutazione di varietà di girasole per la coltivazione in Italia. L'Informatore Agrario LVII 11, Speciale Girasole, 49-56.
- Ortegon Morales A.S., Escobedo Mendoza A., Quilantan Villareal L., 1992. Combining ability of sunflower (*Helianthus annuus* C.) lines and comparsion among parent lines hybrids. Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pisa, 7-11 September 1178-1193.
- Pirani V., Del Gatto A., 1995. Caratteristiche di alcuni ibridi di girasole (*Heliantus annuus* L.) in corso di iscrizione al Registro nazionale delle varietà. Sementi Elette, XLI, 3-4,27-30.
- Putt E. D., 1965. Heterosis, combining ability and predicted synthetics form a diallel cross in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Canadian Journal plant Science, 46, 59-67.
- Serieys H., 1992. Cytoplasmic effects on some agronomical characters in sunflower. Proceedings of 13th International Sunflower Conference. 7-11 September, Pisa, II, 1245-1250.
- Serieys H., 1994. Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources. Helia, 17, 93-102.
- Soldatov, K. I., 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. Proceedings of 7th International Sunflower Conference, Krasnodar (USSR), 27 June-3 July1976, 352-357.
- Vranceanu A.V., 1977. Metodos de infecion artificial. In El Girasol, 207-210. Edicion Mundi-Prensa, Madrid.

COLLEZIONE DI GERMOPLASMA DI CANAPA (*CANNABIS SATIVA L.*)*

Responsabili Scientifici: Dr. Mario Di Candilo¹, Dr. Gianpaolo Grassi²

¹CRA-CIN Centro di ricerca per le Colture Industriali, Via di Corticella, 133 – 40128 Bologna

²CRA-CIN sede distaccata di Rovigo, Viale G. Amendola, 82 – 4510 Rovigo

Riassunto

Viene presentata una collezione di germoplasma di canapa (*Cannabis sativa L.*) conservata presso il CRA-CIN, in parte presso la sede a Bologna e in parte presso la sede distaccata di Rovigo. La collezione comprende rispettivamente 39 e 273 accessioni, rappresentate da: i) varietà storiche autoctone, riselectate per bassi contenuti di tetraidrocannabinolo (THC); ii) varietà dioiche e monoiche di recente costituzione, adatte alle specifiche condizioni ambientali italiane; iii) popolazioni geneticamente migliorate, in corso di selezione; iv) varietà ed accessioni introdotte dall'estero; v) accessioni selvatiche. Inoltre, viene illustrata la metodologia seguita per la caratterizzazione dei materiali, nonché i risultati relativi ad una parte dei genotipi in collezione. Ad introduzione di quanto sopra, viene fatta una sintesi relativamente ai seguenti aspetti: 1) diffusione e motivazioni del declino della canapicoltura in Italia; 2) caratteristiche morfologiche, strutturali e chimiche della pianta; 3) destinazione d'uso dei prodotti della canapa, con particolare riferimento ai nuovi impieghi (per biocompositi, isolanti per la bioedilizia, geotessili, substrati colturali, cosmetici) e ai vantaggi offerti dalla fibra di canapa rispetto alle fibre sintetiche; 4) caratteristiche nutrizionali e composizione acidica dell'olio estratto dai semi di canapa; 5) nuove motivazioni d'interesse per la coltivazione della canapa in Europa e in Italia; e 6) opportunità di ricostituire un ampio pool genico della specie, dopo la forte erosione genetica occorsa nel lungo periodo di abbandono della coltivazione: obiettivo perseguito attraverso la realizzazione della collezione di germoplasma, fondamentale sia per programmi di breeding, sia per un impiego diretto in coltura.

Summary

It is presented a germplasm collection of hemp (*Cannabis sativa L.*), maintained by the CRA-CIN in Bologna (39 accessions) and in Rovigo (273 accessions). The collection includes: i) historical native cultivars, reselect to low levels of tetrahydrocannabinol (THC); ii) dioecious and monoecious varieties newly created, adapted to specific Italian environmental conditions; iii) genetically improved populations, with selection ongoing; iv) varieties and accessions introduced from abroad; v) wild accessions. In addition, we discussed the methodology used for the characterization of materials and the experimental results of some genotypes. Moreover, the following aspects are addressed: 1) Hemp diffusion and reasons for its decline in Italy; 2) morphological, structural and chemical properties of the plant; 3) use of hemp products, with special emphasis on the new perspectives (biocomposites, building insulation, geotextiles, growing medium, cosmetics) and the advantages offered by fiber hemp compared to synthetic fibers; 4) nutritional and fatty acid composition of oil extracted from hemp seed; 5) new motivation of interest for hemp cultivation in Europe and Italy; and 6) opportunity of re-select a wide genetic pool for the species, after the strong genetic erosion occurred in the long period of abandonment of hemp cultivation. Such objective is pursued through the collection of germplasm, which is essential for both breeding programs and direct use in cultivation.

Parole chiave

Collezione di germoplasma, fibra tessile, biocompositi, bioedilizia, cellulosa, cannabinoidi

Keywords

Germplasm collection, textile fiber, biocomposites, cellulose, cannabinoids

* doi:10.4458/0986-61

1 Inquadramento botanico, origine e diffusione della specie

La canapa appartiene all'ordine delle *Urticales*, alla famiglia delle *Cannabaceae* e al genere *Cannabis*. La pianta, originaria dell'Asia centrale, è conosciuta da tempi antichissimi: in Cina già nel 2700 a.C. era considerata la principale pianta tessile. Dall'area di origine, dove è ancora possibile trovare la pianta allo stato spontaneo, si è poi diffusa nell'Asia del Sud, nell'Asia Occidentale, in Europa e nel Nuovo Mondo. In Italia la coltura della canapa acquistò grande prestigio con l'espandersi della potenza militare ed economica delle repubbliche marinare, che ne utilizzarono grandi quantità sulle loro navi da guerra e da carico per le vele e il sartiame. Alla fine del XVI secolo la canapa era coltivata quasi esclusivamente nel bolognese, dove era molto avanzata l'arte della macerazione e della preparazione della fibra. In seguito la coltivazione si estese anche ad altre regioni della Penisola, raggiungendo la massima estensione alla fine degli anni 20 del secolo scorso (oltre 81 mila ettari). Successivamente la coltura andò sempre più declinando, fino alla sua scomparsa dagli ordinamenti colturali alla fine degli anni 50. Abbandono che è stato provocato da una serie di concause, fra cui principalmente: gli elevati costi di produzione (dovuti all'eccessivo carico di manodopera); il mancato adeguamento tecnologico, relativamente alla raccolta degli steli e alla macerazione della fibra; la concorrenza delle fibre artificiali; e, non ultimo, la legislazione sulla repressione degli stupefacenti che ha finito per reprimere la canapa da fibra assieme a quella da droga. Di fatto, non esistono differenze nette fra le due tipologie di canapa, se non per il contenuto di tetraidrocannabinolo (THC) e questo comporta tuttora frequenti equivoci e sequestri immotivati.

Il problema del rispetto delle norme pone un grosso limite anche alla gestione della banca del germoplasma, perché se è relativamente facile recuperare e trasferire seme di canapa, perché non contiene il principio attivo psicotropo vietato (THC), molto più difficile e rischiosa risulta la moltiplicazione ed il rinnovo del seme. La riproduzione della *Cannabis* deve rispettare alcune condizioni che sono dettate dalla modalità di riproduzione della specie: condizionata dal dioicismo (sessi separati su piante diverse) e dal tipo di impollinazione (anemofila). Caratteristiche che implicano l'allevamento di un adeguato numero di individui nel centro di moltiplicazione (100-200) per mantenere ben rappresentati i caratteri genetici della popolazione, garantendo comunque l'isolamento spaziale da altre fonti di polline di canapa. L'altro elemento molto complicato da gestire è quello del rispetto delle norme giuridiche (D.P.R. 309/90). Per la coltivazione della canapa ad elevato contenuto di THC è necessaria un'autorizzazione specifica del Ministero della salute che comunque non previene l'intervento talvolta devastante delle forze di polizia (sequestri e distruzione dei materiali), così come il problema della gestione del furto delle piante da parte degli "estimatori" delle caratteristiche drogastiche della pianta. In particolare, le accessioni di materiali selvatici o non selezionati per basso THC non possono ovviamente garantire il rispetto dei limiti imposti dalle norme che consentono la libera coltivazione della canapa (Reg. UE 796/2004) e perciò la moltiplicazione delle piante dovrebbe, a seguito di specifica autorizzazione ministeriale, realizzarsi in ambiente protetto, con tutti i limiti imposti dagli spazi e dai costi da sostenere per questa modalità di riproduzione.

1.1 Caratteristiche della specie

La canapa è una pianta erbacea, annuale, a ciclo fotosintetico C-3; è in grado di produrre grandi quantità di sostanza secca in un tempo relativamente breve (Struik *et al.*, 2000; Di Candilo *et al.* 2002). La pianta al termine dello sviluppo risulta costituita, grosso modo, dal 10% di radici, 60-70% di stelo, 15-20% di foglie e 5-15% di semi. La sostanza secca comprende il 90% di cellulosa ed emicellulosa ed il 4% di lignina (Ranalli e Casarini, 1998).

Radice. L'apparato radicale della pianta risulta formato da un robusto fittone centrale, dal quale si dipartono numerose radici secondarie ramificate. Normalmente raggiunge profondità elevate (superiori ad 1,5 m), esplorando un abbondante volume di terreno: caratteristica che consente alla pianta di soddisfare le sue esigenze idriche anche in condizioni di relativa siccità.

Fusto. È eretto, subconico o cilindrico nella parte inferiore; di colore verde più o meno intenso, che in prossimità della maturazione tecnologica della fibra vira verso il giallognolo. Nelle condizioni ottimali può raggiungere i 5 m di altezza. Risulta costituito da uno strato corticale esterno e da un cilindro centrale legnoso, detto canapulo. La parte corticale comprende uno strato esterno, formato da fibre primarie, e da uno strato interno, costituito da fibre secondarie; il cilindro centrale legnoso contiene fibre corte e rigide. Il diametro può variare sensibilmente in relazione al genotipo e alla densità di semina: generalmente si aggira attorno a 8-12 mm nelle coltivazioni per fibra tessile e 15-20 mm in quelle per fibra tecnica e seme. Il fusto è diviso da

nodi e internodi ed è cavo all'interno. Le due frazioni del fusto differiscono sensibilmente per composizione chimica: infatti, per la parte corticale sono stati riscontrati il 67% di cellulosa, il 13% di emicellulosa e il 4% di lignina; per la parte centrale legnosa, invece, sono stati trovati il 38% di cellulosa, il 31% di emicellulosa ed il 18% di lignina (Benedetti e Ciaralli, 1976).

Foglie. Le foglie sono opposte nella parte basale del fusto, tendono a crescere alternate, invece, nella parte medio-apicale; esse sono picciolate e palmate, ciascuna formata da 3-11 foglioline lanceolate a margine seghettato, di colore verde intenso nella pagina superiore e più chiaro in quella inferiore.

Fiori. La canapa è pianta dioica, con individui aventi soltanto fiori maschili o femminili. Tuttavia, possono comparire spontaneamente anche individui monoici, ovvero con fiori di entrambi i sessi. I fiori maschili sono riuniti in pannocchie terminali e ciascuno presenta 5 tepali fusi alla base e 5 stami. Il fiore femminile, invece, è una falsa spiga, grossa e a ciuffo, molto più fogliosa, compatta e robusta di quella maschile. Ciascun fiore femminile è composto da una stipola, di una brattea perigoniale e di un ovario uniloculare sormontato da due stimmi filiformi.

L'impollinazione è anemofila e può avvenire anche a distanze di 2-3 km se non esistono barriere che ostacolano il movimento del polline (Bocsa e Karus, 1998).

Seme. Il seme commerciale è rappresentato da acheni tondeggianti od ovali, lisci di colore grigio chiaro o marrone chiaro. Ciascun achenio contiene un seme con un endosperma carnoso ed embrione curvo. Le dimensioni degli acheni sono di 3-5 mm di lunghezza e 2-3 mm di larghezza. Il peso di mille semi nelle varietà dioiche da fibra è di circa 20 g., in quelle monoiche è inferiore.

Il seme contiene 20-25% di proteine, 20-30% di carboidrati, 25-35% di olio e 10-15% di fibre (Deferne e Pate, 1996; Pate, 1999).

1.2 Destinazioni d'uso

Fra le colture agro-industriali non alimentari la canapa è oggetto di crescente interesse, sia per la destinazione tradizionale del tessile, sia per nuovi impieghi, quali soprattutto: biocompositi, isolanti per la bioedilizia, geotessili, substrati colturali, cosmetici e medicinali. Riguardo alle nuove destinazioni va considerato che le più importanti case automobilistiche impiegano già le fibre vegetali, fra cui la canapa, in diverse parti delle autovetture di diversi modelli, in sostituzione delle fibre sintetiche. In effetti, rispetto a queste ultime le fibre vegetali si distinguono positivamente per bassa densità (minor peso, col vantaggio di favorire un maggiore rendimento del carburante), migliori proprietà meccaniche ed acustiche, facilità di lavorazione (estrusione), alta resistenza alla deformazione e alla rottura, assenza di effetti negativi sulla salute e costi di produzione più bassi (Karus e Kaup, 2002).

Analogamente, il settore della bioedilizia è sempre più interessato all'impiego delle fibre di canapa, sia per gli effetti isolanti (termo-acustici), sia per la capacità di alleggerire, rinforzare ed aumentare la durata nel tempo di conglomerati cementizi (Kampfer, 2003). Vi è poi un impiego sempre più diffuso di fibre vegetali per la produzione del cosiddetto "tessuto non tessuto" per la protezione di scarpate autostradali, canali aree costiere e in campo agricolo come pacciamatura di colture orticole, col vantaggio di una maggiore biodegradabilità rispetto ai poliesteri (Soiela e Viikna, 2003; Venturi, 2004).

Oltre che per gli impieghi sopra accennati vi è grande interesse del mondo agricolo ed industriale per la produzione di seme di canapa per uso mangimistico e/o per ottenere olio da impiegare nei settori alimentare, farmaceutico e cosmetico. Come si può osservare in tabella 1, l'olio di canapa è da considerarsi un lipide di grande interesse come integratore dietetico, in virtù dell'alto contenuto (circa il 75%) in acidi grassi insaturi (acido linoleico, acido alfa-linolenico e acido gamma-linolenico) (Callaway, 2004), in vitamina E, calcio, magnesio e potassio. E' da sottolineare inoltre che, tra gli oli naturali contenenti acidi grassi insaturi, l'olio di canapa presenta un rapporto tra i due gruppi di acidi grassi essenziali più importanti (Omega-3 e Omega-6) di 1:3, ritenuto ottimale dal punto di vista salutistico (Simopoulos *et al.*, 2000) (Tab. 2). Inoltre, l'olio di canapa, per la particolare composizione, l'elevata fluidità e la facile penetrazione, costituisce un eccellente ingrediente per prodotti "anti-aging" destinati al trattamento di pelli secche, disidratate e senescenti. L'ottimale equilibrio tra gli acidi grassi essenziali dell'olio conferisce la proprietà di regolarizzare il rapporto tra i trigliceridi nel sangue, prevenendo importanti patologie del sistema cardio-vascolare (Callaway, 2005). Inoltre, l'olio di canapa ha il potere di equilibrare il sistema immunologico in modo da aiutare a prevenire o migliorare le condizioni di importanti malattie talvolta ancora incurabili come il morbo di Chron, Sclerosi

multipla, SLA, psoriasi (Hazekamp e Grotenhermen, 2010).

Tabella 1 Composizione acidica dell'olio di canapa.

Acidi grassi	Struttura	%
Ac. palmitico	C16:0	5.8
Ac. palmitoleico	C16:1	0.2
Ac. stearico	C18:0	2.6
Ac. oleico (Omega 9)	C18:1	11.4
Ac. linoleico (Omega 6-LA)	C18:2	54.7
Ac. gamma-linolenico (Omega 3-LNA)	C18:3	18.4
Ac. alfa-linolenico (Omega 6-GLA)	C18:3	2.6
Ac. arachidico	C20:0	0.8
Ac. eicosaenoico	C20:1	0.8
Ac. eicosadienoico	C20:2	0.1
Ac. behenico	C22:0	0.3
Ac. lignocenico	C24	0.1

Tabella 2 Composizione nutrizionale del seme di canapa a confronto con quello di soia.

Composti		Seme di canapa (in 100 g)	Seme di soia (in 100 g)
Proteine	(g)	24.5	34
Acido linolenico	(%)	6	1.2
Acido linoleico	(g)	18	8.8
Rapporto LNA: LA		1:3	1:7
GLA	(g)	0.5	0.0
Fibra	(g)	35	4.5
Calcio	(mg)	168	190
Fosforo	(mg)	830	470
Ferro	(mg)	18	7
Thiamina	(mg)	0.9	0.5
Niacina	(mg)	2.5	2
Riboflavina	(mg)	1.1	0.2

La canapa ha l'esclusiva caratteristica di sintetizzare una famiglia di sostanze denominate cannabinoidi. Queste molecole sono una settantina, alcune hanno proprietà stupefacenti, come il THC, ma molte altre hanno evidenti proprietà terapeutiche che si esprimono in attività antinfiammatoria, antibiotica, antispastica, anticonvulsiva, antitumorale, etc (Guzman, 2005; Mc Partland e Russo, 2001). Mediante il miglioramento genetico classico al CRA-CIN sono state selezionate varietà di canapa che sono in grado di produrre un singolo cannabinoide ad una concentrazione superiore al 20% del peso secco dei loro fiori. Con appropriate tecniche di coltivazione si possono ottenere fitoterapici da utilizzare direttamente, se vaporizzati o con estratti di tipo tisane, riducendo di molto il costo dei medicinali. Ultimamente, mediante l'estrazione con CO₂ supercritica, i cannabinoidi vengono estratti e utilizzati per la produzione di farmaci a base di cannabinoidi naturali. Il primo registrato in molti Paesi europei (Sativex[®]) è utile per alleviare i sintomi di malattie che sino ad ora erano difficilmente trattabili (sclerosi multipla, dolori cronici).

1.3 Raccolta e conservazione di germoplasma

Alla fine della prima metà del secolo scorso l'Italia disponeva del più importante pool genico di canapa da fibra, rappresentato da: i) popolazioni eterogenee, fornite di buone capacità di adattamento anche a condizioni di stress ambientali; ii) popolazioni abbastanza uniformi ottenute per selezione massale (Carmagnola, Bolognese, Toscana, Ferrarese); iii) varietà ottenute per selezione, secondo il metodo Bredemann (Fibranova, C.S., Eletta Campana, T4, Superfibra). Successivamente la coltura è stata abbandonata per il mancato adeguamento alle

nuove esigenze socio-economiche. Di fatto, la coltivazione era scarsamente meccanizzata, perciò richiedeva un grande impiego di manodopera soprattutto per la raccolta e per le gravose operazioni di macerazione e stigliatura della fibra. Durante il lungo periodo di abbandono della coltura (oltre mezzo secolo) gran parte del germoplasma sopra elencato è andato perduto per mancata riproduzione e conservazione in purezza del seme. Tuttavia, presso l'Istituto Sperimentale per le Colture Industriali, ora CRA-CIN, con una certa lungimiranza si è provveduto, fra l'altro, al mantenimento delle varietà storiche Carmagnola, Fibranova e CS, attraverso rinnovi periodici delle loro sementi.

Nell'ultimo quindicennio c'è stato un grande ritorno d'interesse per le colture da fibra in generale e per la canapa in particolare per le seguenti tre motivazioni: 1) grande potenzialità di impiego, a livello internazionale, delle fibre naturali, sia per uso tessile, sia per impieghi alternativi: è previsto, infatti, che la richiesta mondiale di fibre passerà da 50 mln di tonnellate attuali a 130 mln di tonnellate nel 2050, conseguentemente al raddoppio della popolazione; 2) forte interesse del mondo agricolo per le colture industriali non alimentari alternative a quelle tradizionali, sempre meno remunerative; 3) crescente sensibilità per le problematiche ambientali che spinge sempre più ad utilizzare risorse rinnovabili, quali le piante erbacee da fibra in sostituzione di piante legnose (per la tutela del patrimonio forestale) o di altre colture erbacee richiedenti elevati input energetici (in termini di combustibili, diserbo chimico, concimazione, irrigazione, ecc.). La canapa, indubbiamente, risponde bene a tali esigenze, poiché presenta elevate potenzialità produttive, ridotte esigenze colturali, versatilità d'impiego, buona rusticità e capacità fitodepurative dei terreni inquinati da metalli pesanti (Przemyslaw *et al.*, 1995; Giovanardi *et al.*, 2002; Ciurli *et al.*, 2002; Di Candilo *et al.*, 2004). Inoltre, essa è in grado di soffocare le infestanti, grazie alla velocità di crescita e alle rilevanti dimensioni che gli consente di competere efficacemente per la luce. Dunque la coltura non richiede trattamenti di difesa, o di diserbo chimico e neppure l'irrigazione, per lo meno nel Nord Italia. Per tutto questo la canapa si distingue nettamente e positivamente dal cotone che è la fibra naturale oggi maggiormente impiegata e per la quale non si prevedono grossi ampliamenti della produzione, proprio a causa delle elevate esigenze energetiche della coltura. In ragione di quanto fin qui evidenziato, in molti paesi industrializzati sono state riavviate le ricerche per l'ammodernamento della coltivazione.

Tabella 3 Varietà storiche, cultivar di recente costituzione, popolazioni migliorate e accessioni di canapa collezionate presso il CRA-CIN a Bologna.

N° Acc.	Denominazione	Provenienza e anno di riproduzione	Seme disponibile (kg)	Germinabilità (%)
1	Carmagnola	Verucchi 2009	6,9	91
2	Carmagnola	Capponcelli 2002	10,0	85
3	Fibranova	Nicoli 2009	5,8	88
4	Fibranova	Budrio 2002	10,0	56
5	C. S.	Ziosi 2009	4,8	96
6	C. S.	Maccagnani 2001	10,0	77
7	Red Petiole	Bologna 2004	38,0	74
8	Red Petiole	Anzola 1999	20,0	13
9	Eletta campana	Budrio 2009	3,3	94
10	Eletta campana (non selez.)	1999	3,5	84
11	Isci 51	Ziosi 2005	18,0	83
12	Carmagnola x Kompolti	Nicoli 2005	35,0	84
13	Eletta camp. X Carm. (Pop. 1)	Bologna 2005	70,0	73
14	Superfibra X Carm. (Pop.2)	Baldo 2004	26,0	85
15	Kompolti x Fibranova (Pop.3)	Maggi 2004	27,0	89
16	Carmagn. x Fibranova (Pop.4)	Lavino 2004	85,0	90
17	Hy Superfibra x Carm. (Pop.5)	Ziosi 2004	60,0	70
18	Carmagn. x Felina 34 F4BC2	Nicoli 2007	1,6	78

19	Carmagn. x Felina 34	Ziosi 2008		73
20	Carmagnola x Uso 14	Verucchi 2008		78
21	Felina 32	Prod.Sem. 2005	2,0	67
22	Felina 34	Francia 2003	20,0	85
23	Futura 75	Francia	25,0	70
24	Futura 75	Piemonte, 2005	7,6	77
25	Felina 32	Assocanapa		73
26	Epsilon 68	Assocanapa		53
27	Santhica 27	Assocanapa		72
28	Ferimon	Assocanapa		70
29	Fedora 17	Assocanapa		76
30	Fedora 19	Francia 1999		26
31	Mono-1	2002		89
32	Mono-2	2002		56
33	Mono-3	2002		56
34	Mono-4	2002		83
35	Mono-5	2002		70
36	Mono-6	2002		76
37	Mono-7	2002		50
38	Romania	2002	2,0	66
39	Yellow Apex	Budrio 1999		79

Tabella 4 Varietà e accessioni di canapa conservate presso la sede distaccata del CRA-CIN di Rovigo.

N° Acc.	Denominazione	Origine	Conserv.	Tipo *
			(n° semi)	
1	Carmagnola/95	ITA	100	1
2	Fib_C_Gialla	ITA	30	1
3	Fib_P_Rosso	ITA	30	1
4	Silver Haze	NLD	5	4
5	Northern Light	NLD	5	4
6	USO 31	POL	500	2
7	Fedrina-74	FRA	200	2
8	Fedora-17	FRA	200	2
9	Felina-34	FRA	200	2
10	Futura-77	FRA	200	2
11	Ferimon	FRA	200	2
12	Calabrese Giamp1	ITA	20	3
13	Beniko	POL	200	2
14	Uniko B	HUN	200	2
15	Kompolti Hybrid TC	HUN	500	1
16	Calabrese Giamp2	ITA	40	3
17	DDR-15 Aschersleben	DEU	25	3
18	BO_B Mors.	ITA	70	4
19	DDR-13 Aschersleb	DEU	40	3
20	BO_D Mors.	ITA	190	4
21	BO_E Mors.	ITA	140	4
22	SiMonA	ITA	1500	2
23	Eletta Campana	DEU	100	1
24	Superfibra	DEU	100	1

Collezione di germoplasma di canapa (Cannabis sativa L.)

25	Napoletana	ITA	100	1
26	Bolognese	ITA	100	1
27	Superfibra_NL	NLD	10	1
28	Ferrarese	ITA	10	1
29	Piemontese Var 2	ITA	2000	3
30	Moden. (Noth x Haze)	NLD	10	4
31	Carma-Piero	ITA	500	3
32	Secuieni-1	ROU	200	1
33	Kompolty-A	POL	200	1
34	Kompolty-B	POL	200	1
35	Fedrina-79	FRA	200	2
36	UKR-1 -Uso-31	UKR	20	2
37	UKR-2 -Uso-14	UKR	20	2
38	UKR-3 -450208-46	UKR	20	2
39	UKR-4 -450209-33	UKR	20	2
40	UKR-5 -450210-15	UKR	20	2
41	UKR-6 -Uso-11	UKR	20	2
42	UKR-7 -450212-3	UKR	20	2
43	UKR-8 -450213 14	UKR	20	2
44	Nepalese	NPL	1000	3
45	Fr_1	FRA	100	2
46	Fr_2	FRA	100	2
47	Fr_3	FRA	100	2
48	Fr_4	FRA	100	2
49	Fr_5	FRA	100	2
50	Fr_6	FRA	100	2
51	Fr_7	FRA	100	2
52	Fr_8	FRA	100	2
53	Fr_9	FRA	100	2
54	Fr_10	FRA	100	2
55	Fr_11	FRA	100	2
56	Supermono 2001 A	ITA	100	2
57	ERMES	ITA	13	2
58	Canapa uccelli	ITA	15	3
59	Canapuccia	ITA	15	3
60	Carmono	ITA	15	2
61	Supermono 475	ITA	15	2
62	Supermono 476	ITA	15	2
63	Sepermono 478	ITA	15	2
64	Critical Mass B-17	CHE	100	4
65	Black Widow B-1	CHE	100	4
66	Medicine Man B-2	CHE	100	4
67	Super Silver Haze B-33	CHE	50	4
68	Shark Shock B-3	CHE	50	4
69	Chamaeleon	NLD	1000	1
70	Egiziana (popolazione)	EGY	1000	3
71	New Purple Power	USA	1000	3
72	New Purple Power	USA	1000	3
73	Australia n. 1	AUS	100	3
74	Australia n. 2	AUS	300	3
75	Australia n. 3	AUS	30	3
76	Conegliano IT	ITA	300	4
77	Cinese_Uccelli Armony	ITA	1000	3

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura

78	Cinese Heilonjyiang	CHN	300	3
79	Hanf_Natur	DEU	1000	1
80	Cina-Shandong	CHN	400	3
81	Anfuso_Drug	ITA	700	4
82	Delta Llosa	ESP	20000	1
83	Nebula (Paradise seeds)	NLD	10	4
84	Heaven	CHE	15	4
85	Ampezzo	ITA	40	3
86	Pesarina Val	ITA	300	3
87	Baraz-Outdoor	CHE	25	3
88	Ovaro	ITA	30	3
89	Calabrese 1	ITA	30	3
90	Calabrese 2 mix	ITA	30	3
91	Diana	ROU	500	2
92	Denise	ROU	500	2
93	Zenit	ROU	500	2
94	Heaven	CHE	18	4
95	Skunk	CHE	18	4
96	Granflora	CHE	17	4
97	Skyflight	CHE	17	4
98	Purpurea Ticinensis	CHE	17	4
99	Jan's Haze	NLD	15	4
100	Tiger Fly TF	ITA	10	4
101	Tiger Fly Cinq.	ITA	11	4
102	Inca x White Rino	ITA	10	4
103	Salento	ITA	10	3
104	Early misty x Ice	ITA	10	4
105	Super Skunk x EarlMisty	ITA	11	4
106	Heaven	ITA	10	4
107	Calabrese outdoor	ITA	16	3
108	Inca x Ice	ITA	11	4
109	Treviso Outdoor	ITA	8	3
110	Skyflight	CHE	8	4
111	Super Silver Haze	CHE	12	4
112	Spice	CHE	12	4
113	Shark Shock	CHE	12	4
114	Zenit	ROU	500	2
115	Sloazy	ZAF	30	3
116	Transkey	ZAF	28	3
117	CQ	CHE	40	4
118	Mk x Skunk	CHE	20	4
119	GB Skunk	CHE	20	4
120	Afgan x Haze	CHE	20	4
121	Mango Haze	CHE	25	4
122	Kenian	ZAF	10	3
123	Malana Artack	IDN	30	3
124	Ananda x Malana	IDN	2000	3
125	Rashol	IDN	25	3
126	Chahal	IDN	1000	3
127	Bisal	IDN	10	3
128	Erus	NPL	50	2
129	Ermo	ITA	400	2
130	Power plant (Fem)	NLD	100	4

Collezione di germoplasma di canapa (Cannabis sativa L.)

131	Black Widow	CHE	30	4
132	Super Silver Haze	CHE	30	4
133	Devil	CHE	30	4
134	Shit	CHE	30	4
135	La Nigna	CHE	30	4
136	Medicine Man	CHE	30	4
137	Shark Shock	CHE	30	4
138	Spice	CHE	30	4
139	Cronic	NLD	15	4
140	Kali Mist	NLD	15	4
141	BBSK x AfgSK2Sk	CHE	50	4
142	F1T6OB-posOB-p	CHE	20	4
143	G 13 Sk	CHE	60	4
144	WWW	CHE	100	4
145	Pure LP	CHE	100	4
146	SK3 x AS	CHE	100	4
147	Sicil 3+5+7+10+15+18	ITA	30	3
148	Afganica	NLD	5	3
149	Thai-Tanic	NLF	5	4
150	Lilly	NLD	5	4
151	Queen Mother	ESP	15	4
152	Eddy	ESP	15	4
153	SV GB-10612	CHN	20	1
154	SV GB-10613	RUS	20	1
155	SV GB-10611(Silistra)	ROU	20	1
156	SV GB-10616 Fibramulta	ROU	20	1
157	USO 31 ripr Francia	FRA	500	2
158	Felina 32	FRA	500	2
159	Santhica	FRA	500	2
160	W-1	POL	150	1
161	Silesia	POL	150	1
162	Dolnoslaskie	POL	150	1
163	Bialobreskie	POL	500	2
164	Beniko	POL	500	2
165	Kali Mist	NLD	50	4
166	B.B.	NLD	10	4
167	H.G.	NLD	10	4
168	Church	NLD	10	4
169	CRA.S.H.	NLD	10	4
170	CRA.H.# 2	NLD	10	4
171	CRA.H.# 1	NLD	10	4
172	CRA.H.# 3	NLD	10	4
173	CRA.U.# 1	NLD	10	4
174	CRA.U.# 2	NLD	10	4
175	N.H.	NLD	10	4
176	S.S.H.	NLD	10	4
177	A.M.S.	NLD	10	4
178	E.N.	NLD	10	4
179	W.R.	NLD	10	4
180	W.W.	NLD	10	4
181	Calabrese-3	ITA	50	3
182	Top 44	NLD	10	4
183	J. White	NLD	10	4

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura

184	Mazor	NLD	10	4
185	Flaze	NLD	10	4
186	Early Queen	CHE	10	4
187	CRA-N° 3	NLD	15	4
188	CRA-N° 12	NLD	20	4
189	CRA-N° 51	NLD	15	4
190	CRA-N° 52	NLD	15	4
191	CRA-N° 53	NLD	15	4
192	CRA_N° 120	NLD	15	4
193	Sri Lanka Sativa	NLD	8	4
194	NL5-HA-Mist	NLD	100	4
195	Ort_Botan_Siena C. sativ	ITA	10	1
196	Ort_B-Siena C.s. Himalajie	ITA	10	3
197	CRA- N° 7	NLD	20	3
198	CRA- N° 16	NLD	13	3
199	CRA- N°21 (W.W.)?	NLD	22	4
200	CRA- N° 64	NLD	20	4
201	IPK Can 16 Slovakei	SVN	30	3
202	IPK Can 17 Hungarn	HUN	30	3
203	IPK Can 18 Deutschland	DEU	40	3
204	IPK Can 19 Italien	ITA	30	3
205	IPK Can 20 Koreanische	PRK	40	3
206	IPK Can 21 Rumanien	ROU	30	3
207	IPK Can 22 Georgien	GEO	30	3
208	IPK Can 23 Koreanische	KOR	40	3
209	IPK Can 24 Italien	ITA	30	3
210	IPK Can 26 Turkei	TUR	30	3
211	IPK Can 27	??	30	3
212	IPK Can 28 Forose	??	30	3
213	IPK Can 30 Benburger	DEU	30	3
214	IPK Can 36	??	30	3
215	IPK Can 37 Frankreich	FRA	40	3
216	IPK Can 39 China	CHN	40	3
217	IPK Can 40 Italien	ITA	30	3
218	IPK Can 41	??	30	3
219	IPK Can 43 Deutschland	DEU	40	3
220	IPK Can 44 Fibrimon	DEU	40	3
221	IPK Can 45 Krasnodarskaya	UKR	30	3
222	IPK Can 46 Fibrimon 56	DEU	40	3
223	IPK Can 47 Turkei	TUR	40	3
224	IPK Can 48 Eletta Campa	ITA	30	3
225	IPK Can 49 Superfibra	DEU	30	3
226	IPK Can 50 Fibrimon	DEU	30	3
227	IPK Can 57 Syrien	SYR	40	3
228	IPK Can 59 Turken 494	TUR	30	3
229	IPK Can 61 Carmagnola	ITA	30	3
230	IPK Can 63 Ramo	DEU	30	3
231	IPK Can 64 Turkei	TUR	30	3
232	Cristal Haze	CHE	25	4
233	Afghan Skunk	CHE	25	4
234	Master Kush Sk x Afg-Haze	CHE	25	4
235	Dievka- Ukraina	UKR	120	3
236	Supergrass-1	ITA	200	2

Collezione di germoplasma di canapa (Cannabis sativa L.)

237	Renesto- Vir	CHN	10000	3
238	Ermo	ITA	10000	2
239	Red Alaska	JAM	10	3
240	Jamaican ICE	JAM	10	3
241	Natural Paar AG	JAM	10	3
242	Carma_CBG F4_3/7	JAM	20	2
243	Carma_CBG F3_109	JAM	1000	2
244	Eletta campana	ITA	150	1
245	Canada_Monse	CAN	300	1
246	Carma F2-805 Villazzano	ITA	200	2
247	Silistrenski	BGR	500	1
248	Krasnodarskaya-35	BGR	20	1
249	Codimono	ITA	500	2
250	Carma-CBG	ITA	500	2
251	Carmaleon	ITA	500	1
252	Carma-CBG F3	ITA	500	2
253	Monoica	CZE	500	2
254	Tygra	CZE	500	1
255	Basilea	ITA	80	4
256	Hi Moon	ITA	80	4
257	Nostrane	ITA	10	3
258	Critical Mass	CHE	30	4
259	F1 Cannatonic x 6 F	CHE	35	4
260	F1 Cannatonic x 7 F	CHE	25	4
261	Critical Haze F	CHE	6	4
262	Irene	ROU	1000	2
263	Futura 75	FRA	1000	2
264	TR-73361	TUR	50	3
265	TR-50151	TUR	50	3
266	Cina-Hempro	CHN	2000	3
267	Cina-Bio	CHN	500	3
268	Cina-Conv	CHN	500	3
269	Carmaleonte	ITA	2000	2
270	Carma-CBG	ITA	2000	2
271	Canah-Conv	CHN	1000	3
272	Canah-Bio	CHN	1000	3
273	Nepal_2	NPL	70	3

* Tipo: 1 = cv. dioica; 2 = cv. monoica; 3 = landrace o selvatico; 4 = cv. da droga.

Nella collezione mantenuta a Rovigo la quantità di seme conservato è molto limitata per le difficoltà di moltiplicazione delle diverse accessioni in isolamento, senza incorrere in problematiche legali o di sicurezza. Sono state ottimizzate le condizioni di conservazione e si mantengono i semi in buste di alluminio sigillate, a -20°C, in modo da mantenere la germinabilità del seme per almeno un decennio, in attesa di avere la possibilità di riprodurre il seme in ambiente protetto.



Figura 1 e 2 Seme di canapa selvatica proveniente dal Nepal e dalla Cina, varietà da seme in collezione



Figura 4 e 5 Piante di canapa agli estremi per dimensioni: particolarmente alta quella di destra (5 m circa) e molto bassa quella di sinistra (0.5 m)

In Italia sono stati realizzati studi per la meccanizzazione della raccolta della coltura da fibra (Di Candilo *et al.*, 2006) e da seme (De Zanche *et al.*, 2002; Di Candilo *et al.*, 2003), per la messa a punto della macerazione microbiologica in acqua della fibra (Di Candilo *et al.*, 2010) e per la ricostituzione di una vasta ed adeguata gamma di germoplasma (Di Candilo, 2007). A quest'ultimo riguardo, sono state riselezionate le varietà storiche per basso contenuto di tetraidrocannabinolo (THC), a seguito della decisione della UE di abbassare la soglia di tale composto psicotropo nelle coltivazioni da fibra da 0,3 a 0,2% della sostanza secca; sono state costituite nuove varietà dioiche (Ranalli *et al.* 1997; Di Candilo *et al.*, 2002a) e monoiche idonee alle nostre specifiche condizioni pedo-climatiche; inoltre, sono stati collezionati materiali (varietà, popolazioni e accessioni) di varia provenienza. Oggi il CRA-CIN, unico detentore di

germoplasma di canapa in Italia, dispone di una collezione comprendente complessivamente più di 300 materiali (Tabb.3 e 4).

1.4 Selezione e caratterizzazione dei materiali

La selezione di nuove cultivar attinge dal germoplasma in collezione presso il CRA-CIN e si basa su procedure di selezione classiche delle piante allogame, finalizzate prevalentemente alla costituzione di popolazioni a fecondazione libera. Sia gli incroci che gli allevamenti vengono realizzati in isolamento spaziale, per evitare inquinamenti da polline estraneo. A partire dalla seconda generazione, le popolazioni vengono sottoposte a selezione per le caratteristiche delle piante, quali: vigore vegetativo, altezza, diametro dello stelo, resistenza ai patogeni, all'allettamento e basso contenuto di THC. Sulla base di tali valutazioni, prima della fioritura vengono eliminate dal campo di allevamento tutte le piante di scarso valore, in modo da escluderle dall'interincrocio. La determinazione del THC viene effettuato in laboratorio inizialmente con metodo immunoenzimatico (Grassi *et al.*, 1997), poiché molto più veloce del metodo ufficiale gas-cromatografico e, perciò, più adatto alle esigenze di dover saggiare in breve tempo un elevatissimo numero di piante; successivamente, quando il numero di individui da saggiare si riduce, viene adottato il metodo gas-cromatografico. Inoltre, su singole piante vengono rilevate le percentuali di fibra, sottoponendo tasselli di stelo a macerazione in acqua e a stigliatura.

Le popolazioni in più avanzata fase di selezione e le cultivar introdotte dall'estero vengono sottoposte a prove di confronto in parcelle replicate per le valutazioni produttive e qualitative. Il protocollo sperimentale di queste prove si basa sui seguenti criteri operativi: i) disegno sperimentale a blocco randomizzato, con tre ripetizioni e parcelle di 20 m²; ii) semina a macchina nel periodo fine marzo-inizio aprile; iii) densità di semina pari a 150 semi m⁻², per una densità teorica attesa di 110-120 piante m⁻²; iv) raccolta in corrispondenza della piena fioritura; v) rilievo delle caratteristiche biometriche delle piante (investimento finale, altezza pianta, diametro basale ed apicale dello stelo); vi) determinazione dei contenuti di THC nelle piante; vii) valutazione delle potenzialità produttive (resa in biomassa fresca, percentuale di sostanza secca, rapporti ponderali steli/biomassa, strato corticale/stelo e resa in fibra, previa macerazione delle bacchette in vasca, stigliatura e gramolatura dello stigliato).

Tabella 5 Caratteristiche biometriche e produttive di nuove cultivar a confronto con varietà nazionali ed estere (Anzola dell'Emilia-BO, 2007).

Varietà	Altezza pianta (cm)	Diametro stelo (mm)	Sostanza secca (t ha ⁻¹)	Fibra (%)	THC (%)
Pop 1	281.3 b	10.5 a	14.8 ab	22.3 b	0.03 d
Pop 2	286.3 ab	9.9 a	15.5 a	20.2 c	0.05 c
Pop 3	279.2 b	10.5 a	13.7 ab	21.9 b	0.05 c
Pop 4	295.0 a	10.5 a	15.6 a	19.5 c	0.03 d
Isci 51	290.7 ab	9.9 a	14.9 ab	26.5 a	0.03 d
Futura 75	225.0 c	9.8 a	12.7 ac	20.4 c	0.06 b
Santhica	191.7 d	9.0 b	7.4 d	22.1 b	0.01 e
Epsilon	195.7 d	8.6 b	10.2 c	19.6 c	0.07 a
Carmagnola	287.7 ab	10.0 a	12.3 bc	18.2 d	0.03 d
Medie	259.2	9.9	13.0	21.2	0.04

Valori della stessa colonna contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente per $P \leq 0.05$ (test di Duncan).

Nelle tabelle 5 e 6 sono riportati alcuni risultati relativi alle prove per la caratterizzazione dei materiali eseguite nel biennio 2007-2008. La prima mostra che alcune nuove popolazioni dioiche ottenute per incrocio e selezione presso il CRA-CIN, in una prova di confronto svolta nel 2007 in provincia di Arezzo, sono risultate significativamente superiori rispetto a talune cultivar monoiche francesi, per dimensioni delle piante, resa in sostanza secca e percentuale di fibra.

Analogamente, in tabella 6 si può osservare che alcune nuove costituzioni si sono distinte positivamente soprattutto per produzione di fibra, sia rispetto a materiali selezionati Oltralpe,

sia rispetto alle varietà storiche italiane (Graf. 1).

Grafico 1 Rese in fibra di una popolazione migliorata (*Isci 51*) a confronto con varietà storiche italiane (*Fibranova* e *Carmagnola*) e con la cultivar francese che si adatta meglio in Italia (*Futura 75*).

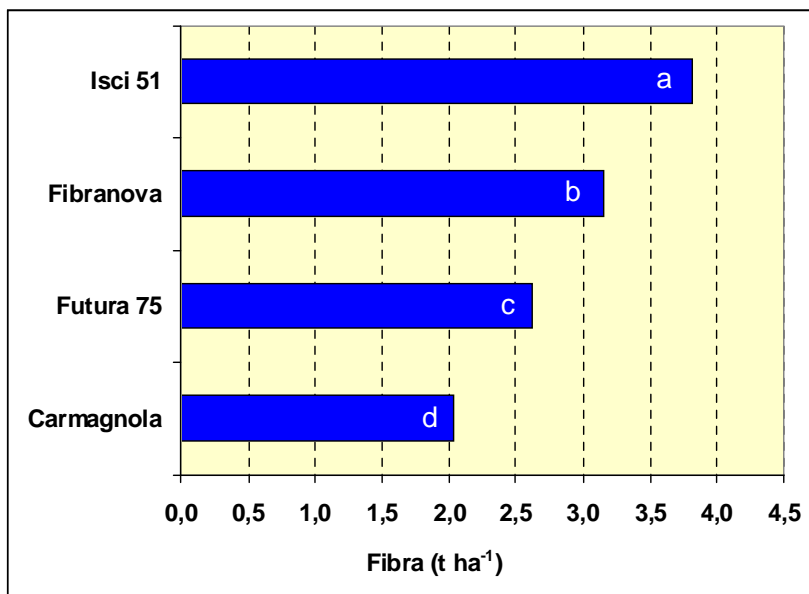
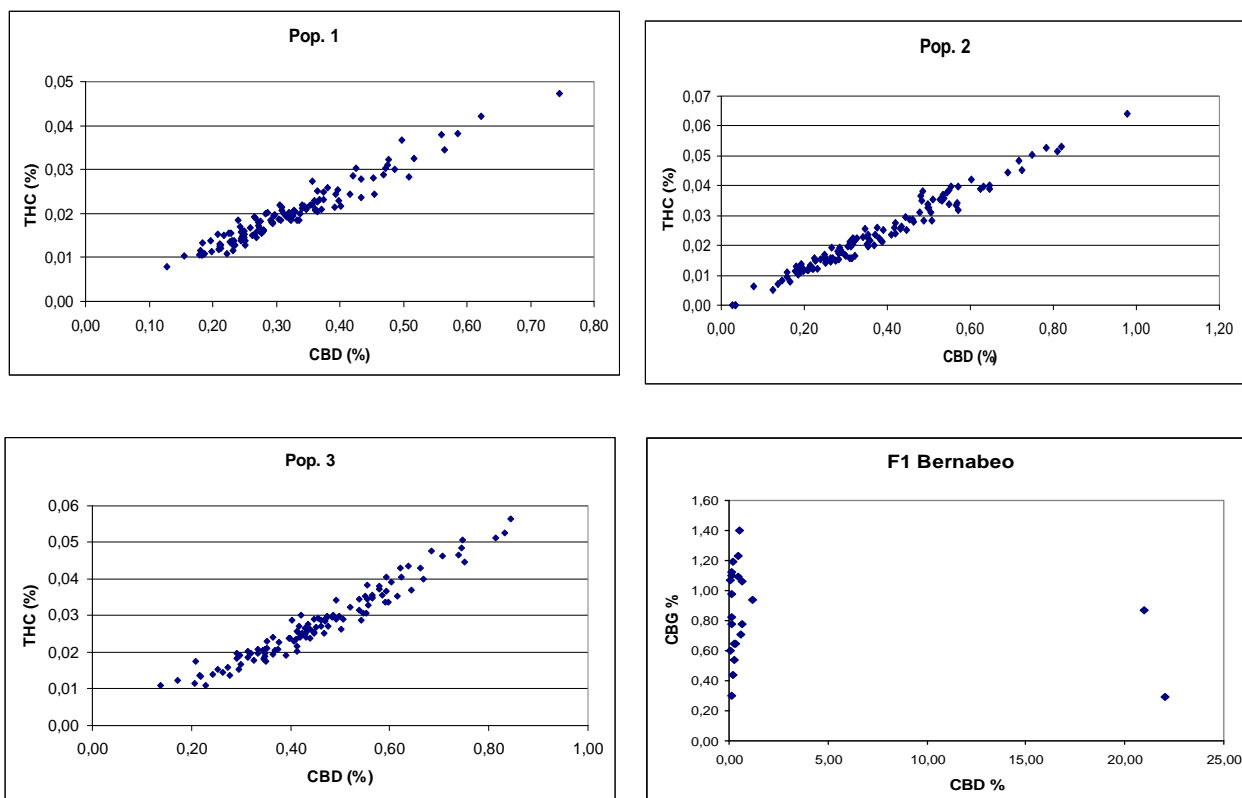


Tabella 6 Caratteristiche biometriche e produttive di nuove cultivar dioiche italiane a confronto con varietà monoiche francesi e con la varietà testimone Carmagnola. Cesa-Arezzo, 2008.

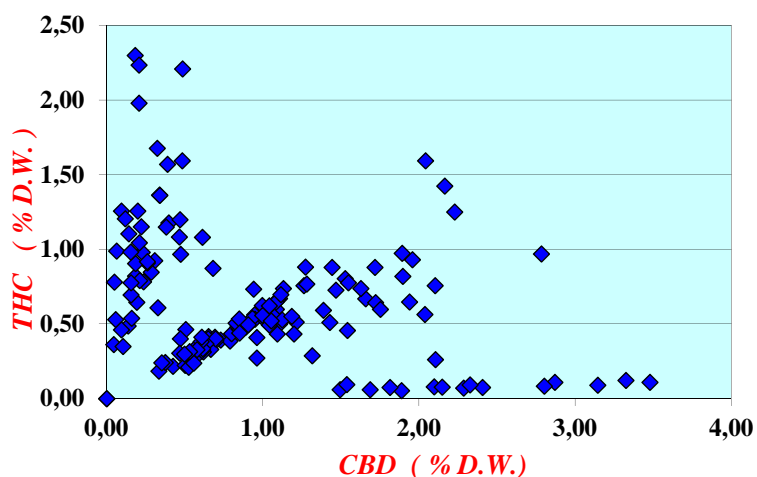
Varietà	Altezza pianta (cm)	Steli secchi (t ha ⁻¹)	Fibra		THC (%)
			%	t ha ⁻¹	
ISCI 51	355.7 a	11.4 ab	26.6 a	3.04 a	0.040 cd
Pop 1	373.0 a	9.3 bc	22.3 b	2.07 cd	0.033 d
Fibrimor (ex Pop 2)	376.0 a	13.5 a	20.3 c	2.74 ab	0.043 cd
Pop 3	375.0 a	11.9 a	21.8 b	2.61 ab	0.053 bc
Asso (ex Pop 4)	372.0 a	13.1 a	19.6 c	2.57 ac	0.037 cd
Epsilon	268.3 c	7.4 cd	19.8 c	1.47 e	0.083 a
Futura 75	316.7 b	11.2 ab	20.5 c	2.28 bd	0.063 b
Santhica	280.3 c	6.4 d	22.6 b	1.45 e	0.001 e
Carmagnola	370.0 a	11.2 ab	17.9 d	2.02 d	0.030 d
Medie	343.0	10.6	21.3	2.25	0.043

Valori della stessa colonna contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente per $P \leq 0.05$ (test di Duncan).

Collezione di germoplasma di canapa (*Cannabis sativa L.*)



I due grafici in alto e quello in basso a sinistra indicano i contenuti di THC e CBD (Cannabidiolo) nelle piante di tre nuove popolazioni di canapa; il grafico in basso a destra, invece, si riferisce ad una popolazione F1 a zero THC contenente quasi esclusivamente cannabigerolo (CBG).



Nel grafico sono indicati i contenuti dei cannabinoidi THC e CBD in una popolazione della vecchia varietà Elettta Campana: risulta evidente l'inquinamento da chemotipi ad alto THC.



Varietà ed accessioni di canapa in collezione presso il CRA-CIN a Bologna

1. 5 Selezione di canapa per uso terapeutico

Negli ultimi 5 anni, il programma di selezione della canapa si è arricchito della parte che riguarda lo sviluppo di linee che producono cannabinoidi ed altri metaboliti secondari ad elevata concentrazione, allo scopo di ottenere varietà o ibridi destinati alla produzione di principi attivi



Figura 5 Singola pianta femminile che ha subito la reversione del sesso dei fiori sul ramo destro.

ad uso terapeutico. La sintesi di un determinato cannabinoide è dovuta alla presenza di un enzima specifico che per alcune molecole, come il THC o il CBD risulta essere un carattere di tipo dominante. In altri casi, la sintesi del cannabinoide è un fenomeno più complesso e spesso legato ad uno o più caratteri di tipo recessivo. Diventa necessario procedere a ripetuti cicli di autofecondazione per arrivare alla stabilizzazione delle linee, di modo che si possano fissare i caratteri genetici coinvolti e standardizzare il profilo chimico della pianta. Per arrivare a questo risultato si è fatto ricorso ad un'efficiente e utile tecnica che consiste nella reversione del sesso unicamente delle piante femminili. Ciò si ottiene applicando, all'inizio della fase riproduttiva della pianta una soluzione a base di sali d'argento (Mohan Ram e Sett, 1982). Questo trattamento induce nella pianta femminile la produzione di fiori maschili e di conseguenza permette di effettuare un'autofecondazione di una singola pianta femminile (Fig.5).

Procedendo in questo modo, non c'è bisogno di stabilizzare ed utilizzare due distinte piante, un maschile ed una femminile, per ottenere il seme. La generazione derivata dall'autofecondazione ottenuta con la reversione del sesso sarà composta al 100% da individui femminili ed anche questo è un notevole vantaggio. Infatti, una popolazione femminile, se protetta da polline estraneo, consente di produrre fiori senza semi allegati e ciò determina un contenuto di metaboliti secondari e perciò di cannabinoidi, sensibilmente più elevato di quanto si ottiene da una pianta normalmente fecondata e con seme allegato. Al momento, tra le accessioni raccolte sono disponibili piante che sono in grado di produrre elevate concentrazioni di THC, CBD e cannabigerolo (CBG). In altre linee sono presenti cannabinoidi minori come la tetraidrocannabivirina (THCV), la cannabidivirina (CBDV), il cannabicromene (CBC), così come altre importanti molecole con attività farmacologica come il canniprene, denbinobina, canflavina A e B. Attraverso il processo di autofecondazione e selezione è stata anche ottenuta una linea completamente priva di cannabinoidi, utilizzabile come placebo nelle prove cliniche, denominata

Ermo e che quest'anno ha completato la registrazione nel catalogo europeo delle novità vegetali.

1.6 Ampliamento della collezione

È in corso l'ampliamento della collezione attraverso la raccolta di nuovi materiali di provenienza estera, con l'obiettivo di includere in essa maggiore variabilità. Si stanno tra l'altro ricercando materiali caratterizzati per avere un profilo terpenico distintivo, perché l'olio essenziale della canapa, che raggruppa quasi un centinaio di terpeni, ha ottime caratteristiche aromatiche, ricercate in modo particolare dal settore dei profumi, dei cosmetici e non ultimo dall'industria alimentare che lo usa per aromatizzare bevande.

1.7 Ringraziamenti

Il mantenimento della collezione viene realizzato con il parziale contributo del MiPAAF, nell'ambito del progetto "Risorse Genetiche Vegetali" Trattato/FAO.

1.8 Bibliografia

- Benedetti R., Ciaralli N., 1976. Variazione del contenuto di cellulosa durante il periodo vegetativo della canapa. *Cellulosa e Carta*, 26: 27-30.
- Bocsa I., Karus M., 1998. The Cultivation of hemp: botany, varieties, cultivation and harvesting. Hemptech, inc. Sebastopol, California.
- Callaway J.C., 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140: 65-72.
- Callaway J.C., Schwab U., Harvima I., Halonen P., Mykkänen O., Hyvönen P., Järvinen T. 2005. Efficacy of dietary hempseed oil in patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*. 16: 87-94.
- Ciurli A., Alpi A., Perata P., 2002. Impiego della canapa nella fitodepurazione da metalli pesanti. *Agroindustria*, 1:64-68.
- De Zanche C., Sartori L., Beria S., Di Candilo M., 2002. Meccanizzazione della raccolta della canapa da seme. *Agroindustria*, 1: 44-48.
- Deferne J.L., Pate D.W., 1996. Hemp seed oil: a source of valuable essential fatty acids. *Journal of the International hemp association*, 3: 4-7.
- Di Candilo M., 2007. Raccolta, caratterizzazione e valorizzazione di germoplasma di canapa da fibra (*Cannabis sativa L.*). *Notiziario Risorse Genetiche Vegetali*, 1-2: 18-20.
- Di Candilo M., Bonatti P.M., Guidetti C., Focher B., Grippo C., Tamburini E., Mastromei G., 2010. Effects of selected pectinolytic bacterial strains on water-retting of hemp and fibre properties. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 194-203.
- Di Candilo M., Liberalato D., Del Gatto A., Laureti D., Di Bari V., Colucci R., Tedeschi P., Postiglione L., Poli M., Diozzi M., Grassi G., Ranalli P., 2002. Comportamento morfo-produttivo e qualitativo di cultivar di canapa (*Cannabis sativa L.*) in varie località italiane. *Agroindustria*, 1:19-27.
- Di Candilo M., Ranalli P., Cappelletto P., Pasini P., 2006. Lo sviluppo della canapa tessile passa dalla raccolta meccanica. *L'Informatore Agrario* 41: 89-92.
- Di Candilo M., Ranalli P., Dal Re L., 2004. Heavy metal tolerance and uptake of Cd, Pb and Tl by hemp. *Advances in Horticultural Science*, 3: 138-144.
- Di Candilo M., Ranalli P., Diozzi M., 2003. Investigation of cultivation methods for the mechanization of hemp seed harvest. *Advances in Horticultural Science*, 1: 3-8.
- Di Candilo M., Ranalli P., Diozzi M., Grassi G., 2002a. Attività di miglioramento genetico per la costituzione di nuove varietà di canapa dioiche. *Agroindustria*, 1: 14-18.
- Giovanardi R., Marchiol L., Tassan Mazzocco G., Zuliani F., 2002. Possibilità di impiego della canapa nella fitoestrazione di metalli pesanti in terreni contaminati: primi risultati. *Agroindustria*, 1: 69-73.
- Grassi G., Moschella A., Fiorilli M.P., 1997. Evaluation and development of serological methods to detect THC in hemp. *Proceedings of the symposium: Hemp bioresource. Frankfurt (D), 27 February – 2 March*, pp. 197-201.
- Guzman M. 2003. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer*; 3: 745-55.
- Hazekamp A., Grotenhermen F. 2010. Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids 2005-2009. *Cannabinoids*; 5: 1-21.
- McPartland J.M, Russo E.B. 2001. Cannabis and cannabis extract: greater than the sum of the parts? *J Cannabis Ther*; 1: 103-32.
- Kampfer W., 2003. Durability of fibre reinforced cement. *Proceeding 4th International Symposium*

- "Materials from Renewable Resources", 11-12 Sept., Erfurt, Germany, 87.
- Karus M., Kaup M., 2002. Natural fibres in the European automotive industry & EU end-of-life vehicle directive and its consequences on the future use of natural fibres. 3rd Int. Congress & Trade Show Green-Tech-5th European Symposium Industrial Crops and Products, 24-26 April, Floriade, Netherlands, 18.
- Pate D.W., 1999. Hemp seed: a valuable food source, in Ranalli P. (Ed) Advances in hemp research, Binghamton, New York: The Haworth press, 243-255.
- Przemyslaw B., Grabowska L. and Mankowski J. 1995. Recultivation of degraded areas through cultivation of hemp. Proceedings of Biorohstoff Hanf Symposium. Frankfurt am Main, Germany 2-5 March 1995.
- Ranalli P., Casarini B., 1998. Canapa: il ritorno di una coltura prestigiosa. Ed. Avenue media, Bologna.
- Ranalli P., M. Di Candilo, A. Marino, M. Zottini, P. Fuochi, M. Polsinelli e B. Casarini, 1997. Induzione di mutanti in *Cannabis sativa* L. – Sementi Elette, 2: 49-55.
- Mohan Ram, H. Y., e R. Sett, 1982. Induction of fertile male flowers in genetically female *Cannabis sativa* plants by silver nitrate and silver thiosulphate anionic complex. Theor. Appl. Genet. 62: 369–375.
- Simopoulos A. P., Leaf A. & Salem N., 2000. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes from omega-6 and omega-3 fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 63 (3): 119-121.
- Soiela M., Viikna A., 2003. Properties of technical textiles based on low-melting PET and short flax fibre. IENICA International South Europe Symp. "Non-food crops: from agriculture to industry", 15-16 May, Bologna, Italy, 41.
- Struik P.C., Amaducci S., Bullard M.J., Stutterheim N:C., Venturi G., Cromack H.T.H., 2000. Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa*) in Europe, Industrial Crops and Products, 11: 107-118.
- Venturi G., 2004. Le colture da fibra: alcune nuove destinazioni d'uso del prodotto. Agroindustria 1: 51-55.

Capitolo 4
Collezioni Microbiologiche Batteriche

LA MICOTECA PRESSO IL CRA-FSO: UNA COLLEZIONE DI SPECIE E GENOTIPI IN AGGIORNAMENTO DINAMICO*

Responsabile Scientifico: Dr. Paolo Curir

CRA-FSO Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali
Corso Inglesi, 508 – 18038 Sanremo (IM)

Riassunto

Viene qui di seguito presentata la micoteca predisposta e gestita presso l'Istituto CRA-FSO di Sanremo, che viene mantenuta nell'ambito degli interessi scientifici che attorno ad essa gravitano e che sono finalizzati sia alla comprensione dei meccanismi che caratterizzano le interazioni ospite-parassita, sia alla conservazione di germoplasma afferente ai più importanti miceti agenti di fitopatie a carico di specie floricole ed ornamentali. Il lavoro si articola in una prima sezione, nella quale viene presentata l'attività di allestimento, preparazione e conservazione del materiale in stoccaggio, passando in rassegna le diverse metodologie messe in opera presso il laboratorio. Sono riportate le tecniche di conservazione che, nel corso degli anni di ricerca, si sono rivelate più consone al tipo di materiale trattato. In particolare, vengono esposte le tecniche di conservazione di materiale fresco a bassa temperatura, sotto paraffine inerti e dopo condizionamento a seguito di disidratazione. Nella seconda sezione si è provveduto invece a stilare un elenco delle specie e dei genotipi fungini ospitati e mantenuti presso la micoteca, sulla base della rispettiva collocazione sistematica. Sono state inserite a scopo didattico alcune microfotografie originali riguardanti specie fungine ospitate nella raccolta micologica.

Summary

In the present work, a collection of fungal species and genotypes maintained at the CRA-FSO Institute of Sanremo is presented, with the aim of showing how the constant engagement allowed to collect several examples of important fungi phytopathogenic to the main ornamental species cultivated in the Riviera dei Fiori. In a first part of the paper, the techniques used for the preparation, maintenance and storage of the fungal material are concisely described, including the storage under natural conditions at low temperatures, under paraffin oils or after dehydration/lyophilisation. In a second section, a list of the stored microorganisms is presented and scored according to their systematic classification. The microorganisms have been arranged according to class, order and family.

Some original pictures of fungal explants hosted in the collection have been added to the text.

Parole chiave

Micoteca, conservazione, funghi fitopatogeni, specie ornamentali

Keywords

Fungal collection, storage methods, phytopathogenic fungi, ornamental plants

1. La gestione della micoteca

Il mantenimento di una collezione di funghi è considerata una necessità primaria presso ogni Istituzione che si occupi, anche solamente in parte, della difesa fitosanitaria di colture ortoflorofrutticole. Una micoteca attiva riveste una particolare importanza per diversi motivi, in considerazione delle ricadute scientifiche che essa comporta a livello degli aspetti biologici,

* doi:10.4458/0986-04

microbiologici, sistematici ed epidemiologici. Tale esigenza è quanto mai viva presso una Struttura come la nostra, dove è costante e continuo il reperimento di nuovi ceppi ed isolati e si fa pertanto pressante la necessità di disporre in ogni momento di tale materiale, al fine di poter condurre adeguati studi tassonomici e patologici. L'allestimento ed il mantenimento di una micoteca ha d'altra parte sempre rappresentato un impegno prioritario per il nostro gruppo di ricerca "Biologia e Difesa", che opera costantemente lungo tre direttrici: il reperimento di nuovi isolati di specie e genotipi di miceti fitopatogeni a carico di specie di interesse floricolo ed ornamentale, il loro mantenimento in coltura axenica, la verifica e caratterizzazione dell'attività patogena specifica e della virulenza. L'attività di reperimento viene condotta sia mediante isolamento diretto del micete dai tessuti della pianta-ospite, sia raccogliendo isolati già selezionati e classificati che ci vengono consegnati da altre strutture di ricerca nell'ambito di collaborazioni scientifiche nazionali ed internazionali. La classificazione sistematica dei reperti viene effettuata a seguito di idonei esami morfologici del micelio vegetativo e delle rispettive forme riproduttive, agamiche e gamiche quando possibile (Ruzin, 1999), nonché valutando le esigenze metaboliche e la crescita su substrati selettivi del micete, anche avvalendosi delle competenze disponibili presso Enti universitari di prestigio. Dopo la classificazione, il genotipo in osservazione viene trasferito su mezzo colturale PDA od analoghi (Downes and Ito, 2001) e mantenuto in camera di crescita entro capsule Petri, in modo da ottenere colture pure del microorganismo a seguito di trasferimenti progressivi su substrato contenente antibiotici ad ampio spettro, in grado di garantire la rimozione totale di elementi batterici contaminanti. A questo punto si procede alla validazione della fitopatogenicità di ciascuna acquisizione, operandone il re-inoculo sulla specie botanica ospite e verificando quindi, a tempo debito, sia lo sviluppo dei sintomi legati ad ogni specifica fitopatia sia la presenza nei tessuti vegetali affetti dell'agente di essa responsabile.

1.1 Modalità di conservazione del materiale fungino

La tipologia di conservazione del materiale fungino è determinata dalle esigenze pratiche di laboratorio, e sostanzialmente può essere riconducibile a conservazione a breve oppure a lungo termine.

La conservazione di breve durata, convenzionalmente rapportabile ad un periodo di un anno, viene presso la nostra struttura condotta mediante la classica procedura di mantenimento su mezzo nutritivo agarizzato in capsula Petri, con rinnovo mensile del substrato di crescita mediante ri-trasferimento degli espianti e conservazione in camera di crescita a temperatura ambiente oppure a 4 °C (Kirsop and Doyle, 1984). Questa procedura richiede verifiche frequenti dello stato di purezza della coltura e della condizione del substrato di crescita, facilmente soggetto a disidratazione. La ridotta durata di questo tipo di conservazione è naturalmente finalizzata ad evitare diminuzioni di virulenza e variazioni a livello fisiologico o morfologico nel materiale conservato.

La conservazione a lungo termine viene effettuata presso la nostra struttura mediante diversi sistemi. Uno di questi è la conservazione sotto olio di paraffina, che rappresenta una procedura economica ed affidabile, consona alle nostre esigenze e competenze.

Le colture, in olio sterile di paraffina, sono conservate in appositi tubicini, sia a + 4 che a -20 °C, e di ciascuna vengono verificate periodicamente la capacità di ripresa vegetativa e di sporulazione (Buell and Weston, 1947). In altri casi si procede alla conservazione in acqua sterile bi distillata, alla temperatura di +4 °C, entro micro provette di tipo monouso pre-sterilizzate (Diogo H.C., Sarpieri, A., Pires, M. C., 2005).

Anche la tecnica di conservazione del materiale mediante congelamento a - 20 °C ha trovato una sua attuazione presso i nostri laboratori.

Il processo di raffreddamento fino a - 20 °C viene condotto in maniera lenta e progressiva, per dare modo al micelio fungino di adeguarsi gradualmente alla riduzione di temperatura, senza dover subire i danni tipicamente indotti da un congelamento repentino (American Type Culture Collection, 1991). Questo sistema ha peraltro un limite applicativo legato alla necessità di non sottoporre gli espianti congelati a cicli di scongelamento e ri-congelamento, che riducono notevolmente la vitalità del materiale biologico interessato.

Tabella 1 Elenco del materiale fungino nella micoteca

Classe Zygomycetes	
<i>Mucorales, Mucoraceae</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Mucor mucedo</i>
<i>Mucorales, Syncephalastraceae</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Syncephalis cornu</i>
<i>Endogonales Endogonaceae</i>	<i>Endogone sp. da Eucalyptus</i>
Classe Ascomycetes	
<i>Eurotiales Eurotiaceae</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>
<i>Erysiphales Erysiphaceae</i>	<i>Erysiphe polygoni</i> <i>Sphaeroteca pannosa</i>
<i>Xylariales Chaetomiaceae</i>	<i>Chaetomium globosum</i>
<i>Xylariales Xylariaceae</i>	<i>Hypoxylon fuscum</i> <i>Xylaria sp.</i>
<i>Xylariales Polystigmataceae</i>	<i>Glomerella lindemuthiana</i> <i>Glomerella cingulata</i>
<i>Xylariales Sordariaceae</i>	<i>Neurospora sitophyla</i> <i>Sordaria anserina</i>
<i>Diaporthales Gnomoniaceae</i>	<i>Gnomonia veneta</i> <i>Gnomonia aesculi</i>
<i>Diaporthales Diaporthaceae</i>	<i>Diaporthe citri</i>
<i>Hypocreales Nectriaceae</i>	<i>Fusarium spp.</i>
<i>Hypocreales Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Helotiales Sclerotiniaceae</i>	<i>Monilinia fructicola</i> <i>Monilinia laxa</i>
<i>Helotiales Dermateaceae</i>	<i>Diplocarpon rosae</i>
<i>Dothideales Dothideaceae</i>	<i>Mycosphaerella sentina</i> <i>Guignardia aesculi</i>
<i>Pleosporales Venturiaceae</i>	<i>Venturia inaequalis</i>
Classe Basidiomycetes	
<i>Aphylllophorales Schizophyllaceae</i>	<i>Schizophyllum commune</i>
<i>Aphylllophorales Polyporaceae</i>	<i>Fomes ignarius</i> <i>Polyporus versicolor</i> <i>Fomes annosus</i> <i>Ganoderma lucidum</i>
<i>Aphylllophorales</i>	<i>Corticium salmonicolor</i>

<i>Corticaceae</i>	
<i>Aphylophorales</i>	<i>Stereum purpureum</i>
<i>Stereaceae</i>	<i>Stereum hirsutum</i>
<i>Tulasnellales</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Ceratobasidiaceae</i>	

Forma-Classe **Deuteromycetes (Funghi Imperfetti)**

Forma-ordine <i>Sphaeropsidales</i>	<i>Phyllosticta minima</i> <i>Phomopsis macrospora</i> <i>Coniothyrium fuckelii</i> <i>Septoria hodgesii</i>
Forma-ordine <i>Melanconiales</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Glomerellacingulata</i> <i>Cylindrosporium filipendulae</i>
Forma-ordine <i>Moniliales</i> Forma-famiglia <i>Moniliaceae</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium italicum</i> <i>Penicillium digitatum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Monilia fructigena</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Verticillium dahliae</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Geotrichum candidum</i>
Forma-ordine <i>Moniliales</i> Forma-famiglia <i>Dematiaceae</i>	<i>Alternaria alternata</i> <i>Curvularia sp.</i> <i>Helminthosporium</i> <i>Cercospora rosicola</i> <i>Cladosporium fulvum</i>
Forma-ordine <i>Moniliales</i> Forma-famiglia <i>Tuberculariaceae</i>	<i>Fusarium oxysporum albedinis</i> <i>Fusarium oxysporum asparagi</i> <i>Fusarium oxysporum cyclaminis</i> <i>Fusarium oxysporum dianthi</i> <i>Fusarium oxysporum passiflorae</i>
Forma-ordine <i>Agonomycetales</i> (<i>Mycelia sterilia</i>)	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>

Più versatile risulta un ulteriore metodo di conservazione, già ampiamente diffuso e di efficace validità nel caso di molti funghi (Schipper and Bekker-Holtman, 1976), che presso il nostro Ente è in corso di sperimentazione e validazione, per quanto attiene alla sua applicabilità al materiale di interesse nel settore della floricoltura e specie ornamentali: si tratta della conservazione a basse temperature (circa 4 °C) di materiale liofilizzato (Lima and Borba, 2001). Questa metodologia prevede la rimozione graduale e completa dal materiale fungino dell'acqua libera e legata, condotta sotto vuoto ed a bassa temperatura in maniera da non creare danni strutturali al materiale stesso. A seguito dei risultati ottenuti finora emerge la possibilità di conservazione di svariate tipologie di materiale fungino, quali micelio, conidi, conidiofori; tuttavia, presso il nostro laboratorio i risultati migliori, verificati sulla base di una

successiva valutazione del grado di vitalità e di ripresa vegetativa dei liofilizzati, riguardano le strutture più resistenti e di dimensioni più contenute, come i conidi più minuscoli (microconidi). Naturalmente un ulteriore, fondamentale aspetto gestionale della micoteca è legato all'archiviazione, conservazione e gestione dei dati riguardanti il materiale biologico stoccato nella micoteca stessa, che deve assicurarne la più razionale ed efficiente possibilità di consultazione, reperimento e fruizione agli utenti interessati. A questo scopo, sono allestite ed aggiornate per ciascun reperto micologico apposite schede, preparate su supporto cartaceo ed elettronico e complete di un'adeguata documentazione fotografica individuale.

1.2 La classificazione del materiale fungino in conservazione

Per agevolare l'ottenimento di informazioni sul materiale disponibile presso la micoteca del CRA-FSO di Sanremo, di esso è stata predisposta una lista strutturata sulla base della collocazione sistematica. Le diverse tipologie fungine sono state pertanto ordinate e raggruppate secondo classi, ordini e famiglie di appartenenza, nell'ambito della tabella 1. Si è preferito seguire, per convenzione e comodità di consultazione, la nomenclatura e l'inquadramento sistematico di Alexopoulos (1979). Tale non recente classificazione, benché attualmente risulti in taluni casi superata da inquadramenti e da validazioni sistematiche più aggiornate, appare tuttavia essere assai più funzionale dal lato pratico, in quanto sufficientemente obiettiva e dirimente a livello di dubbi filogenetici recenti spesso insoluti o risolti solo parzialmente con la formula "incertum".



Foto 1 Conidioforo e ife con rizoidi di *Syncephalis cornu*, *Zygomycetes* (120 x)



Foto 2 Gruppi di anastomosi in *Rhizoctonia solani*, *Mycelia sterilia* (200x)

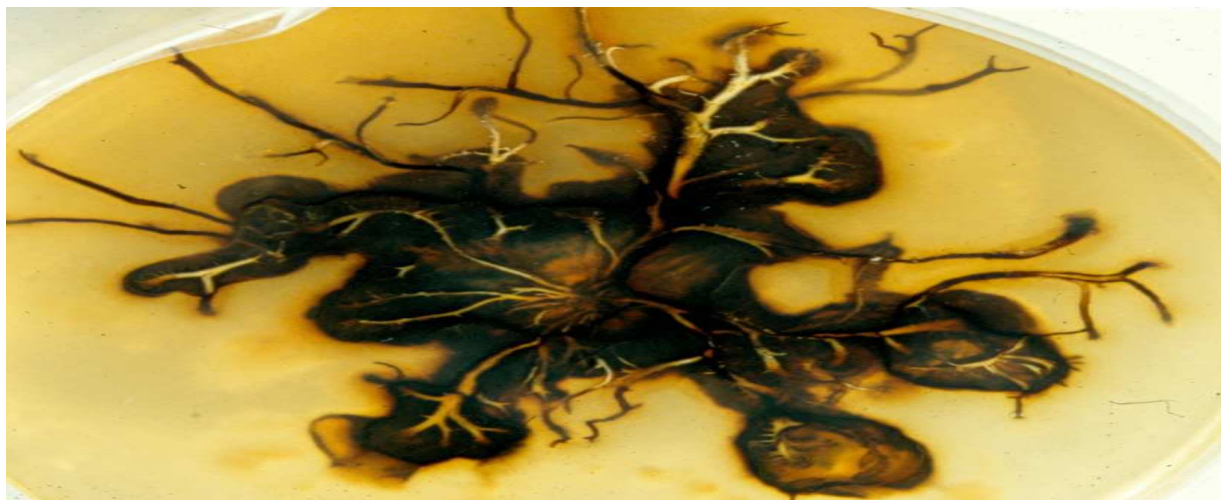


Foto 3 Rizomorfe in *Armillaria mellea*, Basidiomycetes (4x)

1.3 Ringraziamenti

Si ringrazia l'Operatore Tecnico Sig.ra Rebecchi Fulvia che con il suo impegno pluriennale nella gestione pratica della micoteca ha consentito di organizzare la collezione e di mantenerla aggiornata secondo gli standard più elevati.

1.4 Bibliografia

- Alexopoulos C.J., Mims C.W., 1979. Introductory Mycology. 3rd Ed., John Wiley and Sons, New York, USA.
- American Type Culture Collection, 1991. Preservation methods: freezing and freeze-drying. 2nd Ed., American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA.
- Buell C. B., Weston, W. H., 1947. Application of the mineral oil, conservation method for maintaining collection of fungal cultures. American Journal of Botany 34: 555-561.
- Diogo H.C., Sarpieri, A., Pires, M. C., 2005. Fungi preservation in distilled water. Anais Brasileiros de Dermatologia 80: 591-594.
- Downes F.P., Ito, K., 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Ed. APHA, Washington D.C., USA.
- Ferrari M., Marcon E., Menta A., Montermini A., 1999. Malattie e parassiti delle piante da fiore, ornamentali e forestali. Prima edizione, Edagricole, Bologna, Italia.
- Jones R.K., Benson D.M., 2001. Diseases of woody ornamentals and trees in nurseries. 1st Ed., APS Press, St. Paul, USA.
- Kirsop B.E., Doyle, A., 1984. Maintenance of microorganisms and cultured cells – A manual of laboratory methods. 2nd Ed., Academic Press, London, U.K.
- Lima R.F., Borba C., 2001. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. Review of Iberoamerican Mycology 18: 191-196.
- Ruzin S.E., 1999. Plant microtechnique and microscopy. 3rd Ed., Oxford University Press, New York, USA.
- Schipper M.A.A., Bekker-Holtman, J., 1976. Viability of lyophilized fungal cultures. Antonie Leeuwenhoek Journal of Microbiology 42: 325-328.

COLLEZIONE DI MICRORGANISMI DEL SUOLO ED APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE*

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Anna Benedetti, Dr. Alessandro Florio e Dr.ssa Loredana Canfora

CRA-RPS Centro di ricerca per lo studio delle relazioni tra pianta e suolo

Via della Navicella, 2/4 – 00184 Roma

Riassunto

I microrganismi di interesse agrario svolgono un ruolo chiave sia nella produzione di cibo (fertilità del suolo, nutrizione delle colture, biocontrollo, biofertilizzazione) sia nei riguardi della conservazione delle derrate alimentari (tossine e patogeni), sia nella produzione di alimenti trasformati (latte e formaggi, vino, olio, ecc.), pertanto la loro biodiversità è funzionale al sostentamento degli organismi viventi sulla terra. Le comunità microbiche delle filiere agro-alimentari in realtà sono strettamente correlate e il loro comportamento è il risultato di continue interazioni geniche e di competizioni nutrizionali, che si instaurano dalla messa a dimora della coltura alla trasformazione e conservazione del prodotto. Questi rapporti sono alla base di tutti i processi microbici che caratterizzano le filiere produttive, dalle produzioni vegetali al prodotto trasformato finito.

Per tutte queste ragioni è necessario, da un lato, garantire la conservazione delle risorse genetiche disponibili valorizzandone le potenzialità applicative mediante screening del germoplasma disponibile e, dall'altro, rivolgersi all'ampia frazione di biodiversità non ancora accessibile, migliorando la capacità di recupero dei microrganismi e regolandone gli aspetti normativi (proprietà, conservazione *in situ*, scambio con Paesi terzi) in funzione dei possibili benefici nei settori interessati a una loro applicazione. In questo quadro emerge l'importanza delle risorse genetiche microbiche nell'ambito del miglioramento genetico dei microrganismi e della loro valorizzazione biotecnologica, con particolare riguardo alle principali tecnologie agroalimentari, alle interazioni con i vegetali (simbiosi, micorrize, ecc.), alla fertilità dell'ecosistema suolo, nonché alle nuove applicazioni quali ad esempio la produzione di energia, di biocombustibili, ed il biorisanamento dell'acqua e dei suoli.

Summary

Microorganisms of Agricultural and Agroindustrial concern are key players in food production (soil biological fertility, crop nutrition, biocontrol, biofertilization), in foodstuffs conservation (toxins and pathogens), in food production (milk and cheeses, wine, olive oil, etc.), and in the biogeochemical cycles of nutrients for ecosystem productivity, therefore they are a crucial factor for providing life on Earth. This relatively thin layer on earth is essentially non-renewable that plays a vital resource in maintaining a functional biosphere. Microbial communities involved in food farming are strictly related and are influenced by many genomic interactions and food competitions throughout the entire farm and food supply chain.

For all of these reasons it is necessary, on the one hand, collecting the available microbial genetic resources (MGR) and on the other hand assessing microbial biodiversity not yet available, improving the ability of isolating new strains, as well as managing legislation aspects (property rights, *in situ* conservation, exchanges of microbial genetic resources). While the most visible role of agricultural uses of microorganisms is probably that of producing and delivering food, microbiology is critical to other agricultural sectors as well, for example for production of energy based on plant or other organic materials and for bioremediation of agricultural wastes.

Parole chiave

Microrganismi del suolo, collezioni di microrganismi, conservazione della biodiversità, biofertilizzazione, biorisanamento, bioindicazione

Keywords

Soil microorganisms, microbial collections, biodiversity conservation, biofertilization, bioremediation, bioindication

* doi:10.4458/0986-06

1.1. Introduzione

“Noi sappiamo di più sul movimento dei corpi celesti che non sul mondo che ci sta sotto i piedi” scriveva al suo tempo Leonardo da Vinci. Da allora non è che le cose siano cambiate di molto: sappiamo che la nostra galassia è costituita da 100 a 300 miliardi di stelle, ma ignoriamo quanti batteri, funghi, alghe e piccoli animali vivono in una tonnellata di terra. Secondo alcune stime sarebbero dell'ordine di parecchie migliaia di milioni: una cifra a quindici zeri. In una manciata di terra vi sono, cioè, più esseri viventi che uomini sulla Terra. Più facile da determinare è invece il peso che hanno tutti questi organismi sotterranei: un ettaro di terreno coltivabile ne contiene in media 5 tonnellate, 500 anni dopo, ciò che è stato scritto da Leonardo da Vinci, è altrettanto vero, e ciò vale soprattutto per i microrganismi che popolano il suolo. L'identità e il ruolo della maggior parte di questi microrganismi, rimangono un mistero, altrettanto rimane ancora poco esplorata l'importanza e la caratterizzazione della diversità microbica importante ai fini di un buon stato di salute di un suolo, soprattutto considerando la pleora di microrganismi e la loro capacità di adattamento e di cambiamento. Di tutti i tipi di microrganismi che vivono nel terreno solo l'1 per cento è stato identificato e coltivato, il che non ha nulla di sorprendente vista la loro incredibile diversità: in un grammo di terreno sono stati rinvenuti fino a 1.000 Gbp di sequenze di genoma microbici differenti. Rispetto al progetto Genoma Umano (in cui 3Gbp sono stati sequenziali) ed a progetti di sequenziamento riguardanti habitat microbici particolari come il Mar dei Sargassi (6Gbp sequenziali), il sequenziamento del meta genoma del suolo rimane rudimentale e costituisce una nuova ed ambiziosa sfida (Vogel *et al.*, 2009). L'impatto e la portata del valore economico ed ambientale che riveste la conoscenza del metagenoma, è notevole e significativo: le comunità microbiche del suolo sono una miniera d'oro per i geni e per le vie di biosintesi di biocatalizzatori come dei processi di biodegradazione, la produzione di nuovi farmaci, l'impatto sull'ecologia ambientale, sulla produzione agricola e la garanzia della qualità di questa e la fornitura di servizi ecosistemici.

I microrganismi di interesse agrario svolgono un ruolo chiave sia nella produzione di cibo (fertilità del suolo, nutrizione delle colture, biocontrollo, biofertilizzazione) che nei riguardi della conservazione delle derrate alimentari (tossine e patogeni), che nella produzione di alimenti trasformati (latte e formaggi, vino, olio, ecc), pertanto la loro presenza e la loro biodiversità è funzionale al sostentamento degli organismi viventi sulla terra.

Convenzionalmente la ricerca considera separatamente le popolazioni microbiche dei suoli, quelle saprofitarie sul prodotto vegetale in campo e quelle coinvolte nei processi di trasformazione alimentare. Le comunità microbiche delle filiere agricole in realtà sono strettamente correlate e il loro comportamento è il risultato di continue interazioni geniche e di competizioni nutrizionali, che si instaurano dalla messa a dimora della coltura alla trasformazione e conservazione del prodotto. Questi rapporti, mediati dalle condizioni ambientali e dalle pratiche colturali, sono alla base di tutti i processi microbici che caratterizzano le filiere produttive, dalle produzioni vegetali al prodotto trasformato finito.

Le diverse specie di microrganismi presenti nel suolo hanno, infatti, ruoli prioritari nelle trasformazioni dell'energia e nei processi biogeochimici, intervenendo nella decomposizione del materiale organico attraverso processi biodegradativi e nel riciclo di elementi essenziali quali carbonio, fosforo, azoto ed altri; in tal modo portano a termine specifiche reazioni di ossidoriduzione che permettono agli elementi di rendersi così disponibili in forme utilizzabili soprattutto dalle piante (Alexander, 1977).

Il numero dei microrganismi presenti nel suolo e le relative biomasse variano enormemente sia all'interno di suoli differenti che in relazione alle specie vegetali e agli altri organismi presenti. La diversità dei microrganismi all'interno di un ecosistema è quindi un elemento chiave anche per il mantenimento in uno stato qualitativamente salutare del suolo agrario (Borneman *et al.*, 1996).

Il principale ostacolo dello studio della diversità microbica del suolo è l'incapacità di coltivare in vitro oltre l'1% dei batteri presenti. I motivi dell'incapacità di crescita dei batteri nei terreni di coltura sono molteplici, tra i quali la difficoltà di riprodurre in laboratorio le condizioni nelle quali questi microrganismi proliferano nell'ambiente e la presenza di batteri che si trovano in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC), (Xu *et al.*, 1992). I batteri nello stato VBNC rimangono vitali pur non essendo in grado di dividersi in maniera sufficiente da formare colonie visibili su piastre di terreno di coltura non selettivo ed entrano in questo stato quando sono sottoposti a particolari stress ambientali, quali variazioni della temperatura, salinità, ecc.

(McDougald *et al.*, 1998; Oliver, 2005). L'uso di tecniche di biologia molecolare ed in particolare lo sviluppo della tecnica della PCR ha reso possibile lo studio della diversità delle comunità microbiche senza la necessità di coltivare i batteri, in quanto ha permesso di amplificare geni da DNA genomico estratto direttamente dal suolo.

Il marker molecolare che viene comunemente utilizzato per studiare le relazioni filogenetiche nei procarioti è il gene che codifica il 16S rRNA (Woese, 1987; Amann *et al.*, 1995). Amplificando *via* PCR il 16S rRNA da DNA genomico estratto direttamente dal suolo utilizzando primers universali per i batteri si ottiene una miscela di frammenti che possono essere analizzati sia mediante la tecnica del clonaggio che mediante tecniche di fingerprinting. Utilizzando la tecnica del clonaggio, singoli frammenti di 16S rRNA, ottenuti dall'amplificazione del DNA genomico estratto direttamente dal campione, vengono introdotti in un vettore plasmidico e quindi trasferiti in cellule di *Escherichia coli* in maniera da ottenere una libreria di cloni che possono essere separati mediante coltura su piastre di terreno di coltura agarizzato contenente agenti selettivi che permettono di selezionare i cloni che contengono ciascuno un singolo frammento amplificato del gene 16S rRNA. Il sequenziamento del frammento del 16S rRNA di ciascun clone selezionato è uno "step" fondamentale perché la comparazione della sequenza ottenuta con quelle presenti in banca dati permette di assegnare a ciascun clone una definita posizione tassonomica (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Con le tecniche di fingerprinting (quali la DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, e i T-RFLP, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) è possibile determinare il numero (*richness*) e la intensità (*evenness*) delle specie microbiche consentendo di "misurare" e confrontare il grado di diversità genetica presente.

L'utilizzo delle tecniche molecolari basate sull'analisi filogenetica del gene 16S rRNA ha messo in evidenza la presenza nel suolo di nuovi "phyla" sia tra i batteri che tra gli archaea, rivelando l'enorme diversità microbica presente in questo ambiente (Liesack e Stackebrandt, 1992; Borneman *et al.*, 1996; Bintrim *et al.*, 1997; Griffiths *et al.*, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998; Hugenholtz *et al.*, 2001). Di conseguenza, l'interesse dei microbiologi si è rivolto verso la comprensione della fisiologia e del ruolo ecologico di questi microrganismi, la cui presenza viene rilevata solamente utilizzando delle metodiche che sono indipendenti dalla coltivazione.

Mantenere in collezione i microrganismi del suolo rappresenta una necessità irrinunciabile soprattutto nel caso di studi a livello ambientale per comprendere quali pressioni realmente possano intervenire da parte dell'uomo o di eventi ambientali sul suolo, quali i cambiamenti climatici. Alcuni ceppi microbici o fungini possono essere utilizzati come biomarcatori e, quindi, fungere da eccellenti bioindicatori ambientali (Bloem *et al.*, 2006).

Il suolo in questo senso rappresenta una miniera di geni inesplorata e, dallo studio e caratterizzazione dei microrganismi del suolo, è possibile individuare i principali artefici di molti processi biotecnologici, che spaziano dalla bioenergia alla biofertilizzazione al biorecupero, alla biodegradazione, ecc.

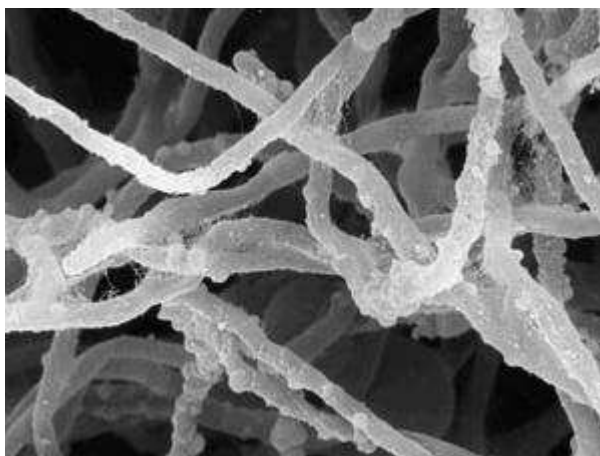


Fig. 1 *Pseudomonas putida*, batterio gram negativo largamente diffuso nel suolo. Alcuni ceppi di questa specie sono stati isolati, caratterizzati e messi in collezione presso il CRA-RPS.

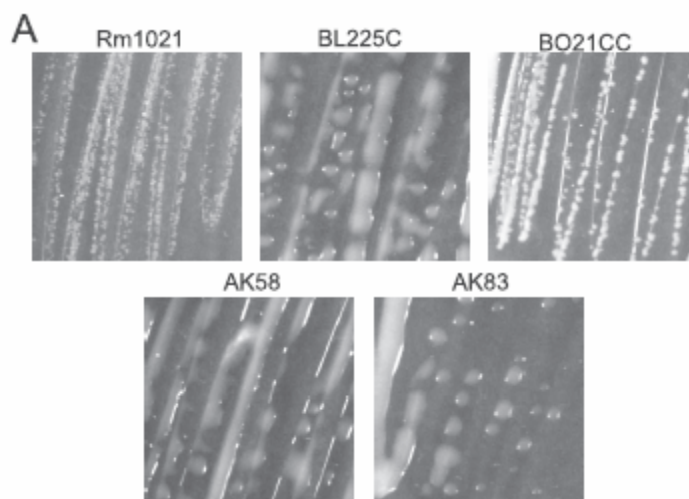


Fig. 2 Alcuni ceppi appartenenti alla specie *Sinorhizobium meliloti*, presenti in collezione e caratterizzati metabolicamente mediante la tecnologia del Phenotype microarray (Biolog) (Biondi *et al.*, 2009) disponibile presso il CRA-RPS.

1.2. Conservazione della biodiversità a livello di agroecosistema

La Convenzione Internazionale sulla Biodiversità (CBD) descrive la biodiversità agricola come "le componenti della diversità biologica relative al cibo e all'agricoltura e tutte le componenti della diversità biologica che costituiscono gli ecosistemi agricoli, anche chiamati agroecosistemi. Le varietà e la variabilità degli animali, delle piante e dei microrganismi a livello genetico, di specie e di ecosistema, necessari a mantenere le funzioni chiave degli agroecosistemi, la loro struttura ed i loro processi".

La Strategia nazionale per la biodiversità (7 ottobre 2010, www.minambiente.it) pone tre obiettivi principali per la conservazione della biodiversità il primo dei quali è quello di massimizzare la salvaguardia e il recupero della biodiversità e dei servizi ecosistemici al fine di garantire il ruolo chiave per la vita sulla Terra e il benessere umano. Il secondo vuole favorire l'adattamento delle specie e degli ecosistemi naturali e semi-naturali ai cambiamenti climatici e adottare le opportune misure di mitigazione, mentre il terzo integrare la conservazione della biodiversità nelle politiche economiche e di settore.

Ai microrganismi del suolo è deputata la conservazione dei servizi ecosistemici che si svolgono nel suolo (Bunning and Jimenez, 2003). Tra i principali troviamo:

- ✓ decomposizione e ciclo della sostanza organica ad opera dei decompositori primari: batteri, funghi ed attinomiceti;
- ✓ regolazione della disponibilità degli elementi nutritivi e loro asportazione da parte delle colture, imputabile a funghi micorrizici, attinomiceti, batteri azoto fissatori, batteri e archaea ammonio-ossidanti, ecc.;
- ✓ controllo dei patogeni e difesa, tra cui possiamo ricordare quali biopesticidi i Batteri (*Bacillus thuringensis*, *Pseudomonas fluorescens*, ecc.) funghi (*Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, ecc.);
- ✓ mantenimento della struttura del suolo e regolazione dei processi idrologici;
- ✓ scambi gassosi e sequestro del carbonio;
- ✓ disinquinamento;
- ✓ sviluppo delle piante.

È stato anche attribuito un valore economico ai diversi servizi ecosistemici garantiti dal biota suolo (Pimentel *et al.* 1997) (Tab. 1).

Attività	Biodiversità del suolo coinvolta	Beneficio economico mondiale (miliardi /\$/a)
Riciclo rifiuti	Batteri, funghi, attinomiceti	760
Formazione di suolo	Microrganismi, vermi, mes.	25
Azotofissazione	Organismi diazotrofici	90
Biorecupero inquinanti	Microrganismi	121
Biotecnologie	Microrganismi	6
Difesa	Microrganismi	160

Tab. 1 Alcuni esempi di attribuzione di un valore economico ai servizi ecosistemici garantiti dal biota suolo (Pimentel *et al.*, 1997)

I microrganismi presenti nel suolo si possono suddividere in batteri, archaea, funghi, lieviti, microalghe (microflora) e protozoi (microfauna) (Metting, 1993). L'insieme delle cellule di uno stesso tipo, che siano batteriche o meno, che risiedono in un singolo habitat formano una popolazione e insieme di popolazioni interagiscono per formare una comunità (Boyd, 1992). Le comunità microbiche interagiscono con le comunità di macro-organismi e con l'ambiente definendo un ecosistema. La composizione delle comunità (cioè l'insieme delle specie microbiche presenti in un dato ambiente) può variare nel tempo in conseguenza dei cambiamenti che si verificano nel microambiente o per azione dei microrganismi che ne fanno parte (o di quelli che vi vengono immessi) e/o a causa di variazioni climatiche, topologiche, biochimiche e antropologiche. Inoltre molti microrganismi possono mantenere la medesima composizione all'interno di una comunità, ma modificare alcuni processi metabolici con conseguenze a livello funzionale ed ecologico.

Ai microrganismi del suolo vengono perciò applicate anche le più moderne teorie evoluzionistiche che correlano la variabilità e le capacità adattative che consentono al patrimonio genetico delle singole specie di evolversi progressivamente e quindi sopravvivere ai cambiamenti che possono intervenire nell'ambiente (Ohtonen *et al.*, 1997).

I microrganismi, rispetto ad altri organismi viventi presentano dei vantaggi molto importanti nel mantenimento dei diversi servizi ecosistemici in cui sono coinvolti riconducibili proprio alla loro biodiversità e precisamente:

- ✓ **Abilità** (funzione): ciascun organismo ha una o più di una abilità a svolgere una o più di una funzione;
- ✓ **Interazione**: molti organismi hanno la capacità di influenzare direttamente o indirettamente l'azione di altri organismi (più complesso risulterà il network più adattabilità svilupperà il sistema e maggiormente resiliente a pressioni esterne);
- ✓ **Ridondanza**: è una proprietà importantissima in termini ecologici che consente la conservazione della funzione e l'adattabilità a pressioni esterne.

L'approccio "sistemico" per la conservazione della biodiversità permette la valutazione complessiva dei fenomeni che avvengono all'interno dell'agroecosistema e l'individuazione delle interrelazioni tra i diversi processi. La biodiversità interviene in modo molto significativo nei processi di regolazione interni all'agroecosistema: la biodiversità del suolo (micro, meso e macro fauna) è fondamentale per il mantenimento ed il miglioramento della fertilità del suolo; la biodiversità vegetale è lo strumento per il potenziamento della difesa naturale delle colture (presenza di insetti predatori utili etc.). Le micro-reti, dove si trovano i microrganismi (batteri, alghe, lieviti e funghi) e la microfauna, legati alla pellicola d'acqua nelle porosità del suolo, alla rizosfera e alla lettiera, svolgono un ruolo fondamentale a livello locale, partecipando alla formazione di associazioni simbiotiche di specie ed esercitando funzioni indispensabili per l'ecosistema, sebbene in un'area d'azione assai ristretta, nell'ordine di qualche centimetro cubico. Il tempo di sviluppo di una sequenza successionale ("tempo ecologico") è nell'ordine di giorni o mesi; il "tempo di turnover biologico" (vale a dire quello necessario ai flussi di nutrienti

per ricolmare le riserve di nutrienti) varia da un giorno a una settimana. All'interno delle meso-reti interagiscono i cosiddetti "trasformatori della lettiera" (mesofauna, forme larvali di macrofauna), che hanno funzioni di regolazione e disseminazione delle micro-reti, di apertura e rivestimento dei microcanali di aerazione del suolo, di triturazione e digestione della materia organica in decomposizione (che aumenta la superficie attaccabile dalle micro-reti) e di formazione di complessi organici ed organo-minerali, sequestrando alcune sostanze e mobilizzandone altre. L'ordine di grandezza spaziale varia da qualche centimetro a pochi metri; il tempo ecologico varia da una settimana a qualche mese, il tempo di turnover biologico da giorni a mesi. Le macro-reti includono i cosiddetti "ingegneri del suolo" (come termiti, formiche e lombrichi), in grado di spostarsi liberamente nel suolo. Essi hanno la capacità di poter modificare in modo notevole anche ampi tratti di terreno (si pensi all'impatto sul territorio di un termitaio), scavando cavità che permettono una circolazione agevolata dell'acqua, consumando in misura rilevante la sostanza organica in decomposizione e controllando in numero e qualità le sottostanti reti. Il tempo ecologico varia da qualche settimana a mesi, quello di turnover biologico impiega dei mesi, anche degli anni (Pokarzhevskii, 1996).

La biodiversità dei microrganismi del suolo, in virtù della varietà dei processi chimico-metabolici coinvolti, ha perciò un ruolo importante nel mantenere gli ecosistemi naturali in uno stato funzionalmente efficiente. L'equilibrio che si instaura nell'ecosistema microbico del suolo, dovuto alla stabilizzazione delle interrelazioni funzionali tra i vari microrganismi, si riflette positivamente sulle piante e, conseguentemente, sulla comunità animale sovrastante.

A livello di macroscala la diversità può essere descritta con differenti gradi di risoluzione e questo tipo di catalogazione può essere applicato anche alla diversità microbica del suolo. Whittaker (1972) propone di distinguere la diversità delle specie in funzione dei diversi habitat (α -diversità), la distribuzione lungo gradienti di habitat (β -diversità), come gli orizzonti di un profilo di suolo, e la ricchezza di specie in un determinato habitat (γ -diversità).

Numerosi sono i fattori noti che possono interagire con il biota come ad esempio condizioni di eterogeneità spaziale e temporale (trattenuta d'acqua, presenza di nutrienti, aggregazione, composizione granulometrica, ecc.), nonché fattori negativi di stress o positivi che vanno direttamente ad interagire con il potenziamento della stabilità, resilienza e resistenza agli stress ed in ultima analisi con la produttività delle specie vegetali.

Intorno agli anni '50 si è sviluppata la teoria secondo la quale i concetti di diversità biologica e stabilità ecosistemica sono direttamente relazionate per cui la fluttuazione delle popolazioni fornisce una misura della stabilità dell'ecosistema. MacArthur (1955) ha ipotizzato che la stabilità di una comunità microbica dipende sempre dalle reti trofiche del sistema piuttosto che da fenomeni di autoregolazione da parte di certe specie. Secondo questa ipotesi in un ecosistema dotato di numerose vie metaboliche ed energetiche l'alterazione di una specie determina un effetto minore sulle altre specie presenti di quanto potrebbe causare la medesima alterazione a carico di una specie di un ecosistema dotato di una scarsa rete energetica. Tuttavia ancora oggi, a distanza di cinquant'anni, ancora non si dispone di evidenze sperimentali a riguardo.

Sulla base del modello proposto da MacArthur sono nate numerose teorie ecologiche per spiegare la relazione tra la biodiversità e la stabilità o la produttività di un suolo (Lynch *et al.*, 2004). Una di queste è la "ipotesi dell'eterogeneità delle risorse" (Resource heterogeneity hypothesis - RHH) proposta da Tilman (1982): essa parte dal presupposto che un suolo uniformemente arido avrà una bassa biodiversità. All'aumentare della fertilità del suolo, aumenteranno anche la distribuzione e la diversità delle risorse nutrizionali determinando, di conseguenza, un incremento della biodiversità e della produttività. Ad un certo punto però la tendenza si inverte e ad una elevata fertilità del suolo corrisponde un abbattimento della eterogeneità delle risorse e quindi della biodiversità. Questo fenomeno è dovuto al fatto che, all'aumentare della fertilità, il suolo si avvicina sempre di più ad un plateau di nutrienti che saranno uniformemente distribuiti su tutto il suolo, selezionando così quei microrganismi che meglio si adattano a quelle condizioni.

Alla luce di quanto detto finora, molti autori ritengono quasi più importante la distribuzione della biodiversità nel suolo piuttosto che una sua semplice "misura" (Curtis and Sloan, 2005). Ad esempio Gans e collaboratori (2005) ritengono che sia più utile avere una mappa "grezza" della diversità microbica totale del suolo anziché una descrizione dettagliata di una piccola parte di essa, allo stesso modo in cui un esploratore troverebbe più utile una mappa di una

regione, anche se semplice ed approssimativa, piuttosto che la descrizione dettagliata di un picco.

La biodiversità è costituita dalla diversità e dalla variabilità sia di origine ambientale che alimentare. Sarebbe opportuno considerare anche altre origini, non strettamente agroalimentari da cui trarre biodiversità impiegabile in campo agrario. Nel settore ambientale *in sensu lato* esistono tutta una serie di realtà da considerare, la cui biodiversità è impiegabile in campo agrario. Si consideri per esempio la biodiversità che si sta formando nelle discariche, negli impianti di produzione del metano e nei siti inquinati. Tutta questa microflora può essere impiegata per esempio per la valorizzazione *in situ* delle biomasse di scarto delle produzioni agrarie.

1.3. Le collezioni di microrganismi *ex situ*

Le collezioni microbiche permettono il mantenimento *ex situ* delle risorse genetiche microbiche sottoforma di ceppi distinti in coltura pura (<http://www.cnr.it>; <http://wdcm.nig.ac.jp/hpcc.html>; <http://www.dsmz.de>; <http://www.ukncc.co.uk>; <http://www.kent.ac.uk/bio/beg/englishgenearchivecontent.html>).

Si possono distinguere diversi tipi di collezioni in base alle finalità che si propongono:

- ✓ Collezioni tassonomiche: si tratta di collezioni che raccolgono ceppi di varia derivazione, ma comunque identificati a livello di specie in maniera inequivocabile secondo gli standard del momento (www.biodiv.org; <http://bccm.belspo.be/lmg.html>);
- ✓ Collezioni brevettuali: queste collezioni raccolgono ceppi naturali, ingegnerizzati e/o soggetti a miglioramento genetico su cui sussistono rivendicazioni brevettuali;
- ✓ Collezioni di lavoro: ogni laboratorio tende a mantenere i ceppi isolati e studiati per tutto il tempo del loro impiego. L'avvento dei sistemi di crioconservazione ha incoraggiato il mantenimento di tali colture anche per tempi più lunghi;
- ✓ Collezioni di servizio: si tratta di collezioni tassonomiche con disponibilità a fornire servizi di mantenimento, identificazioni, etc. (<http://www.ncimb.co.uk/index.php>);
- ✓ Collezioni applicative e settoriali: si tratta di collezioni per settori specifici (fitopatologico, alimentare, ambientale, ecc.) e possibilmente finalizzate al mantenimento della biodiversità ed alla sua reintroduzione. Tali collezioni debbono minimizzare la selezione indotta dall'isolamento e dal mantenimento in laboratorio e in collezione. Queste collezioni sono particolarmente finalizzate al binomio "conservazione e valorizzazione" (Cardinali, 2009).

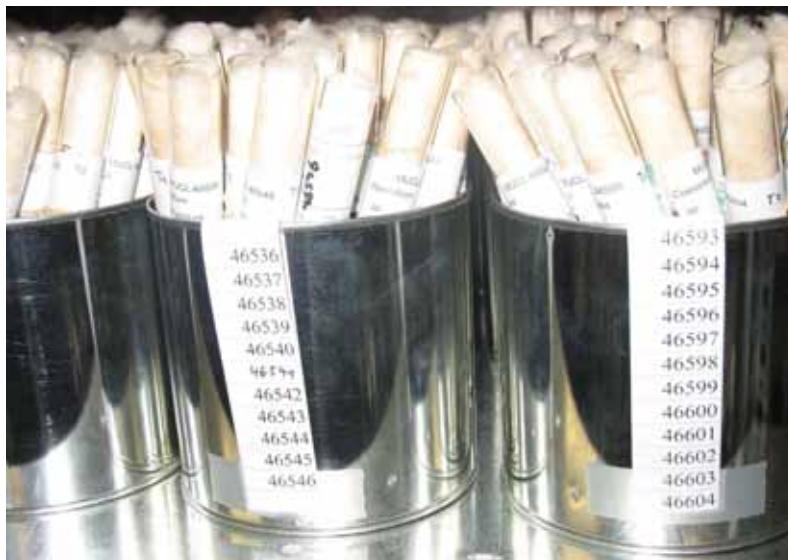
Moltissime delle collezioni in uso sono collezioni cosiddette "di lavoro", che forniscono quindi il materiale vivente per scopo di studi, per cui quotidianamente subiscono manipolazioni.

Diverso è il caso delle collezioni certificate a standard, prodotte per conservare in condizioni standard e secondo protocolli internazionali concordati isolati viventi per scambio e trasferimento certificato.

Come già detto, realizzare una collezione di microrganismi del suolo risulta più complesso della raccolta in collezione di altri microrganismi di interesse agrario in quanto è noto dalla letteratura che solo l'1% dei microrganismi che vivono nel suolo è coltivabile e quindi isolabile, caratterizzabile e conservabile in collezione (Lynch *et al.*, 2004). Poiché una collezione di microrganismi del suolo dovrebbe consentire la caratterizzazione del suolo stesso nella sua complessità funzionale e genetica, è di fondamentale importanza ed utilità tenere in considerazione oltre al singolo individuo anche tutti i microrganismi non coltivabili.

Fondamentale aspetto della conservazione *ex situ* è il concetto di tenere fuori dall'ambiente d'origine una frazione specifica di tutta la biodiversità per conservarla e poi, magari riutilizzarla. Tale strategia è stata di grande efficacia in tutti i casi in cui il microrganismo agisca come una coltura pura nel suo ambiente di prelievo.

Anche se la conservazione *ex situ*, cioè in laboratorio, rappresenta solo una piccolissima parte della realtà ambientale, essa risulta essere estremamente utile ed interessante per conservare e studiare *ex situ* organismi riconosciuti artefici di un determinato processo od azione e, soprattutto, per applicazioni di tipo biotecnologico.



Figg. 3-4 Collezione coordinata di risorse genetiche microbiche *ex-situ* presso la Facoltà di Scienze Agronomiche dell'Università Cattolica di Louvain-MUCL – unità di Microbiologia MBLA (Belgio). Essa è in grado, su richiesta, di fornire microbi di interesse biotecnologico dotati di particolari proprietà funzionali (es. attività probiotica, attività antimicrobica nei confronti di batteri patogeni, etc.) <http://bccm.belspo.be/lmg.html>.

1.4. Le collezioni di microrganismi *in situ* (o *on farm*)

Gli elevati costi di mantenimento delle collezioni *ex situ* e la bassa capacità di isolamento delle specie portano alla conclusione che è probabilmente saggio effettuare anche conservazione dei substrati *in toto* da lasciare alle future generazioni che, magari, sapranno isolarne e studiarne meglio la microflora. Questa operazione permetterebbe di ridurre drasticamente i costi di conservazione a lungo termine, ma richiede un'attenta ricerca per stabilire le condizioni migliori di conservazione dei substrati per periodi lunghi o lunghissimi.

La conservazione *in situ* prevede lo studio e la conseguente valutazione della biodiversità microbica associata ad una determinata coltura o specie vegetale. È noto dalla letteratura che ogni specie vegetale rilascia nel suolo, in funzione anche delle caratteristiche pedoclimatiche ed ambientali, essudati radicali, che selezioneranno una determinata popolazione microbica. Si verranno a creare dei microambienti edafici che costituiranno reti trofiche specifiche associate alla pianta. Questo comporta che soprattutto nel caso delle specie vegetali tipiche o a rischio erosione una conservazione del solo germoplasma vegetale *ex situ*, potrebbe non garantire il desiderato risultato di conservazione.

Pertanto, questo tipo di approccio consente di affrontare temi quale la tutela della tipicità e produttività delle colture e il miglioramento della qualità delle produzioni agroalimentari di pregio con un approccio ecosistemico pianta-suolo-microrganismo.

Le comunità batteriche e fungine hanno funzionalità e distribuzione diverse nei suoli, con un rapporto diverso nei confronti delle piante, pertanto la "lettura" di un sistema agricolo attraverso questi due indicatori microbici permette un approccio completo allo studio della ecologia microbica dei suoli agrari. Inoltre, conservare i microrganismi *in situ*, oppure meglio, sarebbe dire *on farm* può essere praticato congiuntamente alla conservazione del germoplasma vegetale. Là dove verranno condotte azioni conservative di germoplasma vegetale sarà necessario conservare i microrganismi del suolo.

Per cui, nel caso della conservazione della biodiversità in funzione della conservazione della fertilità del suolo e delle sue funzioni legate ai servizi ecosistemici da esso garantiti, questa va tutelata e garantita attraverso l'attivazione di collezioni *in situ-on farm*.

Sarà il monitoraggio *in situ* spazio temporale a garantire la salvaguardia della biodiversità microbica (Cardinali and Benedetti, *in press*).

1.5. Le collezioni di microrganismi *in factory*

Da aspetti geografici, socio-politici e di cultura locale si è originata la biodiversità microbica agroalimentare. Molta di questa biodiversità è rimasta nei singoli impianti e tutt'ora potrebbe essere mantenuta in essi, mediante un approccio di conservazione microbica *in factory*.

La conservazione delle colture *in factory* consiste nel loro mantenimento nelle condizioni d'uso normale. Due diverse maniere di conservazione possono essere messe in atto: *conservazione dinamica* e *conservazione statica* (Cardinali, 2009).

La *conservazione dinamica* è quella che non pone significative restrizioni all'uso delle colture, salvo l'introduzione o la miscelazione con colture di altra provenienza. Questa conservazione potrebbe non mantenere la biodiversità né a livello delle comunità, né a livello delle singole componenti e rispecchia in qualche modo l'andamento evolutivo aperto a inconvenienti di vario tipo (es. contaminazioni da materie prime) come a selezioni interne al microbiota.

La *conservazione statica* è molto restrittiva e cerca di mantenere la coltura in condizioni tali da evitare cambiamenti di qualsiasi natura. Nella conservazione statica devono essere evitate le contaminazioni (soprattutto se massicce) da parte del microbiota delle materie prime, l'introduzione o la miscelazione con altre colture anche se provenienti dalla stessa area, i cambiamenti di tecnologia, la contaminazione ambientale di qualsiasi tipo (Cardinali, 2009).

1.6. Potezialità applicative di interesse biotecnologico di una collezione di microrganismi del suolo

Molti sforzi a livello di ricerca sono stati sino ad oggi rivolti a trovare una soluzione al problema della coltivabilità dei microrganismi del suolo e si è andata affermando a livello microbiologico l'interesse per lo studio del metagenoma suolo, quale modello nella caratterizzazione e conoscenza della diversità genetica e funzionale dei microrganismi e di raccordo complessivo delle conoscenze a livello microbiologico.

Si è stimato che possono essere presenti in media 1000 Gbp di sequenze di genoma microbico per grammo di suolo (Vogel *et al.*, 2009). Si può ottenere una conoscenza delle specie microbiche che vivono nel suolo attraverso il sequenziamento del DNA estratto con un miglioramento notevole della conoscenza del sistema e con notevoli benefici anche di tipo economico. Tale approccio è definito come studio del metagenoma del suolo. Si tratta di una notevole sfida, basti pensare che il sequenziamento umano ha riguardato 3 Gbp e quello del genoma microbico del Mar dei Sargassi ha riguardato 6 Gbp. Tuttavia i recenti sviluppi delle tecniche di sequenziamento hanno reso questo obiettivo possibile.

Il sequenziamento del genoma del suolo consentirebbe, ad esempio:

- ✓ lo studio della biodiversità del suolo e la tutela delle risorse genetiche autoctone;
- ✓ lo studio dei fattori microbiologici implicati nel miglioramento della fertilità del suolo;
- ✓ la delucidazione delle interazioni tra microrganismi e piante;
- ✓ la scoperta e il potenziale sfruttamento di microrganismi benefici in agricoltura (es. per trasformazioni bioenergetiche per la produzione di biogas, bioetanolo, bioenergia, biodigestione e bioconversione di residui organici);
- ✓ la scoperta di nuovi geni e nuove funzioni metaboliche per i processi di biorisanamento e biotrasformazione (uso di enzimi nei processi industriali);
- ✓ la scoperta di microrganismi responsabili della formazione e della produzione di biofilm per applicazioni biotecnologiche di biorisanamento (biofiltri), degradatori di sostanze indesiderate, recupero di aree marginali;
- ✓ lo studio per il miglioramento delle potenzialità di accumulo di carbonio (carbon sink) da parte del suolo;
- ✓ l'identificazione di nuove molecole ad attività farmacologica (antibiotici).

1.6.1 La sfida della metagenomica

I microrganismi popolano l'universo, anche se non siamo abituati a vederli ad occhio nudo, sono essenziali per ogni processo della vita umana e della vita sulla terra. Un corpo umano contiene dieci volte più cellule batteriche che umane e le centinaia di specie diverse di batteri che tappezzano la nostra pelle e le nostre cavità, non sono viaggiatori clandestini, ma regolano molte delle nostre funzioni (dall'accumulo di adipe sino all'immunità). Costituiscono insomma il Microbioma umano, una delle sorgenti straordinarie di diversità individuale. In ogni processo nella biosfera sono coinvolti attivamente i microrganismi in grado di trasformare il mondo che li circonda. I cicli che trasformano gli elementi chiave della vita in sostanze accessibili, (ciclo dell'azoto, del carbonio, ossigeno, e zolfo) sono tutti in gran parte diretti e dipendenti dall'attività microbica (Voget *et al.*, 2009). Tutte le piante e gli animali sono strettamente associati alle attività microbiche che rendono loro accessibili le sostanze nutritive necessarie. Attraverso processi quali la fermentazione, i microrganismi creano o aggiungono un valore aggiunto a molti alimenti alla base della dieta umana. La tecnologia delle fermentazioni ebbe proprio origine con l'utilizzo dei microrganismi per la produzione di alimenti (formaggi, yogurt, carni, ortaggi conservati, birra, vino ed altri alcolici); questa coinvolge una gamma ampia e diversificata di reazioni complesse, che sono catalizzate da enzimi presenti in particolari microrganismi e dipendono criticamente dalle condizioni chimico-fisiche dell'ambiente circostante dei microrganismi stessi. Noi dipendiamo dai microrganismi per rimediare farmaci e sostanze utili, così come petrolio e sostanze chimiche. I microrganismi associati al corpo umano a livello intestinale e alla bocca ci consentono di digerire e quindi rendere disponibile l'energia necessaria. Queste attività sono condotte all'interno di complesse comunità che si adattano in maniera molto rapida e flessibile ai cambiamenti ambientali. Storicamente lo studio, si è concentrato sui microrganismi in coltura pura, limitando fortemente la conoscenza di queste complesse comunità; tuttavia si conosce abbastanza per affermare che, i microrganismi come comunità, giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento della stabilità ambientale. La conoscenza dei microrganismi è stata per così dire di "laboratorio", microscopi e mezzi di coltura messi a punto per la crescita ottimale, hanno permesso lo studio solo dell'1% circa dei microrganismi.

Cosa accade allora nel suolo, la "zona critica" della terra? Le nuove tecnologie di genomica e metagenomica che permettono di caratterizzare i cosiddetti microbiomi umani possono essere applicate al suolo?

La necessità di mantenere in vita i microrganismi e utilizzarli successivamente come fonti di variabilità genetica di sicura caratterizzazione, è argomento fortemente sentito già dalla metà dell'ottocento dove si diede molto spazio al conseguimento dell'isolamento dei microrganismi ed al loro mantenimento.

Le collezioni di microrganismi hanno l'obiettivo di fornire materiale biologicamente utile, fenotipicamente/geneticamente caratterizzato utile ai fini di applicazioni biotecnologiche di interesse non solo agrario, ma anche industriale ed ambientale. Il suolo rappresenta una fonte preziosa di geni che restano ad oggi per la maggioranza, sconosciuti e poco caratterizzati geneticamente.

La metagenomica, ovvero lo studio degli insiemi di tutti i genomi presenti in natura (Rondon *et al.*, 2000), quindi della pianta, del suolo, del sistema pianta-suolo e non solo di questi, renderà possibile, solo in pochi anni, un'indagine molto più specifica ed approfondita dei microrganismi e delle comunità complesse in cui vivono. Come la genomica stessa, la metagenomica, è sia un insieme di tecniche di ricerca che un campo di ricerca, in grado di superare il limite dell'"incoltivabilità" dei microrganismi come la difficoltà di studiare e caratterizzare la diversità microbica. Alla ricerca in laboratorio viene associato un approccio computazionale al fine di massimizzare la comprensione della composizione genetica e dell'attività delle comunità microbiche. Gli organismi individuali si configurano come unità di una comunità e la metagenomica si propone di complementare e stimolare la ricerca delle unità individuali e delle attività che essi svolgono.

Il successo della metagenomica del suolo dipende dalla combinazione di un'intelligente selezione dei campioni, di un DNA efficiente in termini di qualità e di quantità e quindi di un buon metodo di estrazione del DNA, clonaggio, strategie di screening e approcci di sequenziamento, insieme ad un sistema aperto di gestione dei dati e condivisione di questi, quindi insieme ad un imprescindibile approccio computazionale (The new science of Metagenomic, 2007). È chiaro che l'area della metagenomica, è riconosciuta come una competenza chiave per applicazioni industriali di tipo biotecnologico; la ricerca è in rapida evoluzione e nuovi sono gli approcci per accedere potenzialmente a biocatalizzatori e piccole molecole bioattive (Gabor *et al.*, 2007).

Questo approccio si basa sui recenti progressi in genomica della microbiologia e nella reazione a catena polimerasi (PCR) seguita dal clonaggio dei geni che condividono sequenze simili od omologhe a partire da un campione di tipo ambientale (Gabor *et al.*, 2007). Laddove la PCR richiede una conoscenza preliminare della sequenza del gene per disegnare un opportuno e specifico primer per l'amplificazione, l'estrazione diretta e la clonazione del DNA possono accedere teoricamente alla sequenza e alla funzione di qualsiasi gene. Il clonaggio genomico diretto offre la possibilità di catturare operoni o geni che codificano per importanti protagonisti delle vie di biosintesi di molecole di interesse farmaceutico e non solo. L'informazione di sequenza circa geni fiancheggiati un gene di particolare interesse può anche essere ottenuta attraverso un'analisi più specifica dell'ambiente del gene o dell'affiliazione dell'organismo da cui deriva. Uno degli obiettivi più importanti della metagenomica, è la ricostruzione dei genomi di microrganismi non coltivabili attraverso le librerie dove clone per clone si può costruire l'intero cromosoma.

Le applicazioni biotecnologiche della metagenomica debbono essere supportate da fondamentali studi ecologici e focalizzati su screening di *bioprospecting* (Schloss and Handelsman, 2003), così come su approcci sia di base che applicati che hanno già contribuito alla scoperta di antibiotici ed enzimi industriali a partire da microrganismi coltivabili. La storia della microbiologia del suolo illustra bene l'interdipendenza tra ricerca di base e applicata e il ruolo della serendipità nel processo di scoperta; basti pensare alla scoperta della streptomicina e altri antibiotici nata da studi di tassonomia e di ecologia o allo studio degli attinomiceti condotto da Selman Waksman che non aveva affatto l'intenzione di studiare o curare infezioni nell'uomo quando ha scoperto gli antibiotici. È chiaro che, per ottenere il miglior numero di applicazioni biotecnologiche, è essenziale che ci sia un dialogo tra la biologia di base e l'utilità di un nuovo scenario da perseguire come parte di un campo nuovo quale è la metagenomica (Schloss and Handelsman, 2003).

La diversità microbica globale, presenta un enorme, in gran parte inutilizzato, pool genetico e biologico che può essere esplorato per la scoperta di nuovi geni, per biomolecole coinvolte in importanti vie metaboliche e per vari altri preziosi prodotti (Ghazanfar *et al.*, 2010). Gli studi di metagenomica hanno fatto notevoli passi in avanti grazie alla costruzione di efficienti vettori di

clonaggio come i BACs o i cosmidi (Xu, 2006; Babcock *et al.*, 2007) che hanno consentito il clonaggio e l'espressione di grandi e complessi geni e lo sviluppo di metodi per la generazione e l'analisi dei dati (Singh *et al.*, 2008; Ghaanfar and Azim, 2009).

Tutti gli studi di metagenomica, compiono lo stesso primo passo: l'estrazione del DNA dai microrganismi che vivono in un determinato ambiente. Gli step sono tre:

1. Campionamento ed estrazione del DNA da qualsiasi suolo od habitat (Ghazanfar and Azim, 2009);
2. Costruzione di clone library;
3. Analisi delle librerie metagenomiche.

L'estrazione del DNA rappresenta una fase critica ed è, probabilmente, lo step più importante: il suolo è una matrice estremamente complessa che contiene molte sostanze, come gli acidi umici, che sono co-estratti con il DNA e possono interferire in maniera significativa e compromettere l'intero processo di analisi meta genomica successive. Tuttavia, esistono numerosi kit e sono state sviluppate diverse tecniche di purificazione del DNA al fine di ottimizzarne qualità e resa. Il DNA estratto può essere analizzato direttamente così come può essere clonato in modo da essere gestito diversamente e da avere a disposizione delle clone library da utilizzare poi per studi più fini, come ad esempio, studi di funzione genica a partire da un clone library di microrganismi che si sono adattati ad un particolare ambiente.

Una libreria non è organizzata in volumi netti ognuno contenente il genoma di un singolo microrganismo, è, invece, costituita da milioni di cloni ciascuno con un frammento casuale di DNA. Immaginiamo migliaia di puzzle insieme confusi in una singola scatola: ordinare e mettere di nuovo il puzzle insieme è la sfida della metagenomica (Ghazanfar *et al.*, 2010).

Due sono le strategie:

1. *Sequence-based metagenomics*: fornisce informazioni sulla distribuzione delle funzioni nell'ambito di comunità, linkare di tratti, organizzazione genomica e trasferimento genico orizzontale. Gli approcci tipici coinvolgono il sequenziamento di cloni casuali o l'identificazione di cloni sulla base di metodi che possano permettere l'identificazione di una particolare sequenza.
2. *Function-based metagenomics*: milioni di frammenti random contenuti in una libreria, sono tradotti in proteine così da consentire lo studio l'identificazione di nuovi enzimi, antibiotici o altri reagenti a partire da cloni di biblioteche provenienti da ambienti diversi. Gli approcci includono l'espressione eterologa e la selezione (Ghazanfar *et al.*, 2010); quest'ultimo consente lo screening di cloni rari.

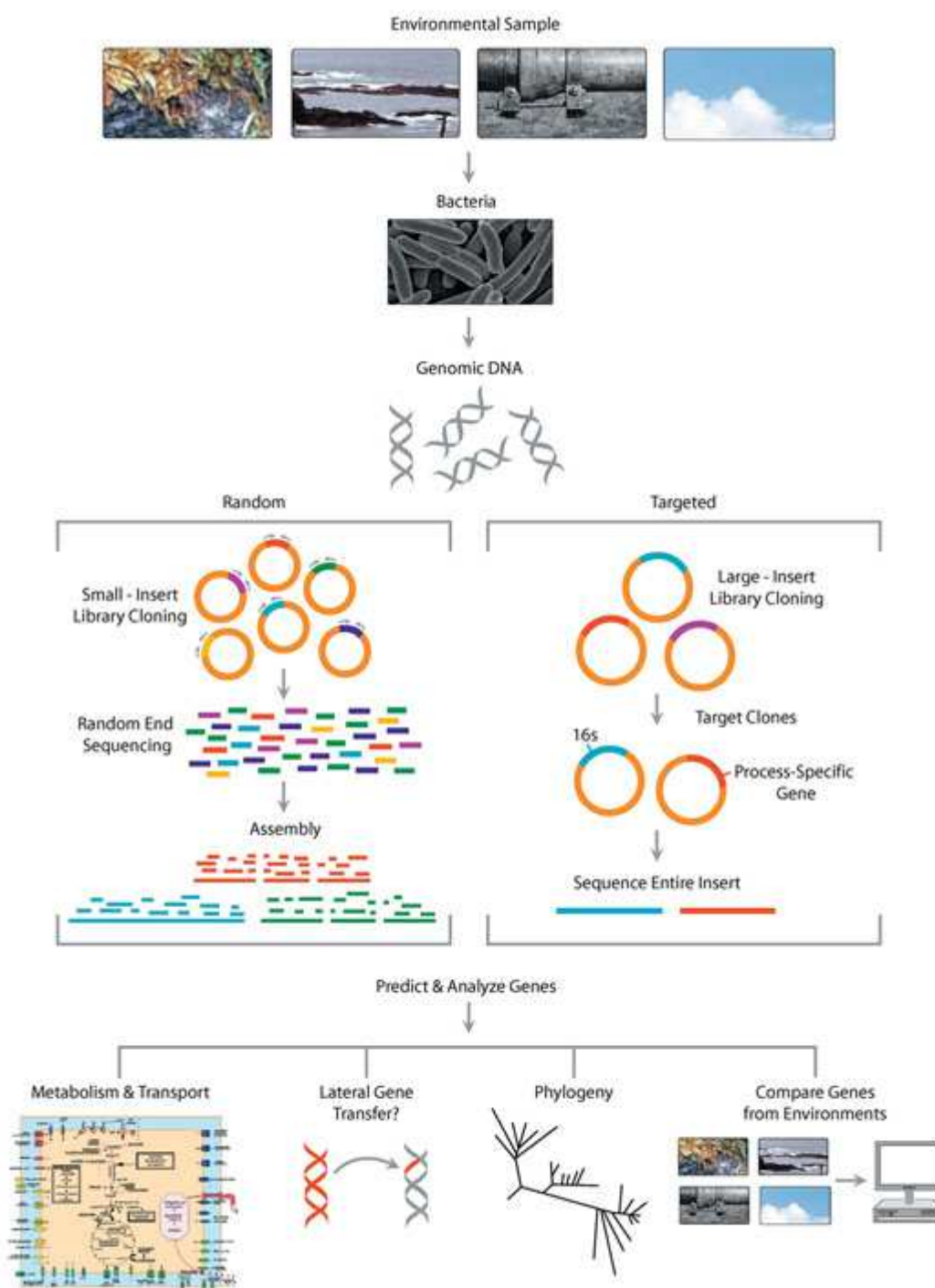


Fig. 5 I passi della metagenomica (Ghazanfar *et al.*, 2010).

1.6.2 Comunità microbiche del suolo e metagenomica

Il suolo è un ambiente complesso, il più grande serbatoio di diversità genetica microbica (Robe *et al.*, 2003), insieme a composti minerali e materiale organico. Molte funzioni di questi microrganismi, sono ad oggi ben note; il metabolismo e le interazioni con altri microrganismi, la complessa rete di comunità microbiche, differiscono a seconda dell'habitat e delle sue condizioni. Non tenendo conto dei genomi dei microrganismi rari e non recuperati, è stato stimato, che la dimensione della comunità del suolo è pari a 6000- 10000 genomi di *E. coli*

(Ovreas, 2000; Torsvik *et al.*, 2002). È chiaro che, la diversità genetica del metagenoma suolo è una risorsa ed una fonte preziosa e ampiamente ancora inesplorata di nuovi enzimi, composti bioattivi e di una vasta gamma di prodotti biotecnologici preziosi (Ullrich *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2005). Tuttavia l'approccio coltivazione-dipendente è limitato fortemente e irrimediabilmente dal fatto che la stragrande maggioranza dei microrganismi non è coltivabile in laboratorio. In questo, la genomica ha dato importanti risposte anche perché, non è da sottovalutare che, i microrganismi coltivabili forniscono informazioni molto limitate sulla diversità microbica del suolo.

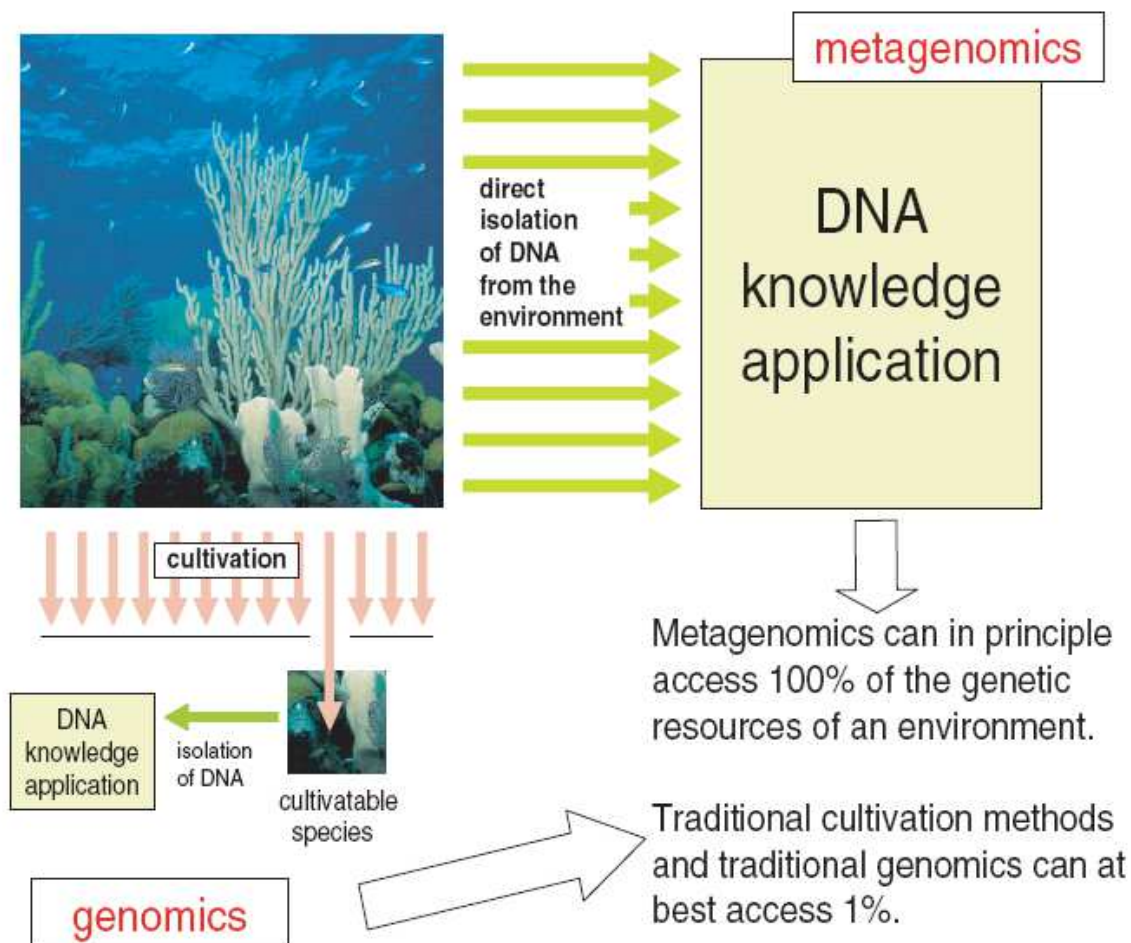


Fig. 6 Come la metagenomica differisce dalla genomica microbica. (The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet <http://www.nap.edu/catalog/11902.html>).

Una strategia molto utilizzata per analizzare la diversità metagenomica batterica in potenziali campioni di suolo di interesse, è l'analisi del 16S rRNA, un metodo relativamente rapido e conveniente per valutare sia la diversità che l'abbondanza. Uno dei metodi più semplici è il metodo denominato T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), che rileva le impronte digitali molecolari delle comunità microbiche. L'analisi T-RFLP è stata ampiamente utilizzata negli ultimi anni in differenti condizioni e su differenti matrici di suolo (Moeseneder *et al.* 1999; Osborn *et al.* 2000; Richardson *et al.* 2002; Sakano *et al.* 2002; Fierer *et al.* 2003; Lueders and Friedrich 2003; Nagashima *et al.* 2003) e combina la classica reazione di PCR utilizzando primers marcati con fluorocromi, ad una digestione enzimatica in modo da separare le diverse unità tassonomiche. I profili generati sono poi analizzati con un sistema automatizzato, un sequenziatore capillare. Le differenze nella struttura delle comunità microbiche possono essere stimate in base alla presenza/assenza di frammenti specifici dai profili ottenuti dalla digestione enzimatica di un pool di DNA totale amplificato per il 16S.

Strumenti indispensabili per valutare la ricchezza in un campione e la somiglianza tra le diverse comunità presenti in un campione, sono stati sviluppati dalle analisi di bioinformatica.

Le applicazioni biotecnologiche che possono derivare dalla metagenomica del suolo sono (Ghazanfar *et al.*, 2010; Mocali and Benedetti, 2010):

1. antibiotici e farmaci: il potenziale di impatto della metagenomica del suolo, sulla produzione di antibiotici è molto alto. Precedenti studi hanno riportato con successo lo screening da una libreria metagenomica, dell'indirubina (Macneil *et al.*, 2001), mentre un ampio range di nuovi antibiotici sono stati individuati in altre librerie (Gillespe *et al.*, 2002; Brady *et al.*, 2004). Un clone trovato in una libreria metagenomica, produce deoxyviolaceina e l'antibiotico ad ampio spettro violaceina (Brady *et al.*, 2001). Riesenfeld *et al.* (2004) identificarono da suolo, nove amino glicosidi e una tetraciclina, oltre a geni di resistenza agli antibiotici.
2. Ossidoreduttasi/deidrogenasi: le ossido reduttasi sono biocatalizzatori utili nella produzione industriale di esteri idrossi chirali, idrossiacidi, amminoacidi ed alcoli (Knietsch *et al.* 2003). In uno studio condotto senza il contributo della metagenomica, un totale di 24 cloni positivi sono stati ottenuti e testati per la loro specificità di substrato. Un arricchimento con glicerolo 1,2-propandiolo ha permesso di identificare altri 24 cloni (Knietsch *et al.* 2003).
3. Amidasasi: in uno studio generale lo screening di una libreria metagenomica del suolo per biocatalizzatori, è stato identificato un amidasi (Voget *et al.*, 2003). Le amidasi sono utilizzate nella biosintesi di 9-lattamici. In uno studio successivo dove è stato utilizzato come target il meta genoma del suolo, un arricchimento ha permesso di identificare sette cloni amidasi positivi, uno dei quali codifica per una penicillina (Gabor *et al.*, 2004; Gabor and Janssen, 2004).
4. Biosintesi delle vitamine: la metagenomica del suolo è stata anche applicata alla ricerca di nuovi geni codificanti la sintesi di vitamine come la biotina (Entcheva *et al.*, 2001). Sono stati identificati sette cosmidi nella biblioteche di metagenomica in seguito ad arricchimento di campioni ambientali con avidina e più alti livelli di biotina sono stati ottenuti in un cosmide ottenuto da suolo forestale (Entcheva *et al.*, 2001).
5. Polisaccaridi degradanti/enzimi/geni amilolitici: le amilasi sono state al centro di numerosi studi di metagenomica. Studi recenti hanno identificato amilasi a partire da librerie di metagenomica del suolo (Richardson *et al.*, 2001; Voget *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2005). Le cellulasi hanno numerose applicazioni e importanti potenzialità biotecnologiche in diversi settori dal chimico all'alimentare, al tessile, alla carta e all'agricoltura (Bhat, 2000). Lo screening funzionale di un suolo per cellulasi ha permesso di identificare otto cloni celluloso litici, uno dei quali era stato purificato e caratterizzato (Vodet *et al.*, 2006).
6. Geni lipolitici: la metagenomica ha individuato una serie di nuovi geni codificanti enzimi lipolitici come esterasi e lipasi, come nel caso di Esterasi EstCE1, derivato da un meta genoma di suolo (Elend *et al.*, 2006), che si distingue in quanto presenta caratteristiche comuni all'ambiente da cui è stato ottenuto. L'alto livello di stabilità di questo enzima insieme alla specificità per un unico substrato, lo rendono molto utile per applicazioni biotecnologiche. Altri geni lipolitici sono stati identificati utilizzando il suolo come matrice e la metagenomica come strategia di studio e di ricerca.

È evidente che la metagenomica offre dei mezzi per risolvere dei problemi pratici all'umanità, sciogliendo i segreti di migliaia di comunità microbiche che ci circondano e rappresentano una risorsa per la:

- sostenibilità ambientale: descrivere e prevedere processi ambientali globali.
- la biomedicina: sviluppo di nuove strategie di diagnosi e trattamento a partire dalla conoscenza del micro bioma umano.
- la bioenergia: sviluppo di sistemi microbici e processi per risorse bioenergetiche che saranno rispettose dell'ambiente e a basso costo.
- la bioremediation: sviluppo di strumenti per il monitoraggio ambientale e per il ripristino di sani ecosistemi.
- le biotecnologie: identificazione e valorizzazione della capacità di biosintesi, della versatilità, della diversificazione delle comunità microbiche di generare benefici industriali, alimentari e prodotti per la salute.

- l'agricoltura: sviluppo di una più efficace e completa metodica per la diagnosi precoce delle minacce alla produzione degli alimenti e la sicurezza alimentare, così come lo sviluppo di pratiche di gestione in grado di massimizzare gli attributi benefici delle comunità microbiche intorno alle piante e agli animali. Presso il CRA-RPS si lavora, ad esempio, sullo studio della diversità microbica di suoli salini, un ambiente che rientra, da un punto di vista antropocentrico e delle caratteristiche dell'habitat, tra gli ambienti estremi ed i microrganismi che lo popolano sono definiti estremofili. Lo studio della diversità microbica in ambienti estremi è importante per diverse ragioni, infatti, da questi studi potrebbero infatti derivare conoscenze di utile impiego in campo biotecnologico. Nella fattispecie, la caratterizzazione delle comunità microbiche, che, adattate a vivere in ambienti di questo tipo e che conservano caratteristiche di resistenza al sale, potrebbe portare ad isolare microrganismi utili ai fini del miglioramento genetico e della conservazione di ambienti salini che garantiscono e massimizzano anche gli attributi benefici della pianta. Non solo, potrebbe anche portare all'identificazione di geni responsabili ed utili per future applicazioni biotecnologiche. Basti pensare che in Sicilia ogni anno si perdono circa il 20% di superficie agraria utile per infiltrazione di acque salate (Dazzi *et al.*, 2006).
- la medicina forense: sviluppo di vaccini efficaci e di terapie contro potenziali agenti del bioterrorismo, realizzazione di biosensori per il monitoraggio degli ecosistemi e di patogeni noti e potenziali, capacità di identificare microrganismi che hanno svolto un ruolo nella guerra, nel terrorismo e in eventi di criminalità, contribuendo così a scoprire l'origine dei microrganismi e il peso della responsabilità nel loro uso.

1.7. La collezione *ex situ* di microrganismi del CRA – RPS

Le collezioni *ex situ* di microrganismi, cioè collezioni in laboratorio sono uno strumento fondamentale nello sviluppo del lavoro di ricerca e infatti la maggior parte delle collezioni attualmente esistenti in Italia, compresa quella presso il CRA-RPS, possono infatti considerarsi come collezioni da lavoro ove i microrganismi vengono conservati per esigenze di studio e non di propagazione e vendita.

La costituzione e il mantenimento della collezione di microrganismi del CRA-RPS prevede le seguenti finalità:

- ✓ mantenimento dei microrganismi in collezione utilizzando metodologie atte a garantirne la vitalità, la purezza ed eventuale attività funzionale;
- ✓ ampliamento della collezione attraverso l'introduzione di nuovi isolati o ceppi di particolare interesse;
- ✓ caratterizzazione dei microrganismi di nuova introduzione o già presenti in collezione attraverso la definizione di tutti i parametri descrittivi necessari ad una loro sicura identificazione;
- ✓ costituzione di una banca dati informatica, consultabile via web, che raccolga le schede identificative di tutti i microrganismi in collezione;
- ✓ distribuzione di microrganismi ad istituzioni di ricerca che ne facciano eventuale richiesta.

Le metodologie messe in atto al raggiungimento di tali attività sono state descritte nel manuale Col.Mi.A. – Collezioni di microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale.

L'attività di ricerca condotta presso il CRA-RPS sviluppata principalmente nell'ambito di progetti di ricerca nazionali ed internazionali ed attraverso convenzioni istituite con aziende private ha permesso di acquisire, nel corso degli anni, un grande know-how nei campi di interesse microbiologico e di ampliarne la collezione. Attualmente, presso il CRA-RPS sono presenti in collezione i seguenti ceppi microbici:

- *Arthrobacter oxydans strain 1663*;
- *Arthrobacter sp. GW10-3*;
- *Arthrobacter sp. 17a-2*;
- *Arthrobacter oxydans strain 03-0063*;
- *Arthrobacter sp. HTCC345*;
- *Arthrobacter sp. SC17Y*;
- *Bacillus firmus D26D*;

- *Bacillus firmus* D50D;
- *Bacillus nealsonii* PB11_4a;
- *Bacillus pumilus* D35;
- *Bacillus* sp. 2BSG-MG-5;
- *Bacillus* sp. PDK002 16S;
- *Bacillus amyloliquefaciens* strain 19E2
- *Bacillus subtilis* strain S64;
- *Bacillus* sp. U4A;
- *Bacillus subtilis* strain LXB3;
- *Bacillus subtilis* D45A;
- *Bacillus subtilis* GH38;
- *Bacillus* sp. ZSA;
- *Bacillus* sp. Inaquosorum;
- *Bacillus licheniformis* strain KIBGE-IB4;
- *Bacillus* sp. SC-A5-16;
- *Bacillus megaterium* strain PEBM08010813;
- *Bacillus* sp. MB131;
- *Bacillus* sp. 210_42;
- *Bacillus megaterium* strain AaMG11;
- *Bacillus tequilensis* straini KM11;
- *Brevibacterium* sp. 210_45;
- *Clostridium sporogenes* strain JPL_25;
- *Clostridium* sp. BXM;
- *Enterobacter cloacae* strain LCR82;
- *Enterobacter cloacae* Bru-1;
- *Entecrobacter cloacae* LCR82a;
- *Entecrobacter cloacae* subsp. XJUHX-4;
- *Enterobacter* sp. VET-7;
- *Enterobacter ludwigii* cultured collection CGMCC:3092;
- *Enterobacter ludwigii* PSB 1;
- *Enterobacter aerogenes* T2;
- *Enterobacter cloacae* 3YN16;
- *Enterobacter hormaechei* XJUHX_4;
- *Entecrobacter* sp. CCBAU 15488;
- *Entecrobacter* sp. RGM-A;
- *Lysinibacillus sphaericus* strain 22YG17;
- *Lysinibacillus fusiformis* strain 28XG99;
- *Lysinibacillus* sp. 210_56;
- *Nitrosomonas europaea* NCIMB 11850;
- *Pseudomonas aeruginosa* strain PMA1;
- *Pseudomonas aeruginosa* strain PD100;
- *Pseudomonas aeruginosa* strain H51;
- *Pseudomonas mendocina* D3;
- *Pseudomonas putida* 32ZXY;
- *Pseudomonas putida* #590;
- *Pseudomonas putida* XJ-2;
- *Pseudomonas fluorescens* D3;
- *Pseudomonas geniculata* NFR19;
- *Pseudomonas fluorescens* BIT18;
- *Pseudomonas* sp. B64;
- *Pseudomonas* sp. B65;
- *Pseudomonas* sp. CT 364;
- *Pseudomonas* sp. TM7_1;

- *Sinorhizobium meliloti* Rm 1021;
- *Sinorhizobium meliloti* AK58;
- *Sinorhizobium meliloti* AK83;
- *Sinorhizobium meliloti* BL225C;
- *Sinorhizobium meliloti* B021CC;
- *Stenotrophomonas maltophilia* sp. *carotovorum* ECC3_6;
- *Stenotrophomonas maltophilia*.

I microrganismi del suolo costituiscono degli ottimi indicatori ambientali grazie alle loro potenzialità legate a:

- velocità di risposta alle pressioni esterne;
- velocità di accrescimento;
- trasmissione del carattere alle generazioni successive;
- dinamica di popolazione.

Nell'ambito della **bioindicazione**, ad esempio, è possibile definire:

- la qualità e la salute del suolo, (Bloem *et al.*, 2006; Sequi *et al.*, 2006);
- l'impatto delle colture geneticamente modificate (Castaldini *et al.*, 2006);
- l'impatto di sostanze xenobiotiche (metalli pesanti, pesticidi, elementi indesiderati quali arsenico, tallio, cloro, ecc) (Mocali *et al.*, 2007);
- l'impatto delle pratiche di fertilizzazione (Nannipieri *et al.*, 1999);
- l'impatto delle lavorazioni (Dell'Abate *et al.*, *in press*);
- l'impatto di differenti sistemi di gestione agronomica (Lagomarsino *et al.* 2010);
- l'impatto di discariche, attività minerarie, inquinamento atmosferico da traffico veicolare, città, ecc. (Francaviglia *et al.*, 2004);
- il rischio di salinizzazione ed uso di acque anomale (Pompili *et al.*, 2006);
- il rischio di erosione (Mocali *et al.*, 2007);
- ecc.

Tra le ricerche di microbiologia del suolo e ambientale condotte presso il CRA-RPS, ne sono state affrontate molteplici su ecosistemi agrari nei quali si potrebbero verificare perdite di biodiversità allo scopo di monitorare le condizioni edafiche e della microflora tellurica eseguendo indagini di tipo ecofisiologico e genetico. In questo ambito, ad esempio, è stata studiata una situazione colturale sul litorale laziale in località Maccarese (RM), da oltre venti anni gestita con soventi fumigazioni e pratiche di fertilizzazione. Infatti uno dei problemi più importanti in agricoltura è rappresentato dai parassiti delle piante ed in particolare dai nematodi (Baldwin *et al.*, 2004), tra cui *Heterodera carotae*, responsabile di danni alle carote e ad altre Umbrelliferae. Per molti anni il bromuro di metile è stato ampiamente utilizzato per il controllo dei nematodi nei suoli agrari. Successivamente a numerosi studi che dimostravano l'impatto negativo del prodotto sull'ozono stratosferico (Prather *et al.*, 1984; Park *et al.*, 2004) e sulla base del protocollo di Montreal (1997), è stato bandito dall'Europa e dall'USA a partire dal 2005.

Le suddette pratiche avevano portato ad un drastico impoverimento della fertilità e della biodiversità microbica del suolo, così come dell'attività microbica e indirettamente ad un effetto negativo sulla qualità del suolo, definita da Doran e Parkin 1994) come "la capacità del suolo di interagire con l'ecosistema al fine di mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale e di promuovere la salute degli animali e delle piante".

Infatti erano sopravvissute solo 3 specie batteriche, tutte appartenenti al genere *Bacillus*: *B. firmus* (C2L8), *B. firmus* (FL13) e *B. licheniformis* (FL3), caratterizzati e mantenuti in collezione, tutti gram-positivi sporigeni in grado di sopravvivere anche in situazioni di grave stress ambientale. È possibile che la presenza di batteri gram-positivi (Ibekwe *et al.*, 2001) e, in particolare, di batteri del genere *Bacillus* possa essere legata sia alla capacità di questi batteri di formare spore per difendersi dal fumigante, sia alla presenza di un set di geni coinvolti nella degradazione dell'1,3-dicloropropene (Mocali *et al.* 2007).



Fig. 7 *Bacillus firmus* isolato dai suoli di Maccarese (Mocali *et al.*, 2007).

La produzione di bioelettricità, così come quella di bioidrogeno, biobutanolo, bioetanolo, biomasse algali e biodiesel da SCO (single cell oil), rientra nell'ambito dell'attività di ricerca e sviluppo nel settore delle biotecnologie industriali applicate al settore delle energie rinnovabili del CRA-RPS. Nell'ambito dell'impiego di microrganismi per la produzione di **bioenergia**, il progetto BioElettricità Microbica (**BEM**) si propone di individuare e caratterizzare nuovi batteri elettrogenici e cercare di far luce sulle relazioni esistenti tra comunità microbiche e composizione delle matrici organiche. La continua e crescente domanda di energia pulita, economica e sostenibile ha recentemente indotto i principali paesi industrializzati ad investire ingenti risorse nella ricerca di energie alternative. Si prevede infatti che l'UE voglia portare al 20% la quota di energie rinnovabili entro il 2020 e ciò significa che entro questa data la produzione di tali fonti energetiche dovrà essere quasi triplicato. Uno dei temi che si sta evolvendo più rapidamente nel campo delle energie rinnovabili è sicuramente quello dello sfruttamento delle biomasse come fonte di energia alternativa ai combustibili fossili. Grande rilievo stanno perciò avendo le cosiddette colture energetiche per la produzione di bioenergie, principalmente per la produzione di bio-carburanti (biofuel, bioetanolo, ecc.), attraverso processi fermentativi a partire da biomasse. Tuttavia tali processi comportano prodotti di scarto non utilizzati che dovranno essere smaltiti a parte, con ulteriori costi e problemi di sostenibilità ambientale. Grandi potenzialità, ma quasi del tutto trascurate (soprattutto in Italia), possono offrire invece le cosiddette risorse microbiche per la produzione di energia elettrica diretta, a partire da biomasse, senza alcuna fase fermentativa intermedia. Infatti recentemente sono stati scoperti i cosiddetti batteri "elettrogenici", ovvero capaci di produrre energia elettrica attraverso il trasferimento diretto di elettroni da una matrice organica ad un qualsiasi accettore di elettroni. Nell'ambito del progetto BioElettricità Microbica (BEM), il CRA-RPS si è occupato dello studio e la selezione di batteri elettrogenici presenti nel suolo e verificarne la capacità di utilizzare biomasse di scarto come combustibile per la produzione di energia elettrica attraverso l'uso delle Microbial Fuel Cells (MFCs). In particolare nell'ambito del progetto sono stati isolati i batteri a partire dalle prove MFC inoculate con suolo e ammendante, sia al tempo iniziale che al tempo finale, in presenza e assenza di corrente. Gli isolati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) che ha consentito di individuarne 106 aplotipi dominanti. Il 16S rDNA di un rappresentante di

ciascun aplotipo è stato quindi estratto, amplificato e sequenziato al fine di effettuare la caratterizzazione tassonomica dell'organismo. I batteri potenzialmente elettrigenici così isolati e messi in collezione, sono stati ulteriormente caratterizzati per la loro potenzialità elettrigenica mediante voltammetria ciclica (Mocali *et al.*, *in press*).



Fig. 8 *Enterobacter cloacae* isolato da sistemi MFC, messo in collezione e selezionato per la sua capacità elettrigenica mediante voltammetria ciclica.

Alcuni microrganismi del suolo migliorano la fertilità del terreno, danno un contributo rilevante allo sviluppo delle piante e vengono definiti "biofertilizzatori". Tra questi un ruolo centrale viene offerto dai funghi simbiotici micorrizici. Essi aumentano la disponibilità degli elementi minerali (fosforo soprattutto) alla pianta, ricevendone in cambio zuccheri (Smith and Read, 1997). La **biofertilizzazione** consiste infatti in una fertilizzazione "verde" mediante la semina di leguminose e successivo sovescio (azotofissazione), l'inoculazione di azotofissatori liberi, e la bioregolazione della concimazione minerale mediante l'attivazione del processo organico-mineralizzazione. I batteri del suolo ed i cianobatteri sono in grado di fissare l'azoto atmosferico; si conoscono tre strategie di fissazione dell' N_2 , a seconda che i procarioti coinvolti vivano in simbiosi con le piante, siano associati ad esse o vivano indipendenti nel suolo. *Sinorhizobium meliloti* è un batterio del suolo che fissa azoto atmosferico nelle radici delle piante. questo batterio produce azotofissazione mediante noduli sulle radici di leguminose del genere *Medicago*, *melilotus*, *trigonella* in associazione con *Medicago sativa*. Il sequenziamento del genoma del ceppo Rm 1021 consente una base molto solida per un elevato numero di studi ed applicazioni biotecnologiche a livello molecolare. Questo progetto è basato sull'approccio sistematico al fine di incrementare la produttività di piante del genere *Medicago*, *Melilotus* e *Trigonella* attraverso l'inoculazione di rizobi. La diversità batterica studiata in differenti regioni della terra mostra una elevatissima variabilità fenotipica nell'efficienza simbiotica. Nonostante i numerosi studi di genetica e biologia molecolare su ceppi della specie *Sinorhizobium meliloti* quali Rm1021 (Fig. 9), presenti nella collezione del CRA-RPS caratterizzati metabolicamente mediante la tecnologia del Phenotype Microarray (Biolog), non si conosce ancora a fondo la loro potenzialità metabolica e non è stata quantificata la variabilità fenotipica soggetta a selezione naturale, che può avere un ruolo primario nell'adattamento di questi ceppi ad ambienti differenti. Indagando la diversità batterica naturale è possibile scoprire moltissime caratteristiche straordinarie possedute dai diversi microrganismi. La diversità genetica delle popolazioni naturali di *Sinorhizobium meliloti* può essere utilizzata per creare un "Superizobio" (Mocali *et al.*, 2010).



Fig. 9 Tecnologia del phenotype microarray, OMNILOG (BIOLOG), disponibile presso il CRA-RPS.

1.8. La collezione *in situ* (o *on farm*) del CRA – RPS

È stato più volte evidenziato come la diversità microbica del suolo sia direttamente correlata con quella della vegetazione presente determinandone, di conseguenza, variazioni funzionali che si ripercuotono direttamente o indirettamente sulla crescita delle piante e la qualità dei loro prodotti (Bartelt-Ryser *et al.*, 2005). Le comunità batteriche e fungine hanno funzionalità e distribuzione diverse nei suoli, con un rapporto diverso nei confronti delle piante, pertanto la "lettura" di un sistema agricolo attraverso questi due indicatori microbici permette un approccio completo allo studio della ecologia microbica dei suoli agrari.

L'espressione dei caratteri propri della varietà vegetale dipende da fattori quali l'ambiente pedoclimatico di origine ed i peculiari metodi di coltivazione. Entrambi i fattori selezionano una flora batterica del suolo "tipica" e dunque qualora la varietà venga coltivata altrove o con tecniche colturali diverse potrebbe non dare gli stessi risultati o esprimere caratteristiche organolettiche totalmente differenti. I siti presso cui il CRA-RPS opera sono localizzati in aziende agrarie "custodi" ove sono già in atto azioni di recupero e conservazioni *in situ* del materiale vegetale, tra cui il complesso sperimentale di Tor Mancina (RM) è tra i più rilevanti.

L'obiettivo originale del progetto **AGROBIOIND** era studiare gli indicatori di diversità microbica per poterli combinare fra loro e con altri parametri ambientali (suolo), allo scopo di impiegarli nello studio previsionale dell'impatto della gestione dei suoli ed all'individuazione di potenziali markers di qualità colturale legata alla biodiversità del suolo. Questi markers rappresenterebbero ulteriori strumenti per la caratterizzazione delle aree agricole italiane particolarmente vocate, con produzione a marchio IGP e potrebbero essere impiegati e come indicatori di eventuali casi di degrado biologico legato alle pratiche colturali mutate o alle mutate condizioni climatiche. Gli studi sugli indicatori microbici richiedono un grande sforzo di lavoro e di strumenti, essendo basato su metodi sia colturali che molecolari, pertanto il progetto è stato ristretto a ciliegio, svolto in tre ambienti di produzione tipica o di interesse (come nel caso del campo catalogo dell'Istituto per la Frutticoltura di Roma) ed è stato ristretto ad un solo tipo di genoma rappresentato da Durone di Vignola innestato su COLT. I risultati hanno evidenziato un probabile forte effetto genoma della pianta su alcuni indicatori (funghi

endofitici delle radici), mentre altri sono risultati fortemente influenzati dall'ambiente e dalla gestione dei frutteti (Mocali *et al.*, 2011).



Fig. 10 Ceraseto dell'Azienda Giangirolami (Monterotondo, RM) nell'Aprile del 2009

In base ai risultati ottenuti nell'ambito del progetto AGROBIOIND, il progetto **ECOSISTEM** attualmente in corso si propone come obiettivo primario quello di applicare la metodologia messa a punto per la caratterizzazione e successiva conservazione in situ della biodiversità microbica associata a campi catalogo di vitigni presenti presso il CRA-VIT di Arezzo, applicando gli indicatori microbiologici risultati più rappresentativi in funzione della interazione genoma pianta-genoma delle comunità microbiche dei suoli, questo sempre in funzione dell'ambiente in cui il sistema pianta-suolo è inserito.

I microrganismi, essendo organismi viventi, possono essere utili indicatori nel **biomonitoraggio** della qualità ambientale in termini, ad esempio, di:

- cicli biogeochimici degli elementi della fertilità;
- diversità microbica funzionale e genetica;
- elementi diagnostici di alterazioni.

Al CRA-RPS sono numerosi i progetti e gli studi di biomonitoraggio, tra questi va citato il progetto **LIFE+ MAN-GMP-ITA** (NAT/IT/000334), finalizzato all'implementazione di una metodologia utilizzabile nell'analisi dei rischi derivanti dal rilascio di piante geneticamente modificate sugli agro sistemi e sulle aree adiacenti, in particolare aree sensibili e protette. L'analisi della biodiversità funzionale consentirà la valutazione ed il monitoraggio delle principali funzioni ecologiche (pollinazione, controllo naturale dei patogeni, attività del suolo). Inoltre, verranno valutate la possibilità e le conseguenze del flusso genico di specifici impatti delle piante GM sugli habitat adiacenti, tramite l'utilizzo di due coltivazioni sperimentali di mais e colza. Ciò consentirà di simulare due differenti scenari di rischio: il primo, valuterà il potenziale effetto del mais esprimente la tossina Cry sui lepidotteri non target; mentre, il

secondo, indagherà sul potenziale flusso genico e le sue conseguenze ecologiche sulle Brassicaceae (<http://www.man-gmp-ita.eu/it/>).

Il progetto **BIORELA** rientra nel "secondo programma di monitoraggio della fertilità biologica e della diversità microbica dei suoli del Lazio" e si è occupato inoltre di valutare anche la fertilità biologica e la biodiversità per un certo numero di siti campionato localizzati nelle aree del territorio regionale. I dati raccolti hanno permesso di implementare la carta base della fertilità biologica e della biodiversità già precedentemente realizzate, ma soprattutto, l'attività di monitoraggio e di approfondimenti microbiologici e molecolari che hanno riguardato aree specifiche e specie di interesse agrario (vite, ciliegio, ulivo) che ha affiancato il programma previsto, consentirà di identificare ceppi batterici, comunità microbiche tipiche e tipizzanti quel suolo e quella coltura tipica, quindi quell'habitat. È evidente che queste informazioni, si configurano come un'importante conoscenza ai fini di programmi futuri di miglioramento genetico, di applicazioni biotecnologiche ai fini, soprattutto, della conservazione delle determinate caratteristiche che riproducano quel tipo di habitat o lo migliorino in caso di "stress". Infatti, l'espressione dei caratteri propri della varietà vegetale dipende da fattori quali l'ambiente pedoclimatico di origine e i peculiari metodi di coltivazione. Entrambi i fattori selezionano una flora batterica del suolo "tipica" e dunque qualora la varietà venga coltivata altrove o con tecniche colturali diverse potrebbe non dare gli stessi risultati o esprimere caratteristiche organolettiche totalmente differenti (Benedetti *et. al.*, 2011).

Nell'ambito del biomonitoraggio il progetto **MARKERINBIO** affronta il problema del monitoraggio degli effetti che una diversa gestione del suolo produce sulla fertilità biologica quale espressione delle attività metaboliche che si sviluppano nel suolo ad opera dei microrganismi e quali effetti metabolici possono essere evidenziati nella corrispondente coltura al fine di individuare marcatori metabolici in grado di discriminare tra colture biologiche, convenzionali e biotecnologiche. In particolare verranno messe a confronto tecniche di produzione biologica, convenzionale e biotecnologia, nell'intento di individuare indicatori utili al monitoraggio spazio-temporale di potenziali effetti o alterazioni della fertilità del suolo di colture biologiche da parte di convenzionali o biotecnologiche.

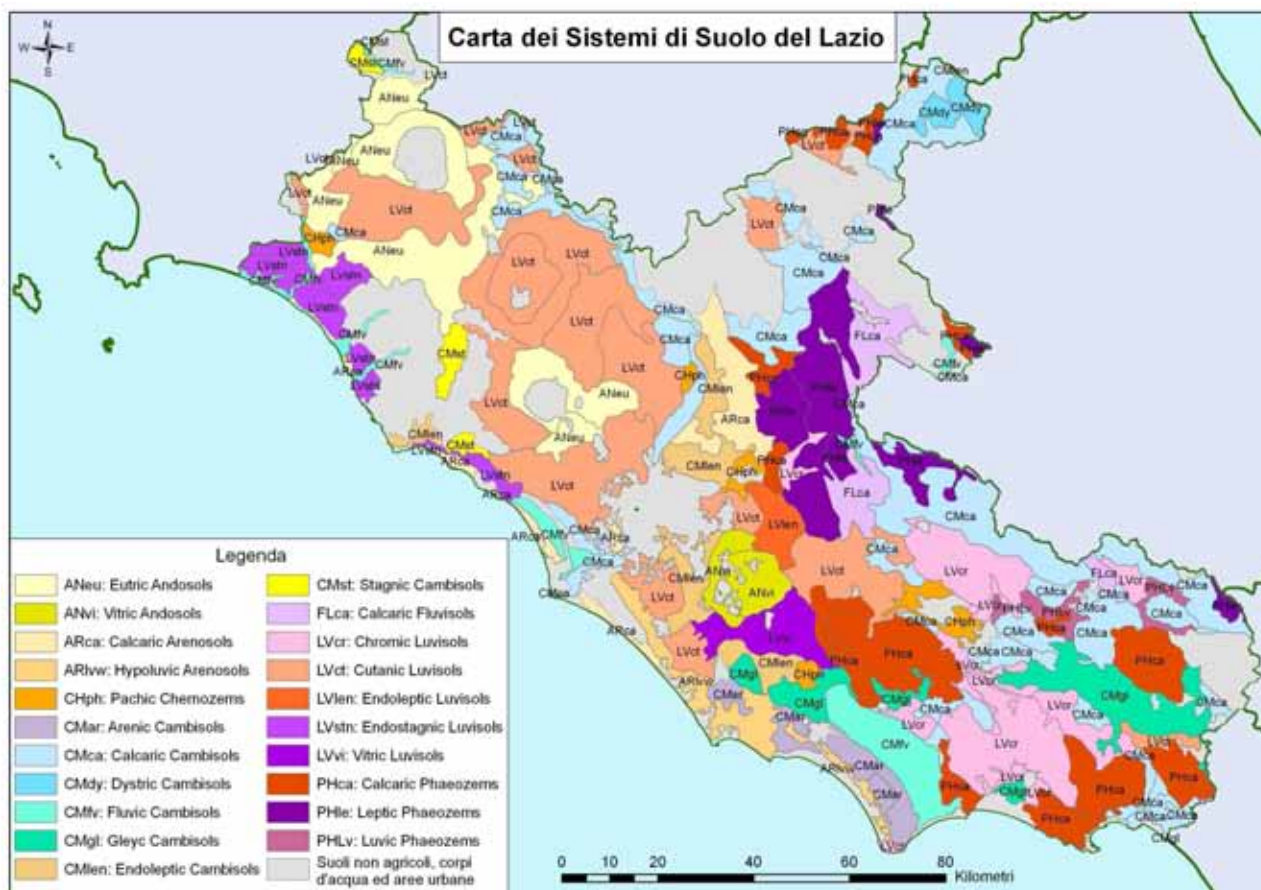


Fig. 11 Cartografia dei Sistemi di Suolo indagati con il progetto BIURELA.



Fig. 12 Esempio di un sito sperimentale monitorato nel progetto BIORELA.



Fig. 13 Uliveto a Vetralla (Vt).



Fig. 14 Vite di Pizzutello di Tivoli.

1.9. Bibliografia

1.9.1. Riviste

- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleiffer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.
- Babcock D.A., Wawrik B., Paul J.H., McGuinness L., Kerkhof L.J., 2007. Rapid screening of a large insert BAC library for specific 16S rRNA genes using TRFLP. *Microbiol Methods*, 71, 156 – 161.
- Bhat M.K., 2000. Research review paper: cellulases and relate enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, pp. 355 – 383.
- Bintrim, S.B., T.J. Donohue, J. Handelsman, G.P. Roberts, and R.M. Goodman., 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:277–282.
- Bloem J., Benedetti A., Hopkins D., 2006. *Microbial methods assessing soil quality*. CABI Publishing.
- Biondi, E., Tatti, E. Comparini, D., Giuntini, E., Mocali, S., Giovannetti, L., Bazzicalupo, M., Mengoni, A., Viti, C., 2009. Metabolic Capacity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* Strains as determined by Phenotype Microarray analysis. *Applied and environmental microbiology*, p. 5396–5404.
- Borneman, J., P.W. Skroch, K.M. O’Sullivan, J.A. Palus, N.G. Rumjanek, J.L. Jansen, J. Nienhuis, E.W. Triplett., 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *App Environ Microbiol* 62:1935–1943.
- Brady S.F., Choa C.J., Handelman J., & Clardy J., 2001. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org. Lett.* 3,1981– 1984.
- Castaldini M., Turrini A., Sbrana C., Benedetti A., Marchionni M., Mocali S., Fabiani A., Landi S., Santomassimo F., Pietrangeli B., Nuti M.P., Miclaus N. and M. Giovannetti 2005. "Impact of Bt on rhizospheric and soil eubacterial communities and on baneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms". *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11:6719-6729.
- Curtis TP, Sloan WT. (2005). Exploring microbial diversity - a vast below. *Science* 309: 1331–1333.
- Elend C., C. Schmeisser, C. Leggewie, P. Babiak, J. D. Carballeira, H. L. Steele, J. L. Reymond, Entcheva P., W. Liebl, A. Johann, T. Hartsch and W.R. Streit. 2001. Direct cloning from

- enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* 67, pp.89 – 99.
- Dazzi C. 2006. Acque saline e qualità del suolo. *Italian journal of agronomy* 1, 3.
- Dell'Abate M.T., Bazzoffi P., Ciancaglini A., Francaviglia R., Galeffi C., Napoli R., Neri U., Pennelli B., 2011 Effectiveness of the GAEC Cross-Compliance Standard "Ploughing in Good Soil Moisture Conditions" in Soil Structure Protection. *Italian Journal of Agronomy*. In press.
- Ferrer M., O.V. Golyshina, T.N. Chernikova, A.N. Khachane, D. Reyes-Duarte, V.A.P. Martins Dos Santos, C. Strompl, K. Elborough, G. Jarvis, A. Neef, A. Yakimov, M. M. Timmis & P.N. Golyshin. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ. Microbiol*, 7,1996– 2010.
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA 2003. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microb Ecol* 45:63–71.
- Francaviglia R., Gataleta L., Marchionni M., Trinchera A., Aromolo R., Benedetti A., Morselli L., Brusori B. and Olivieri P. 2004. "Soil quality and vulnerability at a Mediterranean natural ecosystem of Central Italy". *Chemosphere* 55, 3: 455-466.
- Gabor E., Liebeton K., Niehaus F., Eck J. and Lorenz P. 2007. Updating the metagenomics toolbox. *Biotechnol. J.* 2, 201-206.
- Gabor E.M. & D.B. Janssen. 2004. Increasing the synthetic performance of penicillin acylase PAS2 by structure-inspired semi-random mutagenesis. *Protein Eng Des Sel* 17: 571– 579.
- Gabor E.M., E.J. Vries & D.B. Janssen. 2004b. Construction, characterization, and use of small insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ Microbiol* 6, 948 – 958.
- Gans J, Woilinsky M, Dunbar J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387–1390.
- Ghazanfar S. & Azim A., 2009. Metagenomics and its Application in Rumen Ecosystem: Potential Biotechnological Prospects. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (8),1309-1315.
- Ghazanfar S., Azim A., Ghanzanfar A.M., Anjum M. I., Begum I. 2010. Metagenomic and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. *Journal of Animal & Plant Sciences* 6, 2: 611-622.
- Gillespie D.E., S.F. Brady, A.D. Bettermann, N.P. Cianciotto, M.R. Liles, M.R. Rondon, J. Clardy, R.M. Goodman & J. Handelsman, 2002. Isolation of antibiotics turbomycin a and b from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* 68: 4301–4306.
- Griffiths, B.S., K. Ritz, and L.A. Glover. 1996. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridization technique. *Microb Ecol* 31:269–280.
- Hugenholtz, P., B.M. Goebel, and N.R. Pace. 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180:4765–4774.
- Hugenholtz, P., G.W. Tyson, R.I. Webb, A.M. Wagner, and L.L. Blackall. 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol* 67: 411–419.
- Inoue K., Makino Y., & Itoh N., 2005. Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. Strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction. *Appl Environ Microbiol* 71, 3633–3641.
- K. E. Jaeger & W. R. Streit. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3637– 3645.
- Knietsch A., Waschkowitz T., Bowien S., Henne A. & Daniel R., 2003. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. [Appl Environ Microbiol](#). Mar;69(3):1408-16.
- Lagomarsino A., Benedetti A., Marinari S., Pompili L., Moscatelli M.C., Roggero P.P., Lai R., Ledda L., Grego S. Soil organic C variability and microbial functions in a Mediterranean agro-forest ecosystem, *Biology and Fertility of Soils*, in press. DOI: 10.1007/s00374-010-0530-4.
- Liesack, W., and E. Stackebrandt. 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol* 174:5072–5078.
- Lueders T, Friedrich MW 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using

- defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol* 69:320–326.
- Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M., Smalla K., Torsvik V., Nannipieri P. 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biol Fertil Soils* 40: 363-385.
- MacArthur, R. H. 1955. Fluctuations of animal populations and a measure of community stability. *Ecology* 36: 533-537.
- MacNeil I. A., Tiong C.L., Minor C., August R.P., Grossman T.H., Loiacono K.A., Lynch B.A., Phillips T., Narula S., Sundaramoorthi R., Tyler A., Aldredge T., Long H., Gilman M., Holt D., & Osburne M.S., 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 301–308.
- McDougald, D., S.A. Rice, D. Wiechart and S. Kjelleberg. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol Ecol* 25:1-9.
- Mocali S., Galeffi C., Perrin E., Florio A., Migliore M., Canganella F., Bianconi G., Di Mattia E., Dell'Abate M. T., Fani R., Benedetti A. *in press*. Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer. *Environmental Biotechnology*.
- Mocali S., Paffetti D., Emiliani G., Benedetti A. Fani, R., 2007. Diversity of heterotrophic aerobic cultivable microbial communities of soils treated with fumigants and dynamics of metabolic, microbial, and mineralization quotients *Biol Fertil Soils* DOI 10.1007/s00374-007-0235-5.
- Mocali S. and Benedetti A. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology* 161, 497-505.
- Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G., Winter C., Herndl GJ. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterio-plankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65_3518-3525.
- Nagashima K, Hisada T, Sato M, Mochizuki J 2003. Application of new primer–enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl Environ Microbiol* 69:1251–1262.
- Ohtonen R, Aikio S, Väre H 1997. Ecological theories in soil biology. *Soil Biol Biochem* 29:1613-1619.
- Nannipieri P., Falchini L., Landi L., Benedetti A., Canali S., Tittarelli F., Ferri D., Convertini G., Badalucco L., Grego S., Vittori Antisari L., Raglione M. and Barraclough D. 1999. "Nitrogen uptake by crops, soil distribution and recovery of urea. N in a sorghum – wheat rotation in different soils under Mediterranean conditions". *Plant and Soil* 208, 43-56.
- Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43:93-100.
- Osborn AM, Moore ER, Timmis KN 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2:39–50.
- Ovreas L., 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol Lett*, 3, 236–251.
- Pimentel, D., Houser, J., Preiss, E., White, O., Fang, H., Mesnick, L., Barsky, T., Tariche, S., Schreck, J. and Alpert, S. 1997. Water resources: agriculture, the environment, and society. *BioScience*. 47 (2): 97-106.
- Pokarzhevskii, A. D., Krivolutzkii, D. A. 1997. Problems of estimating and maintaining biodiversity of soil biota in natural and agroecosystems: A case study of chernozem soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 62, 127–133.
- Richardson RE, Bhupathiraju VK, Song DL, Goulet TA, Alvarez-Cohen L 2002. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environ Sci Technol* 36:2652–2662.
- Riesenfeld C.S., Goodman R.M. & Handelsman J., 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 6, 981 – 989.
- Robe P., Nalin R., Capellano C. & Vogel T.M., 2003. Extraction of DNA from soil of DNA from soil. *Eur. J. soil. Boil.* 39, 183–190.
- Rondon M. R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osbourne M.S., Clardy J.,

- Handelsman J. and Goodman R. 2000. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 6:2541-2547.
- Sakano Y, Pickering KD, Strom PF, Kerkhof L J 2002. Spatial distribution of total, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological waste water treatment reactors for bioregenerative life support. *Appl Environ Microbiol* 68:2285–2293.
- Schloss P. D. and Handelsman JO 2003. Biotechnological prospects from metagenomics Current opinion in Biotechnology 14, 303-310.
- Singh B., S.K. Gautam, V. Verma, M. Kumar & B. Singh. 2008. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. *Anaerobe.* 14:138.
- Torsvik V., Ovreas L. & Thingstad T.F., 2002. Prokaryotic diversity– magnitude, dynamics, and controlling factors. *Sci.* 296: 1064–M. Hofrichter. 2004. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl Environ Microbiol* 70, 4575 – 4581.
- Ullrich R., Nuske, J., Scheibner K., Spantzel.J., & Hofrichter.M., 2004. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl Environ Microbiol* 70, 4575–4581.
- Vogel S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K.E. & Streit W.R., 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* 69, 6235 – 6242.
- Vogel S., Steele H.L. & Streit W.R., 2006. Characterization of a metagenome derived halo tolerant cellulase. *J. Biotechnol* 126, 26 – 36.
- Vogel T. and Simonet P. 2009. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature*, 7, 252.
- Whittaker, R.H., 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21: 213 - 251.
- [Woese CR.](#), 1987. Bacterial evolution. [Microbiol Rev.](#) Jun;51(2):221-71.
- Xu J., 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools and recent advances. *Mol. Ecol.*, 15, 1713–1731.
- Xu, H.-S., N. Roberts, F.S., Singleton, R.W., Atwell, D.J. Grimes and R.R. Colwell 1992. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol* 8: 313-323.
- Yun J., Seowon K., Sulhee P., Hyunjin, Y., Myo-Jeong K., Sunggi H. & Sangyeol R., 2004. Characterization of a novel amyolytic enzyme encoded by a gene from a soil derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol*, 70 (12), 7229– 7235.

1.9.2. Libri

- Alexander M., 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. Wiley, NY.
- Cardinali G., Benedetti A. *in press*. Linee guida per la conservazione della biodiversità di interesse agrario.
- Metting F.B., 1993. *Soil Biology Guide*. Dindal (ed.) John Wiley & Sons and *Soil Microbial Ecology*, F. Blaine Metting Jr. (ed.).
- Sequi P., Benedetti, A., Dell'Abate M.T. 2006. "ATLAS, atlante di indicatori della qualità del suolo. Ministero delle Politiche Agricole, alimentari e Forestali/Osservatorio Nazionale Podologico. Delta Grafica di Città di Castello.
- Tilman D., 1982. *Resource competition and community structure*. Princeton Univ. Press, Princeton.

1.9.3 Proceedings

- Benedetti A., Dell'Abate M.T., Pennelli B., Renzi G., Nardi P., Felici B., Piccini C., Salvati L., Marchetti A., Riviaccio R., Napoli R. Programma di monitoraggio della fertilità biologica e della diversità microbica dei suoli del Lazio. La biodiversità del Lazio custodita dalle comunità locali e tutelata dalla I.r. 15/2000. 2011. Poster.
- Boyd, C.E., 1992. Shrimp pond bottom soil and sediment management. In: J. Wyban (Ed.), *Proceedings of the Spacial Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 166-181.
- Bunning, S. and Jiménez, J.J. 2003. Indicators and assessment of soil biodiversity / soil ecosystem functioning for farmers and governments. Paper presented at the OECD Expert Meeting on indicators of soil erosion and soil biodiversity, 25-28 March 2003, Rome, Italy: 22.

- Cardinali, G. (2009). Le molteplici fonti di variazione dei microrganismi eucarioti conservati ex situ". Seminario nell'ambito della Scuola di Biodiversità e Bioindicazione della Società Italiana di Scienza del Suolo (SISS).
- Mocali S., Galardini M., Florio A., Mengoni A., Bazzicalupo M., Benedetti A., Biondi E.G. 2010. Phenotype Microarray supporting comparative genomic analysis in *Sinorhizobium meliloti*. 2nd Florence Conference on Phenotype Microarray Analysis of Microorganisms. The Environment, Agriculture, and Human Health. Programme and Abstracts.
- Mocali S., Fabiani A., Florio A., Mengoni A., Castaldini M., Frascella M., Felici B., Benedetti A. 2011. "Effects of soil type on rhizospheric and endophytic bacterial communities associated to cherry rootstock Colt (*Prunus avium*)". Bacterial Genetics and Ecology BAGECO 11. Programme and abstracts.
- Pompili L., Mellina A., Benedetti A. 2006. "Microbial indicator for evaluating soil quality in differently managed soils" European geosciences Union (EGU) General Assembly, Vienna, Geophysical Research Abstracts, SSS18, 06991 – 1MO20-006, cd-rom ISS pag 171.
- The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet <http://www.nap.edu/catalog/11902.html>.
- The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet. 2007. Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications, National Research Council. ISBN: 0-309-10677-X, 170 pages, 6 x 9.

ISOLAMENTO, CARATTERIZZAZIONE, CONSERVAZIONE E IMPIEGO AGRONOMICO DI RIZOBI AZOTOFISSATORI*

Responsabile Scientifico: Dr. Massimo Zaccardelli¹

CRA-ORT Centro di ricerca per l'orticoltura
Via Dei Cavalleggeri, 25 – 84098 Pontecagnano (SA)

¹Sede di lavoro: Azienda Sperimentale di Battipaglia, SS 18, 204 – 84091 Battipaglia (SA)

Riassunto

Nel suolo vivono diverse specie di batteri azoto-fissatori liberi o simbiotici. Tra i batteri azoto-fissatori simbiotici, i rizobi sono quelli più importanti. Essi fissano l'azoto atmosferico dall'aria quando stabiliscono simbiosi con piante della famiglia delle leguminose. Questa simbiosi è stata scoperta nel 1896 ed è una delle meglio conosciute e studiate. È una simbiosi mutualistica, in quanto i batteri metabolizzano i carboidrati sintetizzati dalle piante mediante la fotosintesi, mentre le piante assorbono azoto nella forma ammoniacale, prodotta dai rizobi per riduzione dell'azoto dell'aria. La riduzione dell'azoto è dovuta al complesso enzimatico della nitrogenasi. Molte informazioni sono state acquisite riguardo gli aspetti fisiologici e genetici della simbiosi e riguardo l'importanza agronomica e ambientale di questo processo, che rende disponibile alle piante e agli altri organismi l'azoto atmosferico, diversamente non utilizzabile. La quantità di azoto fissata dipende non solo dalla specie di leguminosa e dalla varietà, ma anche dal genotipo di rizobio. Test eseguiti sia in condizioni controllate che in pieno campo, hanno evidenziato come alcuni ceppi di rizobio siano più efficienti nel fissare azoto atmosferico e come alcuni di essi risultino più efficienti quando vengono inoculati su determinate varietà rispetto ad altre. Perciò, l'impiego di una particolare combinazione ceppo di rizobio/varietà di leguminosa può incrementare la fertilità del suolo, oltre che la quantità e la qualità della produzione. Inoltre, alcuni ceppi di rizobio, quando inoculati su piante di leguminose, possono indurre resistenza verso agenti fitopatogeni.

Da circa 12 anni, presso i laboratori del CRA-ORT ubicati nell'Azienda Sperimentale di Battipaglia, vengono isolati ceppi di rizobio da diverse specie di leguminose da granella, al fine di studiarne la variabilità genetica e la performance azotofissatrice. Grazie a questa attività, sono stati individuati diversi ceppi di rizobio capaci di incrementare significativamente la produzione di granella, in pieno campo, delle leguminose inoculate.

Diversi ceppi della collezione sono inseriti nel database COLMIA <http://www.colmia.it/>, una rete di collezioni finanziata dal MiPAAF, sotto il coordinamento del CRA - Centro di ricerca per la patologia vegetale di Roma.

Summary

In the soil several species of free or symbiont nitrogen-fixing bacteria live. Among nitrogen-fixing symbiont bacteria, rhizobia are the most important. They fix nitrogen from air when establish symbiosis with plant species of leguminous family. This symbiosis was discovered in 1896 and is one of the best known and studied. This is a mutual symbiosis, because bacteria metabolize carbohydrates synthesized in the plants by photosynthesis, while the plants adsorb nitrogen in the ammonia form, produced by rhizobia that reduce atmospheric nitrogen molecules. The reduction of nitrogen is due to nitrogenase complex enzyme. Much information has already been acquired about physiological and genetic aspects of the symbiosis and about the importance of agronomic symbiosis. Both in nature and in agriculture, biological nitrogen-fixation is very important because it makes available atmospheric nitrogen to the plants and other organisms, otherwise unusable. The amount of nitrogen fixed depend not only on leguminous species and varieties, but also on rhizobia genotype.

Tests performed both in controlled conditions and in open field, have shown that some *Rhizobium* strains are most efficient to fix atmospheric nitrogen and some of them are most efficient when inoculated on some varieties than on others. Therefore, the use of a particular combination rhizobia strain/leguminous variety, may improve fertility of the soil, as well as

* doi:10.4458/0986-09

quality and quantity of the yield. Moreover, some rhizobia strains, when inoculated on leguminous plants, can induce resistance against phytopathogens.

For nearly 12 years, at the laboratories of the CRA-ORT located in the experimental field of Battipaglia, strains of rhizobia are isolated from various species of grain legumes, in order to study the genetic variability and performance of nitrogen-fixing. Through this activity, have been identified different strains of rhizobia able to significantly increase the production of grain, in open field, inoculated on the seeds.

A number of isolates of this collection is inserted in COLMIA <http://www.colmia.it/> database, a network of culture collections funded by MiPAAF, under the coordination of CRA-Research Centre for Plant Pathology, in Rome.

Parole chiave

Azotofissazione, leguminose da granella, *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp

Keywords

Nitrogen-fixation, grain legumes, *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp

1.1 Introduzione

I rizobi sono batteri che vivono nel suolo. Essi sono capaci di instaurare una simbiosi mutualistica con le radici di piante appartenenti alla famiglia delle leguminose. Questa simbiosi è stata scoperta nel 1896 ed è una delle meglio conosciute e studiate. Grazie ad essa, i batteri si riforniscono di carboidrati, prodotti dalla pianta mediante la fotosintesi, mentre le piante si riforniscono di azoto ammoniacale assimilabile, prodotto dai batteri in seguito alla riduzione dell'azoto atmosferico. La presenza di rizobi sulle radici di leguminose è evidenziata dalla formazione di tubercoli radicali, di numero, forma e dimensione variabile soprattutto in funzione della specie di leguminosa (Foto 1).

I rizobi, sebbene con diversa densità, possono essere presenti in tutti i terreni: la loro capacità di adattamento a condizioni estreme (es. terreni salini, terreni semidesertici ecc.) rende le ricerche su questa specie batterica molto interessanti. Molte informazioni sono state acquisite riguardo gli aspetti fisiologici e genetici della simbiosi e riguardo l'importanza agronomica e ambientale di questo processo, che rende disponibile alle piante e agli altri organismi l'azoto atmosferico, diversamente non utilizzabile.

Di notevole interesse applicativo sono gli studi inerenti la selezione e l'impiego di ceppi dotati di maggiore efficienza azotofissatrice, strategia totalmente ecocompatibile da attuare per incrementare la produzione di granella e la fertilizzazione azotata, grazie alla fissazione biologica dell'azoto. Generalmente, la quantità di azoto fissato è di circa 100 kg ha⁻¹ per anno (cece, lenticchia, pisello), ma può arrivare anche a oltre 200 kg ha⁻¹ per anno (fava, erba medica).

La quantità di azoto fissato non dipende solo dalla specie di leguminosa, ma anche dalla varietà e dal ceppo di rizobio. Diversi esperimenti eseguiti in ambiente controllato e in pieno campo, hanno evidenziato come alcuni ceppi di rizobio siano più efficienti di altri nell'azotofissazione e come risultino più efficienti quando inoculati su alcune varietà piuttosto che su altre. Pertanto, ne consegue come l'impiego di una particolare combinazione ceppo di rizobio/varietà, possa incrementare la fertilità del suolo e la qualità e quantità della produzione. Inoltre, è stato evidenziato come alcuni ceppi di rizobio possano indurre, *in planta*, resistenza contro i patogeni.

Da circa 12 anni, presso i laboratori di Microbiologia e Difesa del CRA-ORT ubicati nell'Azienda Sperimentale di Battipaglia, vengono isolati ceppi di rizobio da diverse specie di leguminose da granella, al fine di studiarne la variabilità genetica (Foto 2) e la performance azotofissatrice. Grazie a questa attività, sono stati individuati diversi ceppi di rizobio capaci di incrementare significativamente la produzione di granella, in pieno campo, delle leguminose inoculate.



Foto 1 Tubercoli radicali su radici di cicerchia (foto Zaccardelli).

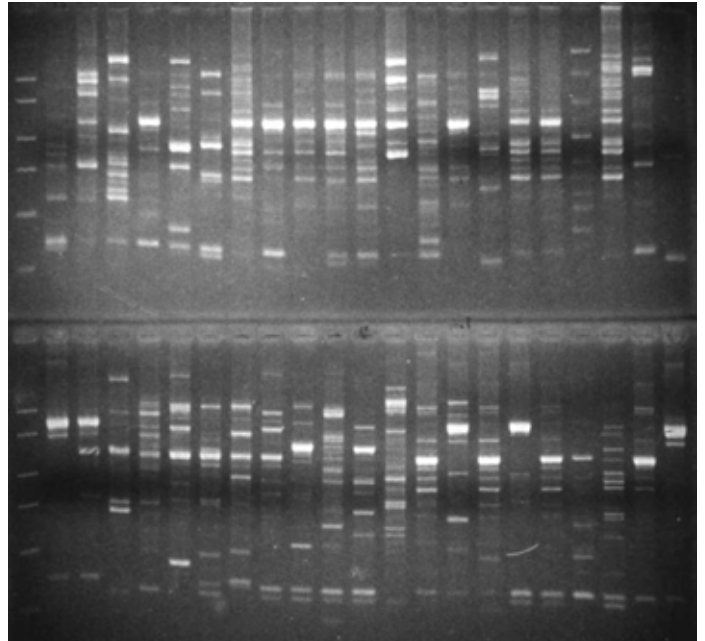


Foto 2 Variabilità genetica di ceppi di rizobio rilevata mediante M13-PCR (foto Zaccardelli).

1.2 Isolamento

L'isolamento dei rizobi avviene, in genere, dai tubercoli radicali. Qualora vi sia l'esigenza di isolarli direttamente dal suolo, si provvede a piantare i semi del legume, sterilizzati superficialmente, in vasi contenenti il terreno da analizzare. Una volta che le piante hanno raggiunto un sufficiente sviluppo, verranno asportati i tubercoli per l'isolamento dei batteri. Oltre che dal terreno, è possibile isolare rizobi anche dai semi. In questo caso, i semi del legume vengono posti direttamente in vasi contenenti agriperlite sterile e, dalle piante che si sviluppano, vengono prelevati i tubercoli per l'isolamento. L'isolamento dai tubercoli radicali avviene secondo quanto descritto nel manuale d'uso "Collezione di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale" (Petria, Vol. 21, 2011, 1-164). Avvenuto l'isolamento in purezza, si procede all'identificazione dei ceppi.

1.3 Identificazione

Il riconoscimento dei rizobi può avvenire utilizzando metodi biologici, biochimici e molecolari. L'identificazione con mezzi biologici consiste nell'eseguire test di nodulazione su una o più specie di leguminose, così da individuare la specie ed, eventualmente, la sottospecie di rizobio isolato. Questi test di nodulazione vengono eseguiti ricorrendo all'allevamento di piantine in vasi contenenti agriperlite sterile, secondo quanto descritto nel manuale d'uso "Collezione di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale" (Petria, Vol. 21, 2011, 1-164). Il test di nodulazione presenta lo svantaggio di richiedere molto tempo, ma fornisce indicazioni in merito all'efficienza azotofissatrice dei ceppi.

L'identificazione con mezzi biochimici si basa sul profilo catabolico mostrato dall'isolato da identificare. Un sistema biochimico di identificazione semplice da impiegare è il BIOLOG, che consiste nell'impiego di piastre con 96 pozzetti contenenti specifici substrati che, se metabolizzati dallo specifico ceppo da identificare, assumono una colorazione violacea. Con questo sistema viene fornita la risposta entro 48 h.

I metodi molecolari di identificazione dei rizobi si basano, come per la maggior parte dei batteri, sulla reazione a catena della polimerasi (PCR). Primer specifici per i geni *nodABC* sono stati disegnati per *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Questo protocollo di PCR è sicuramente molto valido ma, purtroppo, permette l'identificazione di solo questa sottospecie. Diversi altri metodi molecolari, universalmente usati per la caratterizzazione e l'identificazione

dei batteri, sono stati sviluppati per questa specie. Tra questi si ricordano l'amplificazione del 16S rDNA, seguita dall'analisi di restrizione (ARDRA) o, meglio ancora, dal sequenziamento; l'amplificazione di specifici geni implicati nell'azotofissazione, seguita dalla restrizione o dal loro sequenziamento. Tra i diversi metodi molecolari proposti, quello basato sul sequenziamento del 16S rDNA è il più accreditato. Avvenuta l'identificazione, si procede alla conservazione dei ceppi.

1.4 Conservazione

La conservazione dei rizobi avviene con le stesse modalità adottate per i batteri colture aerobi. Nel breve periodo (diversi mesi), i rizobi possono conservarsi in tubi di YEM-agar posti in frigorifero (4 °C). Nel lungo periodo (diversi anni), si ricorre alla preparazione di liofilizzati oppure, più semplicemente, alla crioconservazione (-80 °C). Quest'ultima avviene preparando sospensioni batteriche concentrate (almeno 10⁹ C.F.U. ml⁻¹) in YEM-brodo addizionato con il 20% di glicerolo.

Vista l'elevata variabilità dei rizobi dal punto di vista genetico, della specificità dell'ospite e dell'efficienza azotofissatrice, è estremamente importante conservare un numero molto elevato di ceppi affinché sia ben rappresentata la biodiversità di questo microrganismo simbiote. Pertanto, al fine di ridurre i tempi e i costi della conservazione, è anche possibile crioconservare a -80 °C direttamente i tubercoli, senza ricorrere all'isolamento dei rizobi.

1.5 Collegamenti con altre collezioni

La collezione del CRA-ORT è una collezione con scopi e usi scientifici nata e costruita sulle necessità dell'attività di ricerca del gruppo. Gli isolati della collezione ad oggi inseriti nel database COLMIA <http://www.colmia.it/>, una rete di collezioni di microrganismi di interesse agrario e ambientale finanziata dal MiPAAF, sotto il coordinamento del CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma, sono stati scelti in funzione della conservazione della biodiversità microbica. Anche in questo caso l'inserimento dei microrganismi è continuo nel tempo, ma ridotto rispetto alla collezione presente presso il CRA-ORT (Tab. 1), in quanto vengono generalmente inseriti isolati che sono già stati oggetto di studio.

La collezione CRA-COLMIA è inserita con il codice WDCM 945 nella lista delle collezioni "Culture Collections Information Worldwide" <http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/> del World Data Centre for Microorganisms <http://www.wfcc.info/ccinfo/home/>.

SPECIE DI RIZOBIO	PIANTA DI ORIGINE	N° ISOLATI
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	Pisello	181
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	Cicerchia	169
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	Favino/Fava	152
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Cece	189
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	Lenticchia	82
<i>Mesorhizobium loti</i>	Lupino	48
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i>	Fagiolo	138
	TOT.	959

Tabella 1 Collezione di rizobi in conservazione presso il CRA-ORT

1.6 Attività svolte e prospettive

Nel corso dei progetti MiPAAF finanziati sulle collezioni sono stati isolati, caratterizzati e conservati, circa 1000 isolati di rizobio ottenuti da diverse specie di leguminose da granella, quali pisello, favino, cece, lenticchia, cicerchia, lupino e fagiolo. Negli ultimi tre anni l'attenzione è stata focalizzata soprattutto sull'isolamento di ceppi da varietà locali di leguminose quali fagiolo, cece, cicerchia e lenticchia, coltivate in Campania, come ad esempio il "Fagiolo di Oliveto Citra", il "Fagiolo di Controne" e la "Lenticchia di Colliano". Per queste tre varietà locali, complessivamente sono stati ottenuti 28 isolati da piante di "Fagiolo di Oliveto Citra", 75 isolati da piante di "Fagiolo di Controne" e 34 isolati da piante di "Lenticchia di Colliano". Tutti i ceppi isolati sono stati caratterizzati per il polimorfismo del DNA mediante

M13-PCR. Questa analisi molecolare, rapida, riproducibile e poco costosa, ha evidenziato una discreta variabilità genetica della popolazione di rizobi, variabilità che riflette la diversa capacità azotofissatrice posseduta dai differenti ceppi. Questa differente capacità azotofissatrice è stata valutata in prove di pieno campo su "Fagiolo di Oliveto Citra", "Fagiolo di Controne" e "Lenticchia di Colliano" nei rispettivi areali tipici di coltivazione. In dettaglio, a Oliveto Citra (SA), sono stati inoculati 7 ceppi geneticamente diversi tra loro; a Controne (SA), sono stati inoculati 6 ceppi geneticamente diversi; a Colliano (SA), sono stati inoculati 17 ceppi, sempre geneticamente diversi tra loro. L'inoculazione è avvenuta imbrattando i semi con il pellet batterico dei diversi ceppi cresciuti in piastre di YEM-Agar. Dall'analisi delle produzioni di granella ottenute è stata evidenziata una maggiore performance azotofissatrice da parte di un ceppo di rizobio inoculato su "Fagiolo di Controne" (+34% di produzione di granella rispetto al controllo non inoculato) e da parte di tre ceppi di rizobio inoculati su "Lenticchia di Colliano" (fino a +79% di incremento di produzione di granella rispetto al controllo non inoculato); su "Fagiolo di Oliveto Citra", nessun ceppo ha dato incrementi di produzione.

Incrementi consistenti di produzione di granella di leguminose, ottenuti a seguito dell'inoculazione di specifici ceppi di rizobio, sono stati evidenziati anche in precedenti attività di campo condotte dal CRA-ORT (es. +40% per pisello e lenticchia; +32% per cece; +60% per lupino) (Zaccardelli et al. 2002, 2003, 2005, 2011). Nel caso di una sperimentazione condotta su lupino, è stato individuato un ceppo capace di determinare un elevatissimo incremento dell'azotofissazione, testimoniata sia da un aumento medio del valore dello SPAD del 16%, che dai notevolissimi incrementi di biomassa (+56% del numero di foglie; +29% dell'altezza del fusto; +47% dell'altezza dell'infiorescenza; +37% del numero di fiori) e, soprattutto, di sostanza secca (+168% per i tubercoli; +153% per le radici; +148% per lo stelo; +104% per l'infiorescenza; +90% per le foglie)



Foto 3 Piante di lupino differenziate sviluppate a seguito dell'inoculazione con ceppi di rizobio geneticamente differenti.

delle piante artificialmente inoculate, rispetto a quelle inoculate naturalmente (Foto 3). Pertanto, l'impiego di lupino batterizzato con questo specifico ceppo potrebbe essere interessante per arricchire notevolmente il terreno di azoto mediante la pratica del sovescio.

Tutti questi risultati, però, non sono sempre riproducibili, in quanto si opera in condizioni di pieno campo. Pertanto, per avere una prospettiva di sviluppo applicativo dell'inoculazione di ceppi di rizobio più efficienti, oltre ad individuare le migliori combinazioni varietà/ceppo, bisogna comprendere quali sono i fattori determinanti affinché la simbiosi azotofissatrice possa manifestarsi al meglio.

1.7 Bibliografia

- Allen, O.N. and Allen E.K., 1981. *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, USA.
- Ausubel F.M., et al., 1987. *Current protocols in molecular biology*, section 2.4.2. Wiley, New York, N.Y.
- Arfaoui A., El Hadrami A., Mabrouk Y., Sifi B., Boudabous A., El Hadrami I., Daayf F., Chèrif M., 2007. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 470-479.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.C., Struhl, K., 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York.

- Barba M., Belisario A., Luongo L. (eds.), 2011. Manuale d' Uso "Collezione di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale". Petria, Vol. 21(1), 1-164.
- Chemining'wa George N., Vessey Kevin J., 2006. The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 294-302.
- Giller, K.E., 2001. *Nitrogen fixation 1 in tropical cropping systems*. CABI Publishing, 4pp.
- Hentschel, U., Steinert, M., and Hacker, J., 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 8, 226-231.
- Hobbs, S.L.A. and Mahon, J. D., 1982. Effects of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes and *Rhizobium leguminosarum* strains on N₂(C₂H₂) fixation and growth. *Canadian Journal of Botany*, 60: 12, 2594-2600.
- Hungria M., de S. Andrade Diva, de O. Chueire L. M., Probanza A., Guttierrez-Mañero F. J., Megias M., 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 1515-1528.
- Palacios R. and Newton W.E., 2005. *Genome and Genomics of Nitrogen-fixing Organism*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 247 pp.
- Pii Y., Astegno A., Peroni E., Zaccardelli M., Pandolfini T. and Crimi M., 2009. The *Medicago truncatula* N5 Gene Encoding a Root-Specific Lipid Transfer Protein Is Required for the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 22, 1577-1587
- Ram, G. and Sanoria, C.L., 1979. Effect of seed inoculation on peas (*Pisum sativum* L.) with *Rhizobium* and *Azotobacter* in alkaline soil. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 27, 489-491.
- Rengel Z., 2002. Breeding for better symbiosis. *Plant and Soil*, 245, 147-162.
- Rodriguez-Navarro, D.N., Santamaria, C., Temprano, F., Leidi, E.O., 1999. Interaction effects between *Rhizobium* strain and bean cultivar on nodulation, plant growth, biomass partitioning and xylem sap composition. *European Journal of Agronomy*, 11, 131-143.
- Rudresh D.L., Shivaprakash M.K., Prasad R.D., 2005. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Applied Soil Ecology*, 28, 139-146.
- Ryskov, A. P., Jincharadze, A. G., Prosnjak, M. I., Ivanov, P. L., Limborska, S. A., 1988. M 13 phage DNA as an universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganism. *Febs Letters*, 233, 388-392.
- Sneath, P H A, Sokal, R. R., 1973. *Numerical taxonomy. The principle and practice of numerical Classification*. W.H. Freeman and Co. San Francisco, 573 pp.
- Somasegaran P. and Hoben H.J., 1994. *Handbook for Rhizobia: methods in legume rhizobium technology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 450 pp.
- Spaink H.P., Kondorosi A.A., Hooykaas P. J. J., 1998. *The Rhizobiaceae*. Springer, 566 p.p.
- Sprent J. I. (2001). Nodulation in legumes. *Royal Botanic Garden*, 146 pp.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., and Matsuguchi, T., 1995. Remarkable N₂-fixing Bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 177, 1414-1417.
- Vauterin, L., Vauterin, P., 1992. A new system for standardization and objective comparison of electrophoresis patterns: applications in bacterial identification. In: Proceeding of the Conference on Taxonomy and automated identification of bacteria (ed. J. Schindler), Prague, 19-22.
- Xavier L.J.C., Germida J.J., 2002. Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 181-188.
- Young, J.P.W., Johnston, A.W.B., Brewin, N.J., 1982. A search for peas (*Pisum sativum* L.) showing strain specificity for symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Heredity*, 48, 197-201.
- Zaccardelli, M., Del Galdo, A., Parisi, M., Giordano, I., 2002. Caratterizzazione molecolare di isolati di *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* e loro impiego, in pieno campo, per il miglioramento produttivo del pisello proteico. *Agroindustria*, 1 (3), 153-158.
- Zaccardelli M., De Falco E., Landi G., Lupo F., 2003. Valutazione degli effetti di diversi genotipi di *Mesorhizobium ciceri* inoculati su cece in pieno campo. Primi risultati. Atti XXXV Convegno della Società Italiana di Agronomia: 141-142.

- Zaccardelli M., Del Galdo A, Giordano I., 2005. Inoculazione, in pieno campo, di due ceppi di rizobio più efficienti per incrementare la produttività di pisello proteico. Atti del XXXVI Convegno SIA "Ricerca ed innovazione per le produzioni vegetali e la gestione delle risorse agro-ambientali:308-309. Foggia, 20-22 settembre.
- Zaccardelli M., Campanile F., Moretti C, Buonauro R., 2008. Characterization of Italian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using primers designed on DNA repetitive sequences. *Journal of Plant Pathology*, 90, 375-381.
- Zaccardelli M., Campanile F., Del Galdo A., Lupo F., 2012. Selection of *Rhizobium* isolates able to improve productivity of lentil (*Lens culinaris* Medik). *Acta Agriculturae Scandinavica*, Section B – Soil & Plant Science, 62: 256-262.

COLLEZIONE DI BATTERI DIAZOTROFI ED ELETTROGENICI ISOLATI DAL SUOLO*

Stefano Mocali, Maurizio Castaldini

CRA-ABP Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia
Piazza D'Azeglio, 30 – 50121 Firenze

Riassunto

Il suolo è una matrice estremamente complessa, forse la più complessa in natura, che contiene la più grande quantità di biodiversità e di biomassa vivente dell'intero pianeta. La maggior parte degli organismi che vi risiedono sono prevalentemente microrganismi (batteri, funghi, protozoi, ecc.) che giocano un ruolo chiave per le funzioni e la qualità del suolo. Essi presiedono, per esempio, alla formazione e al mantenimento della struttura del suolo, alle trasformazioni della sostanza organica, ai cicli di tutti i nutrienti indispensabili per le piante, alle risposte agli stress e al mantenimento della fertilità del suolo. In realtà anche se rappresenta la più grande biodiversità del pianeta, la comunità microbica del suolo è ancora perlopiù indefinita e rappresenta un enorme serbatoio inesplorato di diversità genetica e funzionale.

La collezione di microrganismi del CRA-ABP contiene prevalentemente batteri diazotrofi, ovvero che fissano l'azoto, sia liberi (es. *Azotobacter*) che simbiotici (es. *Sinorhizobium*). Tali organismi sono di notevole interesse per alcune industrie sementiere con cui sono in corso delle collaborazioni e delle sperimentazioni in pieno campo volte alla commercializzazione delle sementi trattate. Recentemente la collezione di microrganismi del CRA-ABP si è arricchita anche di batteri "elettrogenici", ovvero in grado di produrre elettricità, isolati da suolo e dalle affascinanti prospettive applicative. Nel presente capitolo vengono descritte anche le attività di mantenimento e di valorizzazione messe in atto per la collezione.

Summary

Soil is a very complex matrix, perhaps the most complex in nature, which contains the largest amount of living biomass and biodiversity of the planet. Most of the organisms living within it are mainly microorganisms (bacteria, fungi, protozoa, etc..) that play a key role in both functions and quality of soil environment. They preside, for example, the formation and the maintenance of soil structure, the transformation of organic matter, the cycles of all the nutrients essential for plants, the responses to stress and the maintenance of soil fertility. Indeed, even if it represents the largest biodiversity on the planet, the soil microbial community is still largely undefined and represents a huge untapped reservoir of genetic and functional diversity.

The collection of microorganisms of the CRA-ABP contains mostly diazotrophic bacteria, which are nitrogen-fixing organisms, both free (eg. *Azotobacter*) and symbiotic (eg. *Sinorhizobium*). Actually these organisms are of considerable interest for some seed industries and several collaborations and experiments in open field are in progress in order to commercialize treated seeds. Recently, the collection of microorganisms of the CRA-ABP has also been enriched of "electrogenic" bacteria, capable of producing electricity, isolated from soil and promising interesting applications. This chapter also describes the maintenance and enhancement activities implemented for the collection.

Parole chiave

Batteri diazotrofi, Microbiologia del suolo, Biodiversità, Ciclo dell'azoto, Rizobi, Sementi, Progetto Colmia

Keywords

Diazotrophic bacteria, Soil microbiology, Biodiversity, Nitrogen cycle, Rhizobia, Seeds, Colmia project

* doi:10.4458/0986-12

1 COLLEZIONE DI BATTERI DIAZOTROFI ED ELETTROGENICI ISOLATI DAL SUOLO

1.1 INTRODUZIONE

1.1.1 Le collezioni di microrganismi

La necessità di conservare i microrganismi per studiarli od utilizzarli in tempi successivi ha costituito argomento d'interesse già dalla metà dell'Ottocento, quando Pasteur e Koch segnarono la nascita della microbiologia. Infatti, con lo sviluppo delle tecniche di coltivazione in purezza su substrati artificiali, si è arrivati a conseguire l'isolamento dei microrganismi e il loro mantenimento come ceppi individuali. Grazie a questo traguardo iniziarono a sorgere le collezioni di microrganismi, inizialmente riguardanti piccole raccolte di isolati ad uso esclusivo e personale di singoli ricercatori. Successivamente alcune di queste collezioni sono cresciute a tal punto da richiedere una organizzazione, del personale e finanziamenti appositi. Il fine principale di queste collezioni è la conservazione di microrganismi che hanno importanza attuale o potenziale. Attualmente esistono numerose collezioni di microrganismi nel mondo, di cui ricordiamo solo alcune delle più prestigiose:

- 1) La collezione di microrganismi presso *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) della "Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW)" di Utrecht in Olanda (<http://www.cbs.knaw.nl/>)
- 2) La "American Type Culture Collection" (www.atcc.org) negli Stati Uniti d'America
- 3) Il "Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and cell cultures" (<http://www.dsmz.de/home.html>)
- 4) La "Belgian co-ordinated collections of micro-organisms (BCCM)" (<http://bccm.belspo.be/index.php>)
- 5) La "Health Protection Agency Culture Collections" della Health Protection Agency (HPA), a Salisbury nel Regno Unito (<http://www.hpacultures.org.uk/>)

In Italia il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MiPAAF) ha finanziato un progetto nazionale "Collezione di microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale" (COLMIA) (<http://www.colmia.it>) per mantenere le collezioni presenti nei diversi Istituti del Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (C.R.A.), frutto di ricerche finanziate da organismi pubblici o privati.

Le collezioni di microrganismi, oltre a rappresentare una preziosa riserva di biodiversità, consentono di mettere a disposizione della comunità una serie di organismi di sicura caratterizzazione in quanto preventivamente identificati e studiati sia a livello genetico che morfologico-funzionale. Pertanto, le collezioni di microrganismi hanno l'obiettivo di fornire materiale biologicamente attivo, fenotipicamente e/o genotipicamente caratterizzato, sul quale fondare le attività di ricerca in termini produttivi, comparativi e cognitivi. Di conseguenza, anche da un punto di vista applicativo, l'immediata disponibilità di microrganismi utili alle diverse esigenze delle filiere agroalimentari e/o ambientali rappresenta una risorsa da valorizzare e conservare con estrema cura.

Tra i microrganismi d'interesse ambientale, un ruolo di indiscutibile rilievo è ricoperto dai microrganismi del suolo che sovrintendono a tutta una serie di funzioni vitali per il suolo e, quindi, per l'intero pianeta. Essi costituiscono un enorme serbatoio di vita "invisibile" che è alla base delle trasformazioni della sostanza organica, dei cicli biogeochimici, dei nutrienti, della stabilità e la struttura del suolo, del biorisanamento, del flusso dell'acqua, delle risposte agli stress, della fertilità biologica e della sostenibilità del suolo.

La collezione di batteri diazotrofi del suolo, ovvero in grado di fissare l'azoto atmosferico in composti azotati biologicamente utilizzabile dalle piante (es. l'ammoniaca), presente presso i laboratori di microbiologia del suolo del CRA-ABP di Firenze rappresenta solo una parte della più vasta "Collezione di microrganismi di interesse agrario, industriale e ambientale (COLMIA)". La collezione di batteri mantenuta presso il CRA-ABP contiene anche, come di seguito descritto, organismi isolati dal suolo e selezionati per la produzione di elettricità, i cosiddetti batteri "elettrogenici" (<http://bem.entecra.it>), e altri batteri di notevole rilevanza applicativa.

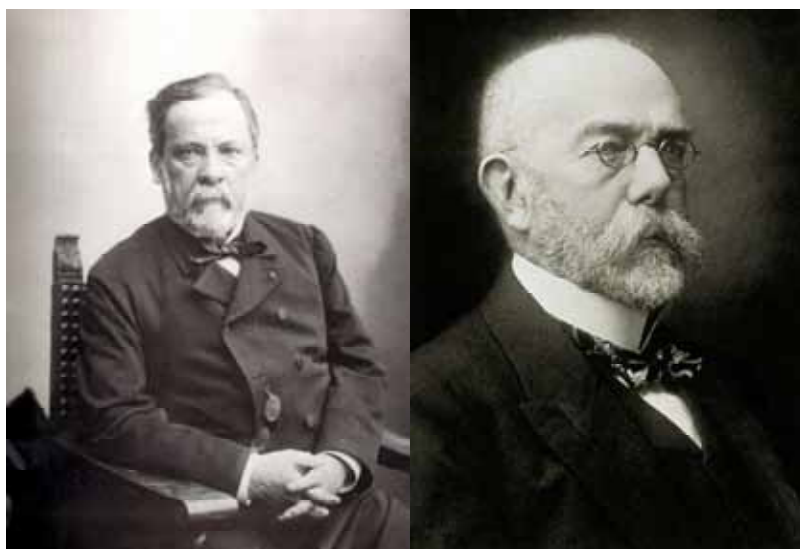


Figura 1 - Louis Pasteur (1822-1895) e Robert Koch (1843-1910). Grazie alle loro scoperte e alla loro attività di ricerca si è sviluppata la moderna microbiologia.

1.1.2 Il progetto COLMIA

Il progetto "Collezione di microrganismi d'interesse agrario, industriale e ambientale (COLMIA)", finanziato dal MiPAAF e coordinato dalla Dott.ssa Barba (CRA-PAV) fino al 2009, è stato successivamente "assorbito" dal progetto di ricerca "Mantenimento di Collezioni, Banche Dati ed altre Attività Ordinarie di rilevante interesse pubblico - COLLEZIONI E A-OR", sempre finanziato dal MiPAAF con DM 19447/7301/08 del 23/12/2008 e con DM 30287/7301/09 del 23/12/2009 e coordinato dalla Dott.ssa Fidalma D'Andrea (CRA-Sede Centrale).

Attualmente il progetto COLMIA è rientrato nel WP3 (Biodiversità zoologica, zootecnica e dei microrganismi) del progetto "Conservazione biodiversità, gestione banche dati e miglioramento genetico - BIODATI", coordinato dalla Dott.ssa D'Andrea, il cui obiettivo generale è il proseguimento delle attività di pubblico interesse esplicito dalle Strutture del CRA riguardo al miglioramento genetico, alla raccolta, caratterizzazione, valorizzazione e conservazione del germoplasma vegetale, animale e dei microrganismi, al mantenimento delle banche dati telematiche ed a tutte le altre attività di servizio.

Nell'ambito del progetto BIODATI, gli obiettivi specifici del COLMIA riguardano i seguenti aspetti: la valorizzazione delle collezioni zoologiche, mantenimento di ceppi selezionati di acari, insetti e nematodi e aggiornamento di data base esistente; mantenimento, informatizzazione, aggiornamento e conservazione delle collezioni di microrganismi di interesse agrario, industriale e ambientale (microrganismi del suolo, microrganismi entomo-fitopatogeni e funghi e batteri, costituzione di un database di ceppi di funghi micorrizici); in particolare il ruolo del CRA-ABP nel progetto COLMIA consiste nel mantenimento in condizioni di purezza e vitalità di ceppi batterici diazotrofi liberi.

La collezione COLMIA è stata adeguata agli standard internazionali indispensabili ad un suo riconoscimento in ambito nazionale ed estero attraverso l'iscrizione alla "World Data Center for Microorganism" (WDCM) che ha previsto una preventiva accettazione nell'ambito di "World Federation for Culture Collection (WFCC) (<http://www.wfcc.info/>). Al Progetto afferiscono nove strutture di ricerca del CRA distribuite sul territorio nazionale e coinvolte, a vario titolo, nello studio di microrganismi di interesse agroindustriale e alimentare (CRA-FLC, CRA-ENO, CRA-OLI), microrganismi fitopatogeni (CRA-PAV, CRA-CAT), microrganismi entomopatogeni (CRA-ABP) e microrganismi utili del suolo (CRA-ABP, CRA-RPS, CRA-CIN).

La collezione, interattiva per i partecipanti e consultabile dagli utenti, contiene informazioni sull'identificazione del microrganismo, sulle sue caratteristiche biologiche, colturali e genetiche, sulle diverse modalità di conservazione e sulla eventuale disponibilità ad essere inviato a istituzioni diverse. Per ulteriori informazioni riguardanti il progetto consultare il sito internet del progetto (<http://www.colmia.it>).

1.1.3 La collezione di batteri del suolo del CRA-ABP

La collezione di batteri del suolo mantenuta presso il CRA-ABP di Firenze viene periodicamente aggiornata ed ampliata rispettando le linee guida concordate nel progetto COLMIA e che prevedono:

- *il continuo ampliamento della collezione con l'acquisizione di nuovi microrganismi di interesse agrario, industriale o ambientale;*
- *la caratterizzazione e valutazione dell'attività di tali microrganismi;*
- *la valutazione dei metodi di conservazione migliori per ciascun isolato, tali da garantire il mantenimento dei parametri biometrici, fisiologici e biochimici.*

Per la gestione della collezione il CRA-ABP si avvale di personale qualificato, esperto della tassonomia e dei caratteri distintivi dei microrganismi in essa conservati. La costituzione di questa collezione scaturisce dall'attività di ricerca del Centro nell'ambito della scienza del suolo, e la selezione dei microrganismi da includere nella collezione, adeguatamente caratterizzati, qualificanti e rappresentativi, deve essere svolta secondo i seguenti passaggi:

1. Identificazione: le metodologie adottate variano a seconda della tipologia del microrganismo in esame e riguardano lo studio dei caratteri colturali, morfologici, biochimici, genomici, sierologici, ecc. Sulla base dei parametri osservati il microrganismo è schedato e classificato;
2. Caratterizzazione: i microrganismi di particolare interesse sono sottoposti ad analisi sia fenotipiche, sia molecolari, volte a una loro migliore identificazione e biotipizzazione. Queste analisi possono riguardare la valutazione di profili genotipici (es: ARDRA, RAPD), o di attività enzimatiche di interesse industriale, il sequenziamento totale o parziale del genoma o di porzioni del genoma, l'eventuale valutazione di aspetti di sicurezza (es. antibiotico-resistenza), ecc.
3. Conservazione: le modalità di conservazione variano a seconda del microrganismo. Più in generale, gli isolati sono mantenuti su substrati agarizzati, in acqua distillata sterile, su carta, in azoto liquido, in glicerolo a -80°C, in olio minerale oppure liofilizzati.
4. Informatizzazione dei risultati: le informazioni relative ad ogni ceppo batterico della collezione sono inserite nel data-base del progetto COLMIA che riguarda sia l'organizzazione delle informazioni interne alle singole collezioni, sia quelle relative ai microrganismi che si intendono inserire nella collezione che sono organizzate in maniera interattiva: ogni UO del progetto ha una chiave d'accesso che consente l'aggiornamento del data base;
5. Costituzione della banca dati: le schede descrittive dei microrganismi sono raccolte in una banca dati suddivisa in tre settori:
 - microrganismi di interesse agroindustriale e alimentare
 - microrganismi entomo-fito patogeni
 - microrganismi utili del suolo

L'attività si articola in:

- Ampliamento di una collezione precedentemente costituita attraverso l'introduzione di nuovi isolati o ceppi di particolare interesse;
- Caratterizzazione dei microrganismi di nuova introduzione o già presenti in collezione attraverso la definizione di tutti i parametri descrittivi necessari ad una loro sicura identificazione;
- Mantenimento dei microrganismi in collezione utilizzando metodologie atte a garantirne la vitalità, la purezza ed eventuale attività funzionale;
- Distribuzione di microrganismi ad istituzioni di ricerca che ne facciano eventuale richiesta.

Tutte le informazioni necessarie a caratterizzare ed identificare i microrganismi in collezione sono state riportate nel Manuale d'uso "Collezione di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale" (Barba et al., 2011). Esso riporta alcune brevi informazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche e biologiche dei diversi microrganismi presenti nella collezione e sul loro utilizzo nel settore agrario, industriale ed ambientale, nonché alcune indicazioni sulle modalità di campionamento, coltivazione, isolamento, caratterizzazione e conservazione utilizzate da tutti coloro che concorrono al mantenimento e alla gestione della collezione COLMIA. Questo manuale può rappresentare una base d'informazione per tutti coloro che sono interessati alla conservazione di microrganismi.

Tabella 1 – Lista dei batteri mantenuti in collezione presso il CRA-ABP (Firenze)

N°	Codice	Denominazione specie	Ceppo
1	CRA-ABP2886	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#425
2	CRA-ABP2274	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#827
3	CRA-ABP2243	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#758
4	CRA-ABP2241	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#755
5	CRA-ABP2192	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#381
6	CRA-ABP2179	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#370
7	CRA-ABP2178	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#369
8	CRA-ABP2171	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	#106
9	CRA-ABP2890	<i>Arthrobacter globiformis</i>	#854
10	TiS_AE_15	<i>Arthrobacter oryzae</i>	S32118
11	TfS_AE_9	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1663a
12	TfS_AE_3B	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1663b
13	TfS_AE_12	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1663c
14	TfS_AE_11	<i>Arthrobacter sp.</i>	17a-2b
15	TiS_AE_16	<i>Arthrobacter sp.</i>	17a-2
16	TfS_AE_7	<i>Arthrobacter sp.</i>	SC17Y
17	TfS_AE_14	<i>Arthrobacter sp.</i>	HTCC345
18	CRA-ABP2894	<i>Azospirillum brasilense</i>	#858
19	CRA-ABP2893	<i>Azospirillum brasilense</i>	#857
20	CRA-ABP2892	<i>Azospirillum brasilense</i>	#856
21	CRA-ABP2891	<i>Azospirillum brasilense</i>	#855
22	CRA-ABP2901	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#867
23	CRA-ABP2900	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#865
24	CRA-ABP2899	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#864
25	CRA-ABP2898	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#863
26	CRA-ABP2896	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#861
27	CRA-ABP2895	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#859
28	CRA-ABP2204	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#397
29	CRA-ABP2174	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#356
30	CRA-ABP2172	<i>Azotobacter chroococcum</i>	#347
31	CRA-ABP2903	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#380
32	CRA-ABP2902	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#379
33	CRA-ABP2230	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#436
34	CRA-ABP2229	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#435
N°	Codice	Denominazione specie	Ceppo
35	CRA-ABP2227	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#430
36	CRA-ABP2216	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#428
37	CRA-ABP2215	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#426
38	CRA-ABP2208	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#423
39	CRA-ABP2202	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#386
40	CRA-ABP2199	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#385
41	CRA-ABP2193	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#383
42	CRA-ABP2187	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#378
43	CRA-ABP2181	<i>Azotobacter vinelandii</i>	#374
44	TfS_AE_10	<i>Bacillus megaterium</i>	PEBM08010813
45	TiS_AE_2B	<i>Bacillus nealsonii</i>	BP11_4°
46	TfS_AE_1B	<i>Bacillus sp.</i>	2BSG-MG-5
47	TiS_AE_5	<i>Bacillus sp.</i>	PDK002 16S
48	TfS_AE_8	<i>Bacillus sp.</i>	SC-A5-16
49	TfS_AE_1A	<i>Bacillus sp.</i>	ZSA
50	TiS_AE_14A	<i>Bacillus subtilis</i>	GH38
51	TiS_AE_10	<i>Bacillus subtilis</i>	LXB3

52	TiS_AE_18	<i>Bacillus subtilis</i>	subsp. Inaquosorum
53	TiS_AE_2A	<i>Bacillus tequilensis</i>	km11
54	TfS_AN_1	<i>Clostridium</i> sp.	BXM
55	TfS_AN_3	<i>Enterobacter cloacae</i>	LCR82b
56	E_AE_15	<i>Enterobacter cloacae</i>	LCR82
57	E_AN_1	<i>Enterobacter</i> sp.	VET-7
58	TiS_AE_4A	<i>Lysinibacillus</i> sp.	EK-I66
59	TiS_AE_13	<i>Lysinibacillus</i> sp.	EK-I66
60	TiS_AE_1	<i>Lysinibacillus</i> sp.	E4
61	CRA-ABP2897	<i>Paenibacillus azotofixans</i>	#862
62	CRA-ABP2889	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#853
63	CRA-ABP2888	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#852
64	CRA-ABP2887	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#851
65	CRA-ABP2256	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#796
66	CRA-ABP2255	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#795
67	CRA-ABP2251	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#792
68	CRA-ABP2245	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#761
69	CRA-ABP2238	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#754
70	CRA-ABP2170	<i>Paenibacillus polymixa</i>	#307
71	TiL AE3_C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H51
72	CRA-ABP2237	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	#592
73	CRA-ABP2236	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	#591
74	CRA-ABP2207	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	#408
75	CRA-ABP2228	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	#433
76	CRA-ABP2235	<i>Pseudomonas putida</i>	#590
77	CRA-ABP2517	<i>Rhizobium gallicum</i>	#850
78	CRA-ABP3284	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	BL225C
79	CRA-ABP3283	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK58
80	CRA-ABP3282	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK83
81	CRA-ABP3281	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Rm1021
82	CRA-ABP2273	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	#818
83	CRA-ABP2266	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	#801
84	CRA-ABP2248	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	#782
85	CRA-ABP2246	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	#774
86	CRA-ABP2244	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	#759
87	CRA-ABP2233	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	#585
88	CRA-ABP2226	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	#429

1.1.4 I microrganismi del suolo

Il suolo è una matrice complessa, forse la più complessa in natura, ed è considerato un sistema polifasico costituito prevalentemente da una fase solida (50%), una liquida (25%) e una gassosa (25%). Tali rapporti sono da considerarsi assolutamente indicativi e possono variare notevolmente a seconda del suolo che si prende in considerazione. L'enorme variabilità dei suoli in funzione della località geografica fa sì che si parli sempre più di "suoli" piuttosto che di "suolo" in senso assoluto. Tuttavia, per semplicità continueremo ad utilizzare il termine suolo. La sua fase solida è costituita da una componente inorganica (96-97%) e una organica (3-4%). Quest'ultima comprende la frazione vivente del suolo, composta da un'innomerevole quantità di microrganismi (batteri, funghi, alghe, attinomiceti, protozoi, vermi e artropodi) che entra in stretta relazione con le piante formando un ecosistema unico. Infatti la microflora tellurica rappresenta la parte più rilevante della biomassa del suolo, ed è quella che maggiormente influisce sulle sue proprietà biologiche regolandone tutti i processi biochimici che ne determinano le proprietà nutrizionali (Bloem et al., 2003) (Fig. 2). Inoltre forse non tutti sanno che il suolo è considerato il più grande serbatoio di biodiversità del pianeta (Sleator et al., 2008). Solo recentemente, infatti, grazie alle tecniche molecolari più avanzate è stato possibile rendersi conto dell'enorme patrimonio vivente presente nel suolo (van der Heijden et al., 2008). Finora le teorie ecologiche nello studio della diversità biologica (biodiversità) sono

state sviluppate essenzialmente per gli ecosistemi presenti sulla superficie del suolo, trascurando per lungo tempo tutte quelle forme di vita che sono presenti all'interno di esso, in particolare i microrganismi che, come riportati in precedenza, rappresentano una enorme quantità di "vita invisibile" di fondamentale importanza per l'intera vita sulla terra (Wardle and Giller, 1996). Le diverse specie di microrganismi presenti nel suolo hanno, infatti, ruoli prioritari nelle trasformazioni dell'energia e nei processi biogeochimici, intervenendo nella decomposizione del materiale organico attraverso processi biodegradativi e nel riciclo di elementi essenziali quali carbonio, fosforo, azoto ed altri; in tal modo portano a termine specifiche reazioni di ossido-riduzione che permettono agli elementi di rendersi così disponibili in forme utilizzabili soprattutto dalle piante (Alexander, 1977). La diversità dei microrganismi all'interno di un ecosistema è quindi un elemento chiave anche per il mantenimento in uno stato qualitativamente salutare del suolo agrario (Borneman, 1996).

Per quanto riguarda il terreno agrario si deve precisare che, oltre alla funzione di sostenere e nutrire le piante, il suolo deve renderne possibile la loro coltivazione con un utile economico. Il concetto di fertilità viene, infatti, definito come la capacità del terreno di rendere produttive le colture. Tuttavia, mentre si parla comunemente di fertilità chimica (somma degli elementi nutritivi in forma assimilabile a disposizione delle colture) e di fertilità fisica (struttura, tessitura del terreno etc.), molto meno considerata è la fertilità biologica del suolo. Con tale termine si vuole caratterizzare l'espressione del metabolismo e del turnover microbico. La fertilità biologica di un terreno può essere dunque definita come un'espressione della vita microbica dei suoli e dipende soprattutto dalla sostanza organica e dall'ambiente. La moderna agricoltura dovrebbe perciò prefiggersi lo scopo di raggiungere la massima produttività consentita dalle condizioni edafiche, mantenendo elevato non solo il livello della fertilità chimica, ma anche di quella biologica.

È noto che la funzione dei microrganismi del suolo è di molteplice natura e si esplica sia nei processi pedogenetici che nella nutrizione delle piante. Inoltre occorre ricordare i rapporti che i microrganismi instaurano con le piante nella zona rizosferica, fillosferica e spermosferica, nonché nella simbiosi micorrizica. I microrganismi rappresentano dunque una componente di fondamentale importanza per la fertilità dei terreni e svolgono un ruolo insostituibile, in mancanza del quale il terreno rappresenterebbe semplicemente un inerte supporto meccanico. Una delle funzioni più importanti dei microrganismi è appunto quella di presiedere alle trasformazioni a carico degli elementi nutritivi in modo da mantenere un equilibrio di scambio tra suolo e pianta, contribuendo così allo stato di fertilità dei terreni.

La fertilità biologica, unitamente alla fertilità chimica ed a quella fisica, costituisce la fertilità agronomica, o integrale, dalla quale dipende la produttività. La fertilità tuttavia non è sinonimo di produttività, in quanto la prima dipende dal terreno mentre la seconda sia dal terreno che dalla pianta. Inoltre le basi biologiche della produttività riferite ad un terreno naturale non coincidono con quelle della produttività agronomica in quanto quest'ultima rappresenta un livello produttivo superiore a quello naturale. La produttività di un suolo è strettamente correlata, invece, al concetto di "qualità". In questi ultimi anni sono state date molte definizioni di qualità del suolo, ma quella che sembra riassumere meglio il concetto è stata proposta da Doran e Parkin (1994): "La capacità del suolo di interagire con l'ecosistema per mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale e promuovere la salute animale e vegetale". Nell'ambito di numerosi dibattiti sono state avanzate proposte sulle procedure da adottare a livello internazionale per la valutazione della qualità del suolo, e sono stati indicati dei parametri fisici, chimici e biologici come indicatori base per la qualità del suolo.

Il numero dei microrganismi presenti nel suolo e l'abbondanza relativa di ciascun gruppo microbico variano enormemente sia all'interno di suoli differenti che in relazione alle specie vegetali e agli altri organismi presenti. Ma perché è così difficile definire e soprattutto "misurare" la diversità microbica del suolo? Perché, nonostante le comunità microbiche del suolo siano il punto focale di molte funzioni, in passato - prima della diffusione delle moderne biotecnologie - è stato difficile definire il concetto di "diversità" per i microrganismi e attribuire alle diverse popolazioni microbiche la corrispondente funzione?

I motivi sono molteplici, basti pensare alla definizione classica di diversità biologica e la sua suddivisione in diversità "ecosistemica, di specie e genetica" attribuita ad animali e piante; essa può essere estesa anche ai microrganismi del suolo, ad eccezione però della definizione di diversità di specie in quanto non applicabile ad organismi che si riproducono per via asexuata come batteri e virus. La diversità microbica è quindi comunemente definita in termini di

richness, ovvero il numero degli individui appartenenti a diversi "gruppi" detti taxa, e di *evenness* cioè alla loro distribuzione all'interno dei taxa stessi (Atlas e Bartha, 1998).

Un altro motivo risiede nel fatto che lo studio dei microrganismi richiede necessariamente strumenti e metodologie differenti rispetto a quelli utilizzati per lo studio degli organismi superiori. È relativamente semplice contare e catalogare piante ed animali sulla base di parametri facilmente identificabili senza bisogno di utilizzare alcuna strumentazione. Ben più complicato diventa, invece, osservare e catalogare migliaia di organismi che, nonostante il loro elevatissimo numero, non si vedono a occhio nudo (le dimensioni medie di un batterio sono infatti di circa un milionesimo di metro) e il loro studio richiede l'utilizzo di strumenti e tecnologie sofisticate. Con tali strumenti è stato possibile stimare la presenza di circa un miliardo di batteri per grammo di suolo, suddivisi in svariate migliaia di taxa differenti, ma la maggior parte di questi microrganismi rimane ancora sconosciuto. Utilizzando tecniche di microscopia e di riassociazione del DNA, infatti, è stato dimostrato che solo l'1% del numero totale delle cellule batteriche presenti in campioni di suolo può essere coltivato in vitro, sui terreni di coltura comunemente utilizzati in laboratorio (Torsvik et al., 1990), lasciando quindi ancora aperta la grande sfida di mettere in relazione la funzione con l'individuo.

Mantenere in collezione i microrganismi del suolo rappresenta quindi una necessità irrinunciabile soprattutto nel caso di studi a livello ambientale per comprendere quali pressioni realmente possano intervenire da parte dell'uomo o di eventi ambientali sul suolo, quali i cambiamenti climatici, la deforestazione, le colture OGM (Mocali, 2010) o la stessa agricoltura intensiva (Mocali et al., 2008). Inoltre alcuni ceppi microbici o fungini possono essere utilizzati come biomarcatori e, quindi, fungere da eccellenti bioindicatori ambientali.

Il suolo rappresenta comunque una miniera di organismi, di geni e di molecole perlopiù inesplorata e, dallo studio e dalla caratterizzazione dei microrganismi ivi presenti è possibile individuarne sia le funzioni ecologiche che le potenziali applicazioni in molti processi biotecnologici, che spaziano dalla bioenergia alla biofertilizzazione, dal biorecupero alla biodegradazione, ecc.

Oggi si è in grado, attraverso appropriati indicatori microbiologici, biochimici e molecolari, di definire la qualità e la salute di un suolo (Bloem et al., 2006), prevederne ed arginarne processi di degrado, fino alla desertificazione, nonché calibrare correttamente gli interventi di fertilizzazione con una gestione integrata dei nutrienti, sulla base della conoscenza del ciclo e del bilancio dei diversi elementi nutritivi, quali ad esempio l'azoto. Su questo principio si possono basare tutti gli studi che rientrano nel tema della metagenomica del suolo (Mocali e Benedetti, 2010).

Collezione di batteri diazotrofi ed elettrogenici isolati dal suolo

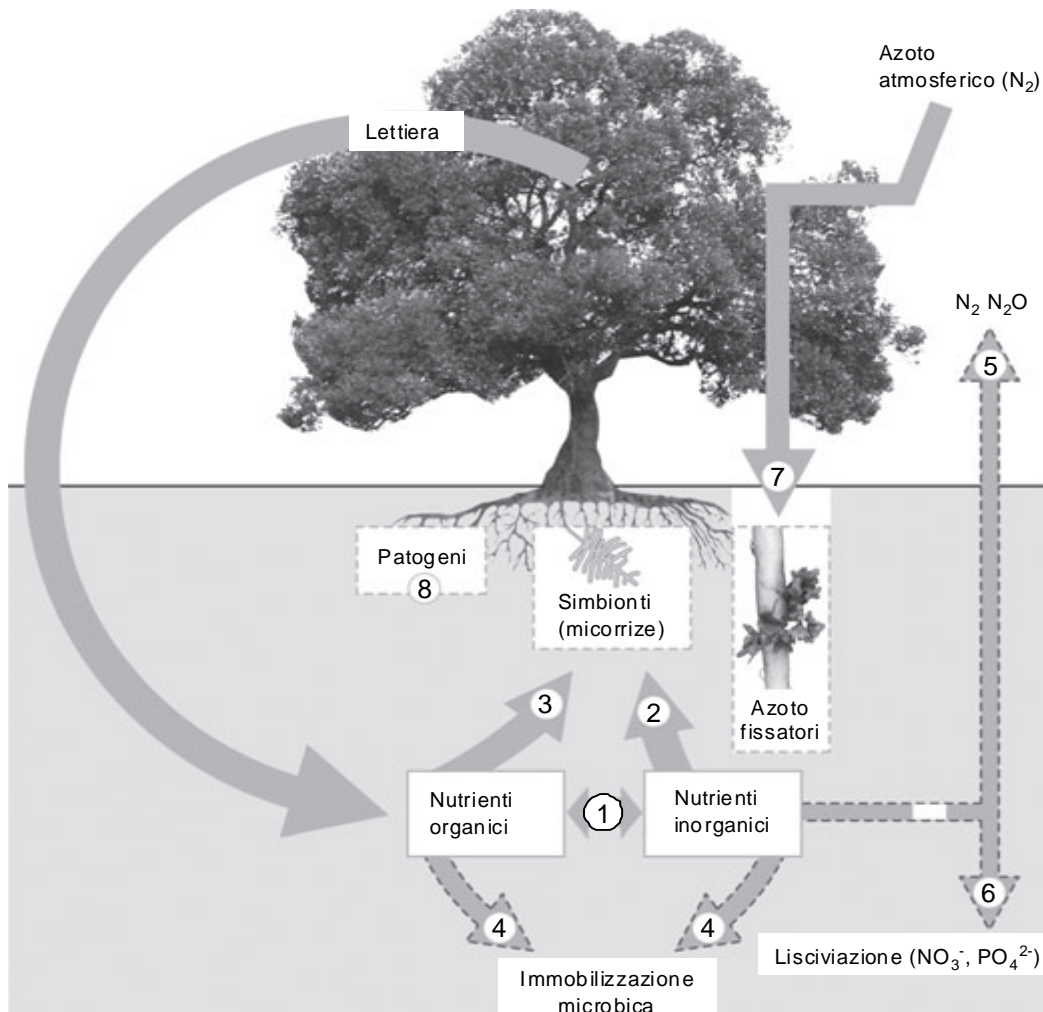


Figura 2 - Rappresentazione schematica dell'impatto dei microrganismi del suolo sull'assorbimento dei nutrienti da parte delle piante in ecosistemi naturali. La lettiera viene decomposta da un elevato numero di microrganismi (funghi e batteri) (1). I nutrienti che ne derivano possono essere assorbiti dalle piante attraverso le radici, grazie anche all'attività di microrganismi simbiotici quali i funghi micorrizici (2), oppure essere immobilizzati sotto forma di biomassa microbica o sostanza organica recalcitrante (4). I funghi micorrizici e i microorganismi hanno anche accesso alla frazione organica dei nutrienti, rendendola disponibile alle piante (3). I nutrienti possono essere persi dal suolo mediante denitrificazione dell'ammonio (con la produzione di azoto elementare od ossidi di azoto) ad opera di batteri denitrificanti (5) oppure mediante trasformazione ad opera di batteri nitrificanti a Archaea di ammonio in nitrati, favorendone la lisciviazione essendo il nitrato più solubile (6). I batteri fissatori dell'azoto (sia liberi che simbiotici) trasformano l'azoto gassoso in ammonio (7), rendendolo disponibile per le piante, aumentandone la produttività. Da non trascurare anche il ruolo di patogeni che possono attaccare ed infettare le piante, riducendone la produttività (8) (modificato da van der Heijden et al., 2008).

1.2 - Mantenimento della collezione di batteri del suolo

L'isolamento dei microrganismi del suolo avviene attraverso metodologie di laboratorio che differiscono in relazione alle caratteristiche dell'organismo cercato. Il primo passo è il prelievo del campione di suolo da cui si vuole isolare l'organismo. Solo a questo punto si procede con l'isolamento, il riconoscimento e la conservazione dei microrganismi.

1.2.1 - Il campionamento e la preparazione del campione di suolo

Il campione può essere prelevato con sgorbie, trivelle, pale o campionatori a martellamento con cilindro o pistone facendo attenzione a mantenere il più possibile il campione indisturbato. Per ciascun sito di prelievo viene generalmente compilata un'apposita scheda (scheda di campagna) necessaria per fornire al potenziale utente della collezione informazioni utili alla collocazione del microrganismo nell'ambiente di raccolta, al fine di consentire comparazioni o rappresentare strumento di riferimento. La registrazione dei dati generali, detti *metadati*,

costituisce l'elemento base per l'identificazione del campione e dovranno seguire un criterio concordato ed omologato con un protocollo dettagliato e specifico da raccogliere in una piccola guida. In questa parte dovranno essere annotate l'oggetto, il numero e il nome dei campioni, la data del rilievo, il nome del rilevatore e la località con le relative coordinate GPS.

Molto importante sarà anche l'accuratezza della descrizione del sito ove dovranno essere riportate alcune importanti caratteristiche del sito quali l'esposizione ai venti, la pendenza del suolo, la rocciosità e la quota sul livello del mare. Risulterà anche fondamentale per l'interpretazione dei dati raccolti la registrazione di alcuni elementi come la profondità del prelievo, la presenza di falda, l'umidità e la presenza di radici, nonché i principali dati climatici. Infine per meglio caratterizzare l'organismo studiato sarà necessario specificare l'uso del suolo come ad esempio la coltura in atto e la gestione colturale abituale, se forestale (specificare la specie o la consociazione), prato-pascolo, incolto o altro (fruizione turistica, riserva naturale, giardino pubblico, ecc), nonché la vicinanza a centri urbani, strade e autostrade, siti industriali, ferrovie, ecc. Ogni informazione utile a ricostruire l'evolversi dell'ecosistema deve essere annotata. Ad esempio sarebbe interessante conoscere, nel caso si osservasse un terreno incolto, se e da quanto tempo è incolto oppure se in precedenza hanno insistito coltivazioni, boschi, ecc., nonché il colore del suolo, la presenza di croste superficiali, affioramento di materiali particolari come metalli, plastiche, laterizi, residui organici di vario genere, ecc.. Al fine di costituire un campione medio rappresentativo, il campionamento viene effettuato in maniera randomizzata lungo un percorso a X o a W che non tenga conto delle zone anomale e dei bordi della parcella, prelevando almeno 5 sottocampioni (Allievi et al., 2003). Il campione di terreno viene, quindi, liberato dai residui colturali superficiali presenti. E' necessario utilizzare guanti monouso in modo da non provocare contaminazione con microrganismi estranei, e si utilizzano per la raccolta del suolo dei sacchetti di plastica sterili di almeno 2 litri di capacità qualora si vogliano riunire subito i sottocampioni. La profondità del prelievo è di norma compresa tra 0-30 cm, anche se condizioni particolari della parcella (ad es. aratura) o particolari tipi di terreno (ad es. suolo con copertura forestale) possono richiedere differenti profondità o la suddivisione di una profondità in diversi campioni in relazioni ai diversi strati; per informazioni più dettagliate su questo punto si rimanda al "Manuale di Metodi di Analisi Microbiologica del suolo" della SISS.

Il campionamento viene effettuato in modo diverso anche in funzione della presenza di vegetazione. Ad esempio il *bulk soil* (cioè il terreno non interessato dalle radici) si campiona a debita distanza dalla vegetazione. Per la *rizosfera* si preleva un *pane* di terra contenente la pianta con la massima parte dell'apparato radicale, nel caso di pianta erbacea; nel caso di piante arboree, invece, si effettuano prelievi di suolo ad una distanza dalla pianta ed ad una profondità che variano a seconda dello sviluppo radicale della specie studiata (Fig. 3).

Una volta prelevato, il campione si mantiene a 4°C attraverso un contenitore da trasporto refrigerato fino all'arrivo in laboratorio, preferibilmente entro la giornata stessa del prelievo.



Figura 3 - Campionamento effettuato nell'intorno dell'apparato radicale di piante di ciliegio.

Una volta in laboratorio, prima di procedere con l'estrazione e l'isolamento dei batteri coltivabili, si dispone il suolo parzialmente sminuzzato a seccare all'aria in vasche di materiale

inerte in luogo buio e areato per non più di 5-6 giorni (Fig. 4). I campioni sono poi setacciati in vagli di dimensione di 2-4 o più mm, a seconda delle esigenze.

Nel caso dell'isolamento dei batteri dalla rizosfera, si rimuove il pane di terra dalle radici e si preleva l'apparato radicale della pianta con il suolo adeso per uno spessore non superiore ai 2 mm; si recupera il suolo tramite sbattimento, in agitatore orbitale a 200 oscillazioni min^{-1} per 30 minuti, di 5 g di radici spezzettate in frammenti di 1 cm ca., + suolo, in presenza di 25 ml di tampone fosfato salino PBS pH 7,4; si eliminano le radici e si recupera il suolo rizosferico con una centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a RT (temperatura ambiente).



Figura 4 - I campioni di suolo posti ad essiccare in vasi di plastica al buio e in luogo areato.

1.2.2 Isolamento delle comunità dei batteri azotofissatori aerobi

Vengono utilizzati i seguenti metodi:

1. Metodo con piastramento diretto da suolo (indicato per *Azotobacter*):

- Una piccola aliquota di suolo (30-50 g), vagliato come precedentemente indicato, viene impastato con una quantità pari all' 1% di Na-piruvato e acqua sterile in un mortaio di porcellana;
- L'impasto viene trasferito in capsule Petri con una spatola sterile, avendo cura di "lisciare" convenientemente la superficie dell'impasto, che non deve toccare il coperchio della piastra al fine di evitare condizioni di anaerobiosi. Dopo incubazione a 30°C per 3-7 giorni si evidenziano le colonie di *Azotobacter*, di aspetto lucido e consistenza viscosa a causa della sintesi di esopolisaccaridi (Fig. 5).

Per gli isolamenti viene invece adottata la metodologia secondo Beijerinck per Azotobatteriacee (Beijerinck, 1901):

- 20 ml della soluzione nutriente vengono aliquotati in beute da 100 ml sterilizzate, inoculate con 0,3-0,5 g di terreno e incubati per 2-7 giorni a 30°C.
- Prelevato il film caratteristico della crescita di questi batteri e diluito in 10 ml di acqua sterile, 100 μl di questa diluizione vengono ulteriormente diluiti in eppendorf contenenti 1,9 ml di acqua sterile fino a raggiungere la quinta diluizione; 100 μl di ciascuna diluizione vengono strisciati su piastre da 10 cm di diametro contenenti il terreno di coltura e incubate a 30°C. Questo ulteriore passaggio in un mezzo solido privo di azoto si rende necessario per allontanare gli eventuali ceppi contaminanti la cui crescita in mezzo liquido, avvertibile dal forte odore di butirrato, può essere resa possibile dall'azoto fissato prodotto da *Azotobacter*.
- Allo sviluppo delle colonie, queste vengono strisciate su capsule Petri di 10 cm di diametro con terreno RM (Newton et al., 1953) e incubate per 24 h a 30°C. I substrati utilizzati sono quelli originali di Beijerinck 1901, riportati nei testi di microbiologia.

Figura 5 - A sinistra: colonie di *Azotobacter* dall'aspetto lucido e viscoso. A destra: ingrandimento 1000x di un campione prelevato da una colonia in cui si osservano cisti (cellule ovali, chiare) e cellule vegetative (bacilli, scuri).



2. Isolamento con piastramento su terreni solidi o semisolidi

- Gli isolamenti si ottengono a partire da 10 g di suolo vagliato, messo ad agitare in boccette di vetro sterili da 250 ml contenenti 90 ml di tampone fosfato pH 7,2 (0,8 g K_2HPO_4 + 0,2 g KH_2PO_4) per 30 minuti in shaker orizzontale oscillatorio a 120 rpm. Questa sospensione viene considerata una diluizione 10^{-1} . Vengono poi effettuate successive diluizioni seriali in tampone fosfato e 100 μ l delle diluizioni 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} vengono piastrati sui terreno solido o inoculati in 4,9 ml di terreno semisolido.
- I terreni solidi sono realizzati con l'aggiunta di 15 g/l di Agar mentre per i semisolidi vengono aggiunti 5 g/l di Agar. Fra i terreni più usati si ricordano:
 - Terreno di Rennie (Rennie, 1981) generale per Diazotrofi liberi aerobi;
 - Terreno Nfb (Krieg e Döbereiner, 1984) per *Azospirillum* spp.;

1.2.3 Isolamento delle comunità dei rizobi

I rizobi sono batteri capaci di instaurare una simbiosi mutualistica con le radici di piante leguminose in quanto i batteri si riforniscono dei carboidrati prodotti dalla pianta mediante fotosintesi, mentre le piante si riforniscono di azoto assimilabile (ammoniacale) prodotto dai batteri per riduzione dell'azoto atmosferico (azoto molecolare).

Questi batteri sono presenti in tutti i terreni e la loro capacità di adattamento a condizioni estreme (es. terreni salini, terreni semidesertici ecc.) rende gli studi su questa specie batterica molto interessanti. Particolare attenzione viene data alla selezione e all'impiego di ceppi dotati di maggiore efficienza azotofissatrice (Zhang et al., 2001; Zaccardelli et al., 2002).

L'isolamento dei rizobi avviene generalmente dai tubercoli radicali. In caso di isolamento diretto dal suolo, campioni rappresentativi di terreno vengono prelevati e posti in vasi all'interno dei quali vengono successivamente seminati semi di leguminose, opportunamente sterilizzati in superficie. Quando le piante hanno raggiunto un sufficiente sviluppo, si procede alla raccolta dei tubercoli.

In caso di isolamento dei rizobi da campioni di seme, questi ultimi vengono posti direttamente in vasi contenenti agriperlite sterile e, dalle piante che si sviluppano, vengono prelevati i tubercoli per l'isolamento.

Operativamente, l'isolamento dai tubercoli radicali avviene secondo quanto segue:

- ogni singolo tubercolo o gruppo di tubercoli viene sterilizzato in superficie con soluzione acquosa sterile contenente il 2 % circa di ipoclorito di sodio, per un tempo di 2 minuti;
- dopo lavaggio con acqua bidistillata sterile (SDDW) per 2-3 volte, il tubercolo viene schiacciato in tubi Eppendorf sterili in presenza di 200 μ l di SDDW;
- l'omogenato ottenuto viene strisciato, con un'ansa, in piastre di YEM-agar (composizione per litro: mannitolo 7,5 g; KH_2PO_4 0,5 g; $MgSO_4$ 0,2 g; NaCl 0,1 g; estratto di lievito 0,4 g; pH 7,2) e incubato a 28 °C per 4-6 giorni;
- da ognuna delle piastre di isolamento viene prelevata e purificata, per almeno due volte, una singola colonia.
- Avvenuto l'isolamento in purezza, si procede alla conservazione dei ceppi.

1.2.4 Isolamento di batteri elettrogenici

L'isolamento di batteri elettrogenici da suolo avviene secondo le modalità di piastramento su terreni solidi o liquidi descritti nel paragrafo precedente. Tuttavia la capacità di trasferire elettroni generando così elettricità viene valutata mediante l'uso della voltammetria ciclica e di test-tubes (Pham et al., 2008).

1.3 Riconoscimento di batteri coltivabili

1.3.1 Riconoscimento dei batteri azotofissatori

L'identificazione dei batteri azotofissatori aerobi isolati dal suolo viene eseguita mediante i seguenti metodi molecolari:

- il sequenziamento del gene per il 16S rDNA
- il sequenziamento di una porzione del gene nifH per la nitrogenasi reductasi, gene specifico dei batteri azotofissatori liberi.

A partire dal DNA genomico, estratto dalle cellule batteriche attraverso il metodo detto del CTAB, la porzione del 16S rDNA viene amplificata utilizzando primers specifici (P0 e P6) e, successivamente, sequenziata.

1.3.2 Riconoscimento dei rizobi

Il riconoscimento dei rizobi può essere eseguito adottando mezzi biologici, biochimici e/o molecolari.

L'identificazione con mezzi biologici consiste nell'eseguire test di nodulazione su una o più specie di leguminose al fine di individuare la specie ed, eventualmente, la sottospecie di appartenenza del rizobio isolato. Questi test di nodulazione vengono eseguiti ricorrendo all'allevamento di piantine in vasi contenenti agriperlite sterile; queste piantine vengono ottenute dalla germinazione di semi preventivamente sterilizzati con soluzione di ipoclorito di sodio al 2% e inoculati con il ceppo batterico da identificare. Dopo circa uno-due mesi di crescita, vengono eseguiti i rilievi sulle radici per verificare la presenza o meno di tubercoli (Fig.6).



Figura 6 – Noduli radicali prodotti da rizobio

Il test di nodulazione presenta lo svantaggio di richiedere molto tempo ma fornisce indicazioni in merito all'efficienza azotofissatrice dei ceppi.

L'identificazione con mezzi biochimici si basa sul profilo catabolico mostrato dal ceppo batterico da identificare, cioè dalla capacità o meno di utilizzare una serie di specifici composti organici. Un sistema biochimico di identificazione semplice da utilizzare e che dà risposta in un paio di giorni è il BIOLOG. Questo sistema utilizza delle piastre, molto simili a quelle impiegate nei test ELISA, nelle quali i 96 pozzetti contengono specifici substrati che, se catabolizzati dallo specifico ceppo da identificare, assumono una colorazione violacea.

1.3.3 Riconoscimento dei batteri elettrogenici

L'identificazione dei batteri elettrogenici isolati dal suolo viene eseguita mediante il sequenziamento del gene per il 16S rDNA.

A partire dal DNA genomico, estratto dalle cellule batteriche attraverso il metodo detto del CTAB, la porzione del 16S rDNA viene amplificata utilizzando primers specifici (P0 e P6) e, successivamente, sequenziata.

1.4 Mantenimento della collezione di batteri del suolo

Batteri azotofissatori liberi

I ceppi isolati sono mantenuti in collezione attraverso la preparazione di glicerolati conservati a -80°C. Per questo sistema di conservazione, 1 ml di coltura del ceppo, coltivato su un substrato liquido di tipo massimo (es: RM, Trypticase Soy Broth (MacFaddin, 1985); PY (Grove and Randall, 1955) viene aggiunto, in una provetta sterile per criogenia da 2 ml con tappo a vite, ad 1 ml di glicerolo 80% (w/v) in modo da ottenere una soluzione al 40% (w/v) finale in glicerolo. La provetta si agita energicamente per mescolare il glicerolo con la coltura e si conserva a -80°C.

Rizobi

La conservazione dei rizobi avviene secondo le modalità generalmente adottate per tutti i batteri coltivabili aerobi. Per periodi relativamente brevi (diversi mesi) i rizobi possono essere conservati in tubi di YEM-agar posti in frigorifero (4°C). Per garantire la conservazione degli isolati per lunghi periodi (diversi anni) si ricorre alla preparazione di liofilizzati oppure, più semplicemente, alla crioconservazione a -80°C. In questo caso le sospensioni batteriche vengono concentrate (almeno 10⁹ C.F.U/ml) in YEM-brodo addizionato con il 20% di glicerolo.

Vista l'elevata variabilità dei rizobi dal punto di vista genetico, della specificità dell'ospite e dell'efficienza azotofissatrice, è di estrema importanza conservare un numero molto elevato di ceppi affinché sia ben rappresentata la biodiversità di questi simbiotici. Pertanto, al fine di ridurre i tempi e i costi della conservazione, è anche possibile crioconservare a -80°C direttamente i tubercoli, senza ricorrere all'isolamento dei rizobi.

Batteri elettrogenici

I ceppi isolati sono mantenuti in collezione attraverso la preparazione di glicerolati conservati a -80°C, come visto in precedenza per gli azoto-fissatori liberi. Anche in questo caso per questo sistema di conservazione, 1 ml di coltura del ceppo viene coltivato su un substrato liquido di tipo massimo (variabile a seconda della specie) che viene aggiunto, in una provetta sterile per criogenia da 2 ml con tappo a vite, ad 1 ml di glicerolo 80% (w/v) in modo da ottenere una soluzione al 40% (w/v) finale in glicerolo. La provetta si agita energicamente per mescolare il glicerolo con la coltura e si conserva a -80°C.

1.5 Valorizzazione della collezione di microrganismi

1.5.1 Applicazione di batteri azoto-fissatori

Uno dei modi per valorizzare la collezione di microrganismi è sicuramente quello di mettere a disposizione i batteri conservati anche per scopi commerciali o, quantomeno, applicativi. Per esempio la disponibilità di rizobi selezionati e caratterizzati sia geneticamente (genoma completo) che fenotipicamente (fenoma completo) ci consente di stabilire a tavolino quelle che potrebbero essere le migliori condizioni di utilizzo di tali specie. Dalla teoria alla pratica il passo è stato breve: in collaborazione con la Continental Semences S.p.A. (<http://www.continentalsemences.com>) è in corso una sperimentazione mirata al trattamento di semi di erba medica per aumentarne la resa produttiva. L'inoculo dei semi viene effettuato mediante confettatura, un procedimento di copertura del seme che mantiene i rizobi sui semi in modo più efficace rispetto ai metodi tradizionali (Fig.7).



Figura 7 - Confettatura di semi di erba medica con *S. meliloti*.

I semi confettati sono stati utilizzati per una sperimentazione in campo per una valutazione di carattere agronomico precedente alla commercializzazione. I risultati di campo hanno confermato l'efficacia di alcuni ceppi di *S. meliloti* conservati in collezione (Fig. 8).



Figura 8 - Prova di campo con semi di medica confettati con *S. meliloti*.

1.5.2 Applicazione di batteri elettrogenici

Come accennato in precedenza, recentemente sono stati scoperti i cosiddetti microrganismi "elettrogenici", capaci cioè di produrre energia elettrica mediante il trasferimento diretto di elettroni da una matrice organica ad un qualsiasi accettore di elettroni. Questo fenomeno avviene grazie alla particolare capacità di alcuni batteri, prevalentemente anaerobici, che riescono a trasferire gli elettroni attraverso molecole shuttle o dei microscopici filamenti detti "nanowires" (Fig.9). Le capacità di questi batteri hanno recentemente consentito lo sviluppo e la messa a punto di vere e proprie batterie biologiche, dette Microbial Fuel Cells (MFCs). Questi batteri, che si pensava fossero assai rari, in realtà sono molto diffusi nell'ambiente e si trovano soprattutto in ambienti anaerobici o microaerofili, ma sono molto comuni anche nel suolo e in altre matrici aerobiche (Mocali et al., 2012).

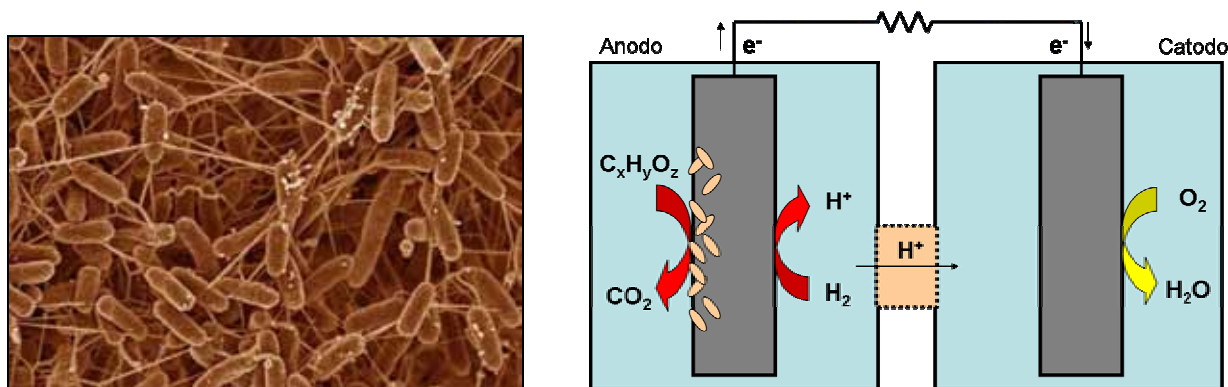


Figura 9 – A sinistra: batteri elettrogenici appartenenti alla specie *Shewanella oneidensis* (immagine di Rizlan Bencheikh e Bruce Arey) in grado di trasferirsi elettroni mediante dei microfilamenti detti “nanowires”. A destra: rappresentazione schematica di una Microbial Fuel Cell (MFC) in cui i batteri elettrogenici trasferiscono elettroni da una matrice organica presente nella cella anodica a quella catodica producendo elettricità.

L'utilizzo dei batteri elettrogenici per scopi applicativi si sta rapidamente diffondendo e i gruppi di ricerca pubblici e privati che investono nel settore crescono di anno in anno (www.microbialfuelcell.org).

Questa tecnologia è ancora all'inizio, in piena fase di sviluppo, ma non è difficile scorgerne le incredibili potenzialità. Non è un caso che molti paesi stanno investendo importanti risorse in questo settore e i progressi fatti in pochi anni hanno consentito di trasferire i sistemi MFC da semplice curiosità di laboratorio a veri e propri impianti pilota applicati su scala industriale: ad esempio in Australia il Queensland Government's Sustainable Energy Innovation Fund ha finanziato la costruzione del primo impianto-pilota MFC per il trattamento di acque reflue (www.uq.edu.au/news/index.html?article=11943). Inoltre la Lebonê Solutions, Inc. (www.lebone.org) a metà 2008 ha ricevuto un finanziamento di 200.000\$ dalla Banca Mondiale per realizzare un progetto in Tanzania al fine di portare la corrente elettrica in centri abitati non raggiunti dalla rete elettrica (oltre il 70% della popolazione in Africa ne è priva!), riuscendo ad illuminare un intero villaggio con rudimentali MFC utilizzando semplicemente biomasse vegetali di scarto come “combustibile” (Fig.10).



Figura 10 – Utilizzo della tecnologia MFC per accendere una lampadina utilizzando l'energia elettrica prodotta da batteri elettrogenici a partire da biomasse di scarto (www.lebone.org).

Pertanto, alla luce dei progressi effettuati negli ultimi anni dai ricercatori e alle nuove frontiere della biologia molecolare e della genomica, non è escluso che in pochi anni si possa produrre energia elettrica dai batteri in quantità significativa e vantaggiosa, utilizzando differenti biomasse di rifiuto come fonte nutritiva. In tal modo si potrebbe finalmente produrre energia pulita, a basso costo, rinnovabile a partire da qualsiasi biomassa di scarto.

1.6 Ringraziamenti

Si ringraziano la Dott.ssa Roberta Pastorelli, la Dott.ssa Silvia Landi, il Dott. Arturo Fabiani, e il Dott. Raimondo Piccolo per il prezioso supporto fornito per il mantenimento e la gestione della collezione di microrganismi del CRA-ABP.

1.7 Bibliografia

- Allievi I., Benedetti A., Pinzari F., 2003. Campionamento, preparazione e conservazione. In: Manuale dei metodi di Analisi Microbiologica del suolo, coord. Nannipieri P. e Picci G., Franco Angeli ed.
- Alexander M., 1977. Introduction to Soil Microbiology. Wiley, NY.
- Atlas R.M., Bartha R., 1998. Microbial ecology. Fundamentals and applications, 4th edn. Addison-Wesley, Reading.
- Beijerinck M. W., 1901. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, 3: 586–595.
- Bloem J., Schouten T., Didden W., Akkerius G.J., Keidel H., Rutgers M., Breure T., 2003. Measuring soil biodiversity: experiences, impediments and research needs. In: Agricultural Impacts on soil erosion and soil biodiversity: developing indicators for policy analysis. Proceedings from OECD Expert Meeting, Rome, Italy, March 2003. Ed. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio, p.109.
- Bloem J., Benedetti A., Hopkins D., Eds. 2006. Microbial methods assessing soil quality. CABI Publishing.
- Borneman J., Skroch P.W., O’Sullivan K.M., Palus J.A., Rumjanek N.G., Jansen J.L., Nienhuis J., Triplett. E.W., 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. App Environ Microbiol, 62:1935–1943.
- Doran J.W., Parkin T.B., 1994. Defining and assessing soil quality. In: Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F. & Stewart B.A. (eds) Defining soil quality for a Sustainable Environment, 35. American society of agronomy special publication, Madison, WI, pp. 3-21.
- Krieg, N. R., Dobreiner J., 1984. The genus *Azospirillum*, p. 94-104. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey’s manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Mocali S., Paffetti D., Emiliani G., Benedetti A. Fani R., 2008. Diversity of heterotrophic aerobic cultivable microbial communities of soils treated with fumigants and dynamics of metabolic, microbial, and mineralization quotients. Biol. Fertil. Soils, 44 (4):557-569.
- Mocali S., Benedetti A., 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. Res. Microbiol. 161(6):497-505.
- Mocali S., 2010. Bt plants and effects on soil microorganisms. CAB Reviews: perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 5: 36 1-19.
- Mocali S., Galeffi C., Perrin E., Florio A., Migliore M., Canganella F., Bianconi G., Di Mattia E., Dell’Abate M.T., Fani R., Benedetti A., 2012. Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer. Applied Microbiology and Biotechnology (in press), doi: 10.1007/s00253-012-3906-6.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G., 2003. Microbial diversity and soil functions. Eur J Soil Sci, 54: 655–670.
- Newton J.W., Wilson P.W., Burris R.H., 1953. Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by *Azotobacter*. Journal of Biological Chemistry, 204: 445-451.
- Pham T.H., Boon N., Aelterman P., Clauwaert P., De Schampelaire L., Vanhaecke L., De Maeyer K., Höfte M., Verstraete W., Rabaey K. 2008. Metabolites produced by

- Pseudomonas* sp. Enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 5: 1119-1129.
- Rennie R. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 8 – 14.
- Sleator R.D., Shortall C., Hill C., 2008. Metagenomics. *Lett Appl Microbiol* 47: 361-366.
- Torsvik V., Goksøyr J., Daae F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
- van der Heijden M.G., Bardgett R.D., van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11(3): 296-310.
- Wardle D.A., Giller K.E., 1996. The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. *Soil Biol Biochem*, 28: 1549–1554.
- Zaccardelli M., Del Galdo A., Parisi M., Giordano I., 2002. Caratterizzazione molecolare di isolati di *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* e loro impiego, in pieno campo, per il miglioramento produttivo del pisello proteico. *Agroindustria*, 1 (3): 153-158.
- Zhang X.X., Kosier B., Priefer B., 2001. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Molecular Ecology*, 10: 2297-2305.

COLLEZIONE DI MICRORGANISMI DI INTERESSE OLIVICOLA-OLEARIO*

Responsabile Scientifico: Dr. Barbara Lanza

CRA-OLI Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia
Viale Petrucci, 75 – 65013 Città Sant'Angelo (PE)

Riassunto

Il processo di trasformazione delle olive da tavola è la risultante di complesse reazioni biochimiche determinate dalla interazione della microflora indigena delle olive con le caratteristiche di composizione della salamoia di fermentazione. Uno degli aspetti più rilevanti del miglioramento della qualità delle olive da tavola riguarda l'impiego di microrganismi selezionati capaci di pilotare le fermentazioni, prendendo il sopravvento sulla microflora indigena ed, in particolare, su quella complementare responsabile di fenomeni alterativi delle conserve. In questo contesto, l'esistenza di una collezione di colture ben caratterizzate da un punto di vista tecnologico e isolate dalla matrice stessa da trasformare (oliva) può fornire la base per lo sviluppo di sistemi di colture starter che, pur pienamente compatibili con la tipicità dei prodotti, possano garantire il raggiungimento di standard qualitativi elevati e costanti. La collezione di microrganismi di interesse olivicola-oleario ha una consistenza di 68 ceppi (38 di *Lactobacillus plantarum*, 17 di *Lactobacillus pentosus* e 13 di *Leuconostoc mesenteroides*) selezionati da oltre 500 isolati. Di altri 100 ceppi, tra batteri e lieviti, sono in corso l'identificazione specilogica e la caratterizzazione metabolica. Tali microrganismi andranno ad arricchire la collezione e saranno oggetto di future sperimentazioni. Taluni ceppi hanno la capacità di idrolizzare, mediante azione enzimatica, l'oleuropeina, il glucoside che conferisce all'oliva il suo caratteristico sapore amaro. Ceppi oleuropeinolitici di *L. plantarum* potrebbero quindi essere impiegati, oltre che nel processo di deamarizzazione biologica delle olive, anche quali agenti defenolizzanti i reflui oleari destinati alla produzione di biogas.

Summary

The process of transformation of table olives is the result of complex biochemical reactions determined by the interaction of the indigenous microflora of the olives with the compositional characteristics of the brine. One of the most important aspects of improving the quality of table olives shall cover the use of selected microorganisms able to drive the fermentation, supplanting indigenous microflora and, in particular, of the complementary microflora responsible for spoilage of canned olives. In this context, the existence of a well-characterized collection of microorganisms from a technological point of view and isolated from the matrix to be processed (olive fruit) can provide the basis for the development of starter culture systems, while fully compatible with the typical products, can guarantee the achievement of high quality standards. The collection of microorganisms of interest in olive sector has a consistency of 68 strains (38 of *Lactobacillus plantarum*, 17 of *Lactobacillus pentosus* and 13 of *Leuconostoc mesenteroides*) selected from more than 500 isolates. Other 100 strains, including bacteria and yeasts, are in progress to identify and characterize. These microorganisms will enrich the collection and will be subject of future experiments. Some strains have the ability to hydrolyze by enzymatic action, oleuropein, a glycoside that gives the olive fruit its characteristic bitter taste. Oleuropeinolytic strains of *L. plantarum* could be used, as well as in biological debittering process of table olives, whether as dephenolyzing agents of OMW and pomace for the production of biogas.

Parole chiave

Olive da tavola, *Lactobacillus plantarum*, fermentazione lattica, oleuropeina

Keywords

Table olives, *Lactobacillus plantarum*, lactic fermentation, oleuropein

* doi:10.4458/0986-15

1 Ruolo di una collezione di interesse olivicolo-oleario

Uno degli aspetti più rilevanti del miglioramento della qualità delle olive da tavola riguarda l'impiego di microrganismi selezionati capaci di pilotare le fermentazioni, prendendo il sopravvento sulla microflora indigena ed, in particolare, su quella complementare responsabile di fenomeni alterativi delle conserve. L'Italia è ricca di produzioni alimentari tipiche, ottenute con metodologie tradizionali, molte delle quali hanno ottenuto od aspirano al riconoscimento di marchi DOP o IGP. Fra queste sono inclusi i prodotti fermentati, come le olive da tavola, nei quali il ruolo dei microrganismi è fondamentale per il raggiungimento delle caratteristiche organolettiche desiderate. La tecnologia tradizionale, così come riportata nei disciplinari approvati o proposti, non prevede esplicitamente l'uso di colture starter selezionate. La produzione è spesso frammentata in piccole e piccolissime aziende, che non sono in grado di affrontare programmi di ricerca e sviluppo, monitorare correttamente l'andamento delle fermentazioni o utilizzare correttamente coadiuvanti tecnologici. Le imprese alimentari impegnate nella produzione di olive da mensa fermentate hanno una consapevolezza parziale dell'importanza dell'uso delle colture starter per la loro trasformazione. In questo contesto, l'esistenza di una collezione di colture ben caratterizzate da un punto di vista tecnologico e isolate dalla matrice stessa da trasformare (oliva) può fornire la base per lo sviluppo di sistemi di colture starter che, pur pienamente compatibili con la tipicità dei prodotti, possano garantire il raggiungimento di standard qualitativi elevati e costanti. Il processo di trasformazione delle olive da tavola è la risultante di complesse reazioni biochimiche determinate dalla interazione della microflora indigena delle olive con le caratteristiche di composizione della salamoia di fermentazione. L'uso di colture starter in grado di controllare i processi biochimici occorrenti nella salamoia di fermentazione può servire ad inibire la crescita di microrganismi patogeni e di altri contaminanti associati alla materia prima o introdotti durante la preparazione delle conserve. La crescita di microrganismi indesiderati può rendere l'alimento pericoloso per la salute, alterarne le caratteristiche nutrizionali, o renderlo inaccettabile da un punto di vista sensoriale, producendo alterazioni dell'aspetto, dell'odore o del sapore. D'altro canto l'attività inibitoria della fermentazione lattica nei confronti di taluni batteri patogeni è nota, come è anche nota l'attività probiotica dei batteri lattici. L'impiego di questi batteri nella trasformazione delle olive da tavola costituisce non solo un ulteriore strumento per veicolare microrganismi probiotici negli alimenti, ma anche per pilotare la fermentazione al fine di evitare fenomeni devianti di tipo alterativo con il conseguente scadimento mercantile delle conserve (Lanza et al., 2009; Marsilio et al., 2005). Nell'ambito della filiera di produzione di olive da mensa fermentate, esistono sistemi di lavorazione che non comportano trattamenti di tipo chimico per cui il processo di deamarizzazione avviene naturalmente con la semplice immersione dei frutti in salamoia. Il processo si basa su delicati processi di fermentazione. I ceppi di batteri lattici predominanti nelle olive da tavola appartengono alla specie *Lactobacillus plantarum*. Taluni ceppi hanno la capacità di idrolizzare, mediante azione enzimatica, l'oleuropeina, il glucoside che conferisce all'oliva il suo caratteristico sapore amaro. Recenti ricerche hanno portato all'isolamento di ceppi oleuropeinolitici di *L. plantarum* (Ciafardini et al., 1994) la cui attività metabolica si estrinseca attraverso due steps: (i) scissione del legame β -glucosidico dell'oleuropeina e formazione dell'aglicone dell'oleuropeina; (ii) scissione del legame estere dell'aglicone e formazione di idrossitirosolo ed acido elenolico, entrambi derivati non amari.

1.1 Un po' di storia

A partire dal 1992 la Sezione Olive da Mensa dell'ex-Istituto Sperimentale per la Elaiotecnica ha iniziato ad isolare e conservare ceppi di microrganismi provenienti da salamoie di fermentazione e di condizionamento di olive da tavola, carposfera e filloplano di *Olea europaea* L. con lo scopo di poterli utilizzare per la deamarizzazione biologica delle olive.

Negli anni 1997-1999 sono stati isolati, grazie ai fondi MIPAF del Piano Nazionale "Biotecnologie vegetali - Area 6 Microrganismi utili" - Progetto "Utilizzo di batteri lattici per la deamarizzazione delle olive da mensa", alcuni ceppi di *Lactobacillus plantarum* capaci di idrolizzare il glucoside oleuropeina, responsabile del sapore amaro del frutto oliva non trasformato.

Negli anni 2000-2005 la collezione è stata ampliata ed organizzata grazie ai fondi MIPAF del Progetto "Collezione nazionale di microrganismi di interesse agrario ed agro-industriale" -

Sottoprogetto "Collezione nazionale di microrganismi di interesse industriale nel settore delle olive da mensa".

Nel 2007 i ceppi sono stati inseriti nel database creato nell'ambito del Progetto Col.Mi.A. "Collezione di microrganismi di interesse agrario e agroindustriale" – Sottoprogetto "Collezione di microrganismi di interesse industriale nella preparazione delle olive da mensa". La Collezione COLMIA contiene informazioni sull'identificazione dei microrganismi, sulle caratteristiche biologiche, colturali e genetiche, sulle caratteristiche tecnologiche, sulle diverse modalità di conservazione e sulla eventuale disponibilità ad essere inviati a istituzioni diverse. L'elenco dei microrganismi inseriti nella banca dati, è consultabile via internet sul sito: <http://www.colmia.it>. La Collezione COLMIA è stata recentemente inserita nel World Data Center for Microorganism (WDCM 945). La collezione di microrganismi di interesse olivicolo-oleario ha una consistenza di 68 ceppi (38 di *Lactobacillus plantarum*, 17 di *Lactobacillus pentosus* e 13 di *Leuconostoc mesenteroides*) selezionati da oltre 500 isolati.

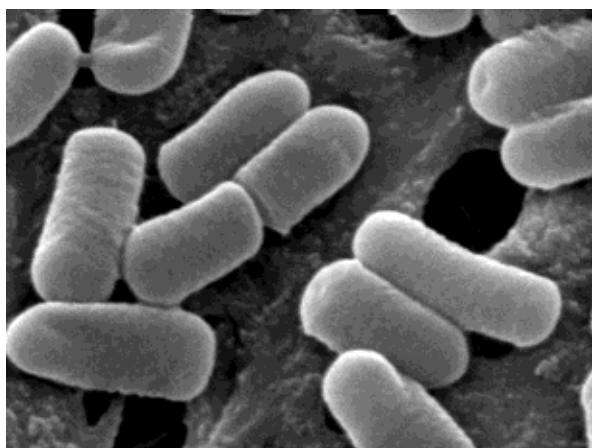
Il mantenimento di una collezione di microrganismi è particolarmente oneroso perché richiede l'attività continua di personale qualificato e ripetuti controlli sulla vitalità ed identità dei ceppi. Attualmente il suo mantenimento è assicurato grazie ai fondi del Progetto BIODATI.

1.2 Identificazione biochimico-molecolare e tipizzazione degli isolati

Come riportato nel Manuale d'uso COLMIA (AA.VV., 2011), i ceppi microbici isolati da habitat naturali, o da prodotti alimentari tipici, a causa delle pressioni selettive ambientali e tecnologiche cui sono sottoposti, mostrano marcate differenze fenotipiche rispetto ai *type strains* delle specie, oppure spiccata variabilità intra-specifica. Ciò significa che è possibile ritrovare, con elevata frequenza, diversi biotipi o biovarianti adattati a particolari nicchie ecologiche, che hanno subito un'evoluzione tale da determinare piccoli o grandi cambiamenti sia nel fenotipo, sia nel genotipo. Pertanto, il ricorso a un singolo criterio identificativo non è sempre sufficiente a catalogare in modo corretto e univoco un microrganismo. Al fine di ottenere una risposta più sicura, attualmente si applicano procedimenti polifasici, comprendenti cioè una o più tecniche appartenenti alle diverse categorie identificative secondo protocolli dettati più dall'esperienza personale o dalla dotazione del singolo laboratorio, che dall'esistenza di schemi univoci di riferimento. Per i microrganismi di origine olearia si applicano, fra gli altri, i seguenti metodi di identificazione fenotipica o chemotassonomica e molecolare:

- profilo fermentativo degli zuccheri mediante gallerie API CH (API System, bioMerieux Italia) (Foto 1);
- profilo delle attività enzimatiche mediante gallerie API ZYM (API System, bioMerieux Italia);
- PCR specie-specifica;

Foto 1 *L. plantarum* B1 presente in Collezione con il codice COLMIA CRA-OLIO110 e relativo profilo fermentativo degli zuccheri mediante gallerie API CH.



Molteplici sono i sistemi di tipizzazione intra-specifica. Fra quelli fenotipici, nel caso dei batteri lattici isolati da salamoie di fermentazione, è stata utilizzata la fagotipia (Lanza *et al.*, 2011),

mentre tra quelli molecolari, il fingerprinting del DNA batterico mediante RAPD-PCR e primer M13. La tecnica RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) prevede l'amplificazione aspecifica di frammenti di DNA mediante l'uso di primers a sequenza arbitraria ad alto contenuto in GC, aventi una lunghezza massima di 10-25 bp, impiegando temperature di appaiamento piuttosto basse (30-35 °C) ed alte concentrazioni di polimerasi. Il numero di frammenti ottenuto e le loro dimensioni vengono valutate tramite elettroforesi orizzontale su gel di agarosio e rappresentano un profilo elettroforetico caratteristico del microrganismo in esame (fingerprint). Il primer utilizzato è il frammento M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3').

1.3 Caratterizzazione tecnologica degli isolati

I saggi da applicare per la caratterizzazione tecnologica dei ceppi sono virtualmente moltissimi e, in genere, riguardano proprietà relative alla possibile applicazione tecnologica dei microrganismi (caratteri pro-tecnologici). Essi, evidentemente, differiscono a seconda della tipologia di coltura (coltura starter; coltura funzionale; coltura protettiva) e all'impiego finale del microrganismo. I principali test applicati a ceppi di origine olearia sono i seguenti:

- attività acidificante mediante registrazione della curva di pH e produzione di acido lattico;
- tolleranza a concentrazioni elevate di NaCl, al fine di selezionare ceppi con maggiori possibilità di sopravvivenza in salamoia;
- temperature ottimali di crescita;
- attività enzimatiche specifiche (attività β -glucosidasi; attività esterasica);
- tolleranza ai fenoli più comuni presenti nelle olive (oleuropeina, verbascoside, aglicone dell'oleuropeina, idrossitirosolo, etc...);
- attività oleuropeinolitica, mediante semina di MRS broth arricchito di oleuropeina e dosaggio mediante analisi GC o HPLC dei prodotti di degradazione;
- resistenza fagica
- produzione di batteriocine attive nei confronti di germi patogeni;
- resistenza alla liofilizzazione;
- tolleranza a conservanti (acido benzoico e acido sorbico e rispettivi sali di Na e K) e antiossidanti (acido L-ascorbico) previsti dalla norma commerciale elaborata dal Consiglio Oleicolo Internazionale con sede a Madrid (IOOC 2004 - *Trade Standard Applying to Table Olives*, COI/OT/NC no. 1 December 2004).

Ed in particolare, per saggiare anche l'attività probiotica, vengono effettuati i seguenti tests:

- tolleranza ai sali di bile (0.3-10.0%);
- tolleranza a pH fortemente acidi (pH 2.0-2.5);
- adesione alle cellule epiteliali intestinali;
- tolleranza ad antibiotici;
- inibizione di germi patogeni come *Helicobacter pilori*, responsabile di diverse patologie gastriche.

La tolleranza al sale è una delle più importanti caratteristiche tecnologiche che un ceppo deve possedere per poter essere utilizzato nella trasformazione delle olive da tavola. Solitamente vengono utilizzate salamoie con concentrazioni di NaCl non inferiori al 6%, ma in alcuni casi si arriva ad utilizzare anche alte concentrazioni saline (8-10%). Quindi selezionare microrganismi in grado di tollerare anche alte concentrazioni saline è estremamente importante. I LAB tollerano molto bene le basse concentrazioni di sale (0-4%), risultandone in alcuni casi anche favoriti nello sviluppo. E' stato inoltre osservato che ceppi di *L. plantarum* isolati da salamoie di olive al naturale sono in grado di crescere anche in presenza di elevate concentrazioni di NaCl (10%).

La prova di crescita a diverse temperature (4°C, 15°C, 30°C e 45°C) è particolarmente utile per saggiare la tolleranza e la capacità di crescita/fermentazione dei batteri lattici alle diverse temperature che si possono raggiungere durante il processo. La temperatura ottimale di crescita dei LAB è di $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Anche una fermentazione efficace richiede temperature relativamente alte ($> 18^\circ\text{C}$) che possono essere mantenute costanti nei grandi fermentatori termostatici. Comunque, la maggior parte delle industrie di trasformazione non possiede fermentatori ma fa avvenire la fermentazione in contenitori in plastica esposti all'aria aperta

(Foto 2) e di conseguenza la temperatura varia con il variare delle condizioni climatiche; è da sottolineare che in inverno, quando le basse temperature, rallentano l'attività microbica, sarebbe opportuno selezionare colture starter in grado di crescere anche a basse temperature.

Foto 2 Contenitori in plastica da 140kg di olive esposti all'aria aperta.



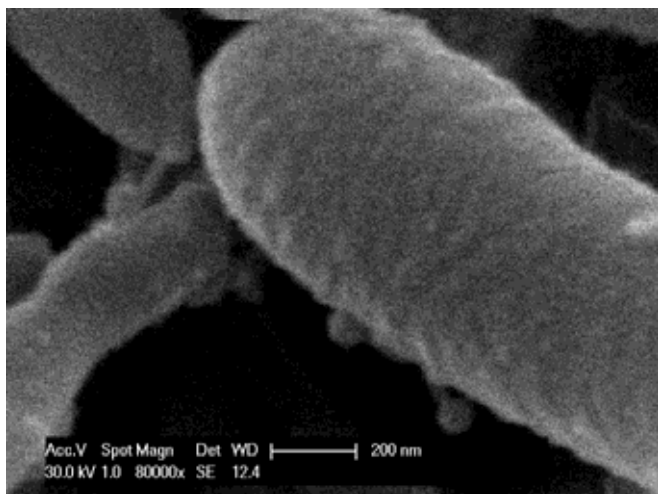
La prova di crescita a diversi pH (pH 2, pH 4, pH 6, pH 8 e pH 10) è invece particolarmente utile per saggiare la tolleranza e la capacità di crescita/fermentazione dei ceppi in ambienti fortemente acidi, neutri fino a fortemente basici, in modo da rispondere in maniera ottimale alle diverse matrici di partenza. Ad esempio le olive trattate con il metodo Sivigliano, dopo la fase dei lavaggi, possiedono un pH alcalino compreso tra 8.0 e 9.0, mentre le olive appena raccolte ed immerse in salamoia (metodo Greco) possiedono un pH intorno a 4.0-5.0. Al fine di accelerare il processo fermentativo, sarebbe utile quindi selezionare ed impiegare colture starter di batteri lattici con proprietà di sviluppo e/o fermentative a pH diversi. La capacità di crescita a pH fortemente acidi (2.0-2.5) è invece importante se si vuole saggiare l'attività probiotica di un ceppo in quanto viene valutata l'eventuale resistenza al passaggio attraverso lo stomaco, simulando l'aggressione da parte dei succhi gastrici.

Per ultima, ma non in ordine di importanza, si valuta l'attività oleuropenolitica biologica, che si esplica attraverso l'azione di due enzimi chiave: la β -glucosidasi e l'esterasi. La produzione di β -glucosidasi da parte dei ceppi selezionati mediante saggi in micropiastre viene effettuata attraverso l'inoculo del ceppo da saggiare in M.R.S. broth senza glucosio addizionato di un substrato cromogeno (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside) il cui aglicone è una sostanza colorata (i pozzetti contenenti ceppi β -glucosidasi positivi si colorano in blu e si valuta l'assorbanza a 627 nm). L'attività oleuropeinolitica reale viene valutata attraverso l'inoculo dei ceppi da saggiare in M.R.S. broth senza glucosio addizionato di oleuropeina all'1% (w/v) e andando a ricercare i prodotti di degradazione (idrossitirosolo e agliconi) via GC o HPLC.

1.4 Batteriofagi e colture starter

La presenza di batteriofagi nelle salamoie di fermentazione delle olive da tavola potrebbe essere una delle cause di fallimento del processo di acidificazione svolto dai batteri lattici (Foto 3) con ripercussioni più o meno gravi sullo svolgimento del processo tecnologico o sulle caratteristiche del prodotto finale (inibizione delle colture starter, fermentazioni anomale). L'infezione fagica nell'industria di trasformazione delle olive da tavola potrebbe rappresentare il vero ostacolo all'impiego di colture starter quali inoculo. Quindi, l'impiego di uno starter specifico di *Lactobacillus plantarum* quale agente di deamarizzazione e fermentazione delle olive resistente all'attacco fagico risulta di estremo interesse (Lanza *et al.*, 2011). I batteriofagi rappresentano anche un utile strumento per tipizzare i ceppi di batteri lattici presenti in Collezione. Si è pensato quindi di allestire una "Collezione di fagi" quale naturale completamento di una collezione di batteri lattici di interesse olivicolo-oleario.

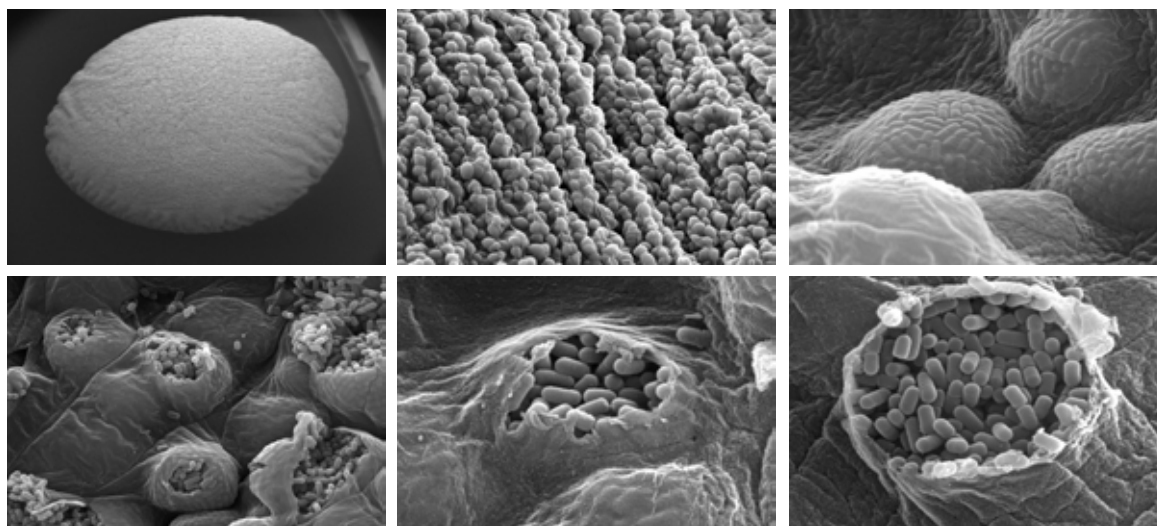
Foto 3 Particelle fagiche adese alla superficie di *L. plantarum* (da: Lanza *et al.*, 2011).



1.5 I batteri lattici probiotici

Il termine microrganismo probiotico è riferito ai microrganismi vivi e/o loro componenti o prodotti metabolici che, se assunti in quantità adeguate, proteggono oppure favoriscono le difese dell'ospite sia direttamente sia in modo indiretto stimolandone i meccanismi di difesa. Lo scopo principale è stabilizzare i LAB e formulare nuovi tipi di alimenti, fortificati con batteri probiotici microincapsulati che vengono rilasciati solo dopo aver raggiunto l'intestino umano. Attualmente, per i latte-fermentati quali ad es. yogurt e kefir, è stato sviluppato un metodo di stabilizzazione/incapsulamento basato sui carboidrati, allo scopo di aumentarne la vitalità: allo scopo vengono impiegati come carrier grandi granuli di amido di patata che vengono trattati enzimaticamente per ottenere una struttura porosa su cui verranno adesi i batteri. Per quanto riguarda i batteri lattici presenti nella nostra collezione, oltre a saggiare l'eventuale attività probiotica, come ricordato precedentemente, sono state effettuate anche prove di immobilizzazione in capsule di alginato (Foto 4) (Marsilio *et al.*, 1998).

Foto 4 *L. plantarum* B1 immobilizzato in alginato.

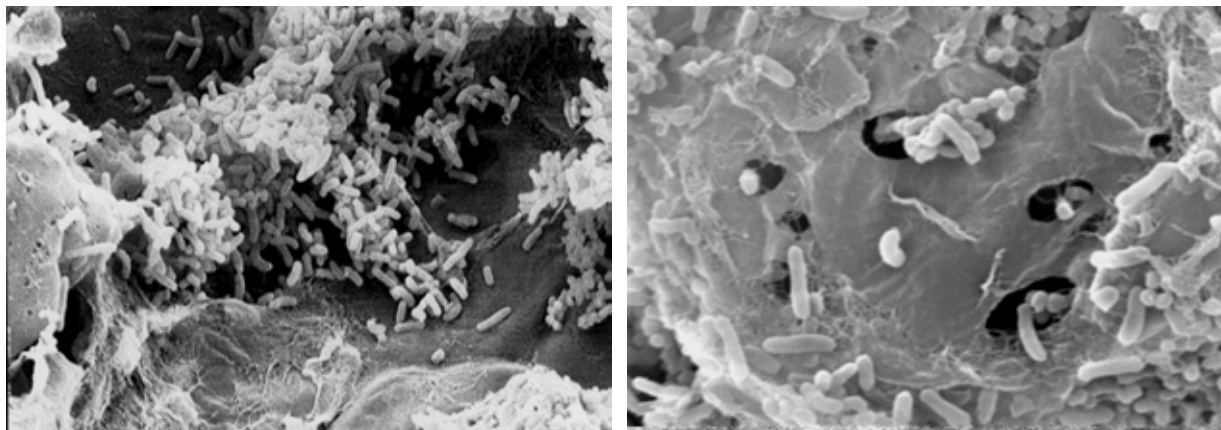


1.6 L'oliva come alimento funzionale e probiotico

Per alimenti probiotici si intendono quegli alimenti, generalmente fermentati, che contengono un numero sufficientemente elevato di microrganismi vivi ed attivi, in grado di raggiungere l'intestino ed esercitare un'azione di equilibrio sulla microflora intestinale mediante colonizzazione diretta ed in quantità tali da migliorare la salute del consumatore. Quindi l'oliva,

fermentata con ceppi probiotici, preferibilmente isolati dal microbiota che colonizza la superficie e l'interno dell'oliva stessa, diventerà un vero e proprio alimento funzionale. Presso i nostri laboratori, è stata indagata, sempre mediante microscopia elettronica a scansione, la presenza di cellule vive all'interno del mesocarpo di oliva (Foto 5).

Foto 5 Colonizzazione di un'oliva da parte di *L. plantarum* B1.



1.7 Ringraziamenti

Si ringraziano i dottori Marfisi, Iannucci e Di Serio e il per. chim. Russi per l'aiuto nell'esecuzione delle prove di caratterizzazione tecnologica e molecolare.

1.8 Bibliografia

- Ciafardini G., Marsilio V., Lanza B., Pozzi N., 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied & Environmental Microbiology*, 60: 4142-4147.
- Lanza B., Rossetti L., Zago M., Carminati D., Russi F., Iannucci E., Di Serio M.G., Muzzalupo I., Giraffa G., 2009. Selezione di ceppi di *Lactobacillus plantarum* per la formulazione di starter nella produzione di olive da mensa fermentate. *Incontro Ricercatori e Tecnologi del CRA sul "Miglioramento genetico di specie animali e vegetali"*, Roma, Italy.
- Lanza B., Zago M., Carminati D., Rossetti L., Meucci A., Marfisi P., Russi F., Iannucci E., Di Serio M.G., Giraffa G., 2012. Isolation and preliminary characterization of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages from table olive fermentation. *Annals of Microbiology*, 62: 1467-1472.
- Manuale d'uso "Collezione di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale" Petria, 21(1): 1-164, ISSN 1120-7698. AA.VV., 2011.
- Marsilio V., Seghetti L., Iannucci E., Russi F., Lanza B., Felicioni M., 2005. Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L., cv. Ascolana tenera) processing. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 85: 1084-1090.
- Marsilio V., Lanza B., Lombardi D.S., 1998. Electron microscopic examination of Ca-alginate immobilized *Lactobacillus plantarum*. 14th International Congress on Electron Microscopy, Cancun, Mexico.

FUNGHI TELLURICI FILAMENTOSI DI INTERESSE AGRARIO E AMBIENTALE*

Responsabile Scientifico: Dr.ssa Luisa M. Manici; Responsabile tecnico: Dr. Francesco Caputo;
Responsabile database e web: Claudia Maestrini

CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali
Via di Corticella, 133 – 40128 Bologna

Riassunto

Il gruppo Agronomy del CRA-CIN di Bologna svolge ricerche su sistemi agricoli intensivi in gestione convenzionale e biologica. La parte di attività del gruppo con specifiche competenze in microbiologia del suolo riguarda principalmente la repressività del suolo e gli indicatori microbici, funghi filamentosi in particolare, in funzione di studi agronomici e ambientali.

La collezione (disponibile al link http://www.isci.it/isciTC/Micoteca_web/index.html) comprende più di 700 isolati di funghi endofiti delle piante (colture erbacee, orticole e alberi da frutto) e del suolo, raccolti a partire dal 1991. Ogni isolato è mantenuto come coltura pura ed è stato identificato con tassonomia convenzionale, integrata con identificazione molecolare. La maggior parte degli isolati sono stati caratterizzati per aspetti funzionali quali: patogenicità verso la pianta ospite, attività enzimatica, attività antagonista, antibiosi verso altri microrganismi e promozione di crescita delle piante. La collezione CRA-CIN gruppo Agronomy comprende diverse popolazioni di interesse per l'impatto sulla produzione agricola (*Rhizoctonia* sp. binucleate, *Rhizoctonia solani* AG-3; *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* spp. *Ilyonectria* spp.), le quali sono state, o sono tuttora, oggetto di studi filogenetici. Circa 220 ceppi della collezione sono inseriti nel database GenBank come sequenza nucleotidica. Tutti gli isolati vengono conservati in azoto liquido, e circa 400 sono conservati come "cultura attiva". Circa 200 isolati di questa collezione sono inseriti nel database COLMIA <http://www.colmia.it/>, una rete di collezioni finanziata dal MiPAAF, coordinata dal CRA Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma.

Summary

CRA-CIN Agronomy group in Bologna focuses its research activity on intensive cropping systems under conventional and organic management. The activity of microbiology section concerns soil suppressiveness and soil microbial indicators, filamentous fungi in particular, applied to agronomic and environmental studies. The fungal culture collection of CRA-CIN Agronomy (List available on http://www.isci.it/isciTC/Micoteca_web/index.html) includes more than 700 isolates of root endophytes and soil borne fungi collected since 1992 from soil, herbaceous, horticultural and fruit tree crops in several Italian growing areas. Each isolate has been identified using conventional taxonomy, integrated with molecular identification. Most of the isolates have been characterized for functional features: pathogenicity toward plant host, enzymatic activity, antagonistic activity, antibiosis toward other microorganisms and plant growth promotion. The CRA-CIN Agronomy collection includes several populations of interest for their impact on crop production (binucleate *Rhizoctonia* sp. *Rhizoctonia solani* AG-3; *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* spp, *Ilyonectria* spp) which have been subjected to phylogenetic studies and are partially shared with researchers of foreign institutions. Several isolates of this collection are inserted in GenBank database as nucleotide sequence. All isolates of the collection are stored under liquid nitrogen, and around 400 are stored as "living culture". About 200 isolates of our collection are inserted in the COLMIA <http://www.colmia.it/> database, a network of culture collections funded by MiPAAF, under the coordination of CRA-Research Institute for Plant Pathology in Rome.

Parole chiave

Funghi filamentosi, bio-indicatori, repressività, biodiversità, suolo, patogeni tellurici, sanità delle colture, sequenze nucleotidiche, studi di popolazione, diversità microbica

Keywords

Filamentous fungi, bio-indicators; soil suppressiveness, soil borne pathogens, beneficial organisms, nucleotide sequence, phylogenetic studies, microbial biodiversity

* doi:10.4458/0986-16

1 Collezione di funghi tellurici e ricerca in agronomia e sistemi colturali

La collezione di funghi filamentosi del gruppo CRA-CIN Agronomy comprende 720 isolati da suolo e da 21 diverse colture: erbacee estensive (cereali, lino, patata, girasole pomodoro), ortive (insalate, fragola, fagiolo) e arboree, melo e pesco soprattutto. In pratica, la collezione comprende due grossi gruppi: a) funghi endofiti delle radici isolati prevalentemente dai tessuti radicali e dal colletto delle piante; b) funghi filamentosi tellurici a sopravvivenza saprofitaria.

La collezione comprende più di 100 specie e gli isolati provengono da diverse aree italiane di coltivazione intensiva e di produzione tipica.

La collezione di funghi filamentosi ad habitus endofita del gruppo CRA-CIN Agronomy derivano da attività svolte nell'ambito di ricerche sul rapporto pianta-microorganismi del suolo, le quali hanno sempre avuto come obiettivo la problematica del declino produttivo delle colture intensive nei suoi vari aspetti. Infatti, il fatto che la componente biotica del suolo abbia un grande impatto su sanità, produttività e qualità delle colture non è solo dovuto all'effetto dei patogeni radicali ma anche al venir meno dell'effetto positivo di una serie di interazioni fra pianta e funghi endofiti quali: stimolazione di crescita, protezione, induzione di resistenza endogena ecc e fra gli endofiti stessi.

Oltre agli studi sul rapporto pianta-funghi del suolo, l'altro importante filone di ricerca che ha contribuito all'accrescimento della collezione, è quello dei funghi del suolo come indicatori biologici quantitativi e qualitativi. I funghi del suolo, oltre alle loro note caratteristiche funzionali, rappresentano la parte predominante della massa microbica e hanno una efficienza di metabolismo delle fonti di carbonio largamente superiore a quella dei batteri (Bailey *et al.*, 2002). Nonostante sia stato evidenziato che i funghi del suolo sono indicatori sensibili dell'impatto delle lavorazioni o di altri eventi di "disturbance" (quali, per esempio, inquinamento e asfissia) del suolo, i funghi come indicatori sono meno utilizzati dei batteri per i seguenti motivi:

- difficoltà metodologiche del loro isolamento da suolo;
- bassa concentrazione del DNA fungino che aumenta la difficoltà di applicazione dei metodi molecolari;
- minor numero di isolati fungini inseriti nelle "public DNA data base" rispetto al numero di batteri;
- poco accurata e spesso non corretta identificazione tassonomica dei funghi inseriti nelle 'public DNA data base' è (Vigalys *et al.*, 2003).

Gli studi del gruppo CRA-CIN Agronomy che hanno utilizzato i funghi come indicatori quantitativi (Manici *et al.*, 2004, 2007) e di biodiversità (Manici *et al.*, 2010) dei suoli agrari hanno portato ad un arricchimento costante della collezione che ha uno scopo essenzialmente funzionale alla ricerca. Nell'ambito di questa seconda linea di ricerca, la collezione raccoglie isolati di interesse funzionale (antagonisti, specie biologicamente attive, iperparassiti ecc) di comunità fungine di suoli caratterizzati per produttività, sanità o perché inseriti in ecosistemi agrari particolari come denominazione di origine controllata o altro.

Alla conclusione delle ricerche svolte, la collezione mantiene solo gli isolati relativi agli studi effettuati, ma include e mantiene comunque gli isolati di riferimento per la tassonomia o quelli caratterizzati per specifica funzionalità che può essere patogenicità (da utilizzare nel miglioramento genetico delle specie verso i patogeni, nelle varie ricerche *in vitro* e *in vivo* sulla protezione delle piante, ecc), attività cellulolitica, stimolazione radicale e altro.

1.1 Funghi filamentosi endofiti in collezione da ricerche sulla sanità delle colture

La collezione CRA-CIN Agronomy include un ampio numero di funghi filamentosi endofiti delle radici e delle piante in generale.

I funghi endofiti possono avere un rapporto con la pianta che varia da mutualistico (positivo come stimolazione di crescita, protezione della pianta), commensale, o asintomatico, fino a patogeno (da deboli patogeni a letali) (Herre *et al.*, 2007). La patogenicità degli agenti di questi funghi endofiti o patogeni secondari è molto variabile perché, oltre ad avere una bassa specificità per l'ospite, la loro aggressività è mediata dallo stato fisiologico delle piante (Redman *et al.*, 2001). Per il loro carattere saprofitario, inoltre, questi funghi sono molto sensibili all'effetto competizione degli altri microorganismi, un meccanismo che in generale regola lo stato di equilibrio delle comunità microbiche del suolo. Pertanto gli studi sui funghi endofiti patogeni agenti di necrosi radicale o su quelli ad azione antagonistica o stimolante

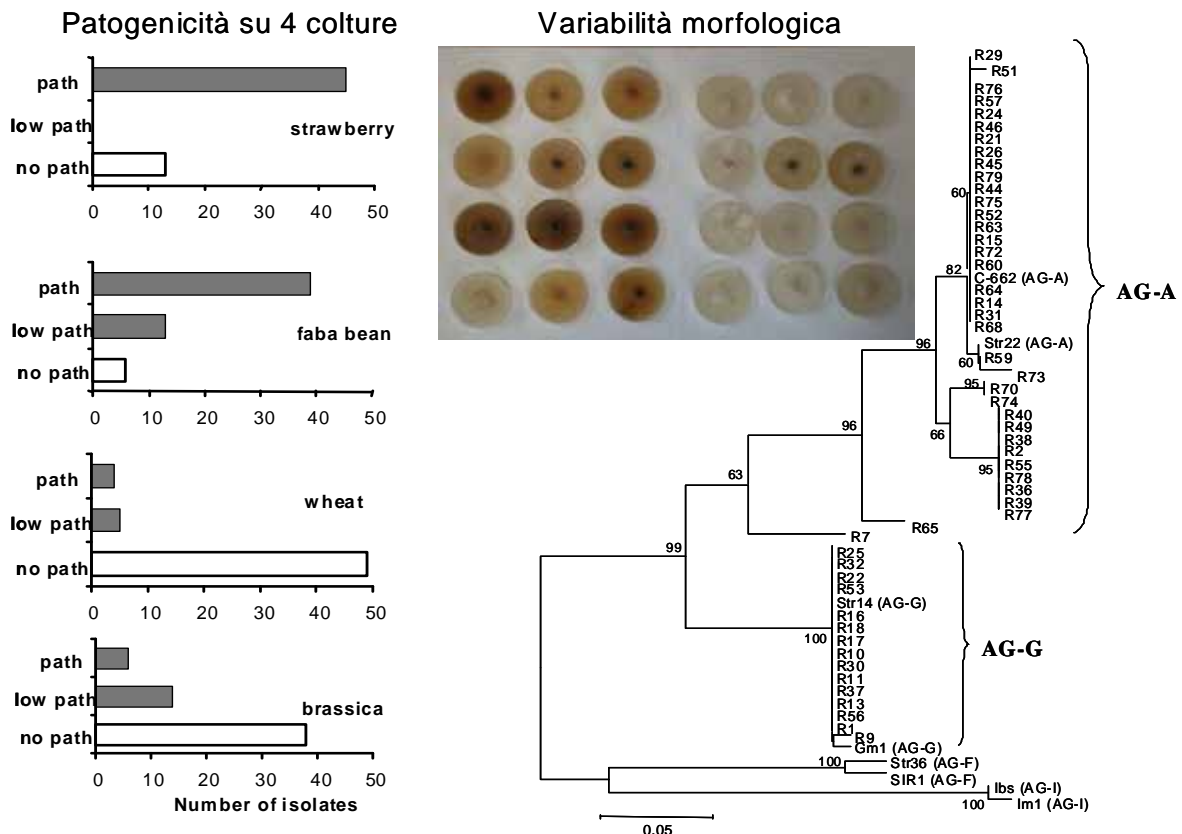
delle radici o con qualsiasi altro ruolo nell'ambito della "soil suppressiveness" richiedono la raccolta e l'analisi di più isolati per specie per essere studiati in modo adeguato. Inoltre il cosiddetto "complesso di necrosi radicale" responsabile di declino produttivo delle colture, è composto da più specie di patogeni fungini che variano anche nell'ambito della stessa coltura in funzione delle caratteristiche ambientali e delle tecniche colturali. Questo è il motivo per cui nella collezione CRA-CIN Agronomy vi sono più isolati della stessa specie (popolazioni) di endofiti patogeni delle radici fra cui alcuni esempi:

Rhizoctonia sp binucleata (*Ceratobasidium*) (Manici *et al.*, 2007; Kelderer *et al.*, 2012), *Pythium* spp (*Pythium dehlense* e *P. ultimum*) (Manici *et al.*, 2004), *Fusarium oxysporum* e *solani* (Manici *et al.* 1992; Manici *et al.*; 1994; Manici *et al.* 1999), *Macrophomina phaseolina* (Manici *et al.*, 1995, Manici *et al.*, 2009), *Cylindrocarpon* sp. e *Thielaviopsis basicola* (Manici e Caputo, 2010; Kelderer *et al.* 2012), Altri funghi endofiti delle radici o patogeni tellurici delle piante di particolare interesse, inserite in collezione (http://www.isci.it/isciTC/Micoteca_web/index.html) sono: *Rosellinia necatrix*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* sp., diversi gruppi di anastomosi di *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*), altre 9 specie di *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Botrytis cinerea*, *Phoma* spp., *Chaetomium funicola*, *Cladosporium herbarum*, *Pythium* spp. e altri.

1.1.1 Metodologia di isolamento, identificazione e requisiti degli isolati

La collezione include funghi filamentosi isolati e purificati dai tessuti delle radici secondo la metodologia ampiamente spiegata nel manuale "Collezioni di Microorganismi di interesse agrario e Ambientale (Barba *et al.*, 2011). L'identificazione viene fatta in base alle macro e micro caratteristiche delle colonie con le chiavi tassonomiche classiche edite da CABI <http://www.cabi.org/> e da CBS, <http://www.cbs.knaw.nl/>, e vari manuali specifici per il riconoscimento dei funghi filamentosi fra cui i più comuni quelli di Nelson *et al.* (1983) per i *Fusarium* spp. e quelli di Watanabe, (2002) specifico sui funghi tellurici.

Figura 1 Esempio di variabilità delle caratteristiche biologiche e funzionali di una popolazione di *Rhizoctonia* spp. binucleata in collezione, isolata da fragola in diversi areali italiani e sottoposta a studi filogenetici (Manici e Bonora, 2007)



L'identificazione in casi dubbi viene effettuata e/o validata presso centri esterni di identificazione (CBS, Fungal Biodiversity Centre ,Utrecht, The Netherlands) mentre l'originalità degli isolati viene garantita con la deposizione in GenBank delle sequenze nucleotidiche delle regioni ITS (Internal transcribed spaced regions).

Tutti gli isolati di interesse, appena terminata l'identificazione, e anche prima nel caso di caratteristiche biologiche particolarmente interessanti da preservare, vengono messi in conservazione in azoto liquido; una seconda modalità di conservazione, in acqua sterile o su agar carota (Smith e Onions, 1994) in tubi autoclavabili con tappo a vite, viene mantenuta a 6°C, in una specifica cella climatizzata per micologia. Questa forma di conservazione in "living culture" viene utilizzata per le specie dal carattere saprofitario più spiccato e tutti gli isolati che si prevede di sottoporre a studi biologici nel breve-medio periodo.

1.2 Funghi filamentosi del suolo in collezione da ricerche sulla valutazione degli impatti antropici e climatici sulla fertilità biologica dei suoli agrari.

La collezione include numerosi isolati di funghi filamentosi isolati da suolo e da matrici organiche, soprattutto residui di piante colonizzati naturalmente dai funghi del suolo. Gli studi che hanno portato alla messa in collezione di questi funghi sono principalmente di 2 tipi:

- a. le comunità fungine dei suoli come indicatori biologici dei suoli agrari;
- b. le comunità fungine dei suoli come fonte di microrganismi di interesse per i seguenti campi di studio
 - attività di demolizione dei residui vegetali, sia in funzione dei processi di demolizione legati al ciclo del carbonio, sia in funzione delle loro applicazioni ai processi industriali, in particolare per l'attività cellulolitica.
 - controllo dei patogeni tellurici (antagonisti, iperparassiti di nematodi, ecc).

a. Negli studi sui funghi come indicatori di biodiversità e del rapporto ecosistema – microflora sono stati inseriti in collezione isolati rappresentativi delle comunità fungine con i seguenti criteri i) la loro frequenza relativa (abundance) entro la comunità; b) il loro interesse biologico. Fanno parte di questi molte specie di *Fusarium* di suoli identificati come repressivi da specifiche prove di coltivazione di fragola in Sardegna (Manici *et al.*, 2005), isolati dei generi *Fusarium*, *Aspergillus*, *Verticillium* e *Penicillium* nei pescheti ad alta fertilità biologica e repressivi individuati della piana del Sele (Manici e Caputo, 2010). Nell'ambito di indagini ambientali sui siti tipici di produzione di ciliegio sono state inserite in collezione specie risultate ambiente-specifiche dei siti in studio (Manici *et al.*, 2010) come *Pochonia chlamydosporia*, *Humicola fuscoatra*, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp. e altri isolati visibili nella lista della collezione on line (http://www.isci.it/isciTC/Micoteca_web/index.html). Questi studi sui funghi come indicatori ambientali dovrebbero avere come logica prosecuzione la costituzione di collezioni "in situ" di agro-ambienti di riferimento dell'areale italiano di cui i microrganismi rappresentativi in collezione dovrebbero fungere da riferimento insieme agli indici di diversità ad altri parametri biologici.

b. Nella collezione vi sono diversi funghi di interesse per l'attività di demolizione dei residui, e per l'attività cellulolitica; fra questi troviamo *Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium simplicissimum* e molti altri funghi isolati da matrici organiche naturalmente colonizzate in suolo, che sono stati oggetto di uno screening specifico per attività macerante del lino allo scopo di valutare la fattibilità in ambiente mediterraneo dell'applicazione della tecnica di macerazione a terra, una tecnica a basso costo utilizzata in Francia e nei paesi europei ad ambiente continentale (Fila *et al.*, 2001).

Numerosi sono altresì le specie telluriche saprofitarie poste in collezione per l'interesse del loro potenziale biologico, in particolare *Myrothecium verrucaria* e *Verticillium lecanii* e *Verticillium tenerum*, *Paecilomyces liliacinus* come specie nematocide, molte specie di *Fusarium* (12 specie in collezione), che insieme ad *Aspergillus* a *Penicillium* rappresentano il genere in assoluto più ricco di metaboliti secondari che mediano numerosi processi biologici nel suolo (Ganguli, 2007).

1.2.1 Metodologia di isolamento e requisiti degli isolati

I funghi filamentosi da suolo sono stati tutti isolati con il metodo delle diluizioni seriali su agar acqua. Nel caso dei *Pythium* spp. (Oomicota) isolati direttamente da suolo, è stato utilizzato il

substrato selettivo a base di corn meal agar (Manici *et al.*, 2004), sempre con la tecnica delle diluizioni seriali e incubazione a temperature fra 17-18° come ulteriore elemento selettivo per questo gruppo di microorganismi.

Gli isolati inseriti in collezione sono in tutti i casi rappresentativi di popolazioni presenti nei suoli sotto studio. In molti casi stati messi in conservazione in azoto liquido addirittura prima del definitivo riconoscimento per garantire la conservazione delle caratteristiche biologiche originali.

1.3 Conservazione, Catalogazione e gestione della database

La collezione ha il 90% degli isolati conservati in azoto liquido, il 60% circa è conservato anche in coltura viva, ma questa modalità che comunque riduce le caratteristiche funzionali degli isolati viene utilizzata per quelli oggetto di ricerca nel breve - medio periodo. Le modalità di conservazione sono ben illustrate nel manuale d'uso della "collezione di Microorganismi di interesse agrario ed ambientale" (Barba *et al.*, 2011)

Gli isolati sono organizzati in una banca dati ACCESS svolgibile dagli operatori per genere, progetto, ospite. Nel database ACCESS gli isolati sono inoltre catalogati sulla base dei seguenti parametri: progetto, provenienza, anno di isolamento, ospite.

Sono poi inseriti: link della sequenza nucleotidica depositata in GenBank o in altre collezioni, riferimento di pubblicazioni, modalità di conservazione e posizione fisica dell'isolato in micoteca.

La posizione fisica in contenitore di Azoto liquido e in cella climatizzata è stata recentemente integrata con il riferimento di un codice a barre che caratterizza ogni isolato, ne garantisce l'originalità nelle procedure di rigenerazione e di utilizzo degli isolati da parte di operatori diversi dal costituente o dai tecnici che da anni seguono la collezione.

È in atto un lavoro di catalogazione di tipo fotografico che dovrebbe avere anche uno scopo didattico oltre a facilitare il riconoscimento di operatori non esperti nelle periodiche operazioni di rigenerazione delle colonie pure. Si mira ad avere per ogni specie, fotografie di micro e macro elementi caratteristici necessari al riconoscimento svolto con tassonomia convenzionale. L'obbiettivo è che almeno un isolato per specie sia illustrato con una foto della colonia pura su substrato standard (PDA).

La lista completa degli isolati in collezione è disponibile *online* attraverso la pagina (http://www.isci.it/isciTC/Micoteca_web/index.html) oppure è raggiungibile attraverso il sito del CRA-CIN (<http://cin.entecra.it/>) attraverso "ricerca". Oltre agli isolati nella lista, la collezione comprende 2 popolazioni termine fuori collezione. L'arricchimento della collezione con nuovi isolati è costante.

1.3.1 Collegamenti ad altre collezioni

1.3.1.1 Collezioni nazionali

La collezione del gruppo CRA-CIN Agronomy ha scopo ed usi scientifici, è infatti nata ed è stata accresciuta sulle necessità di ricerca del gruppo. Invece i 182 isolati della collezione ad oggi inseriti nel database COLMIA (<http://www.colmia.it/>), una rete di collezioni finanziata dal MiPAAF, sotto il coordinamento del CRA Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma, sono stati scelti per inserire, in una collezione nazionale comune, quelli selezionati in funzione della conservazione della biodiversità dei microorganismi a livello italiano. Anche in questo caso l'inserimento dei microorganismi è costante, ma ridotto rispetto alla micoteca CRA-CIN Agronomy in quanto vengono inseriti isolati che sono già stati oggetto di studio o di particolare interesse ambientale.

La collezione CRA-COLMIA è inserita con il codice WDCM 945 nella lista delle collezioni "Culture Collections Information Worldwide" (<http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/>) del World Data Centre for Microorganisms (<http://www.wfcc.info/ccinfo/home/>).

1.3.1.2 Collezioni internazionali

Numerosi isolati della collezione sono inseriti come sequenza nucleotidica in GenBank, come indicato nella lista della collezione CRA-CIN disponibile on line o come verificabile con il *search* al sito (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Molti di questi isolati sono stati in passato depositati

nell'Herbarium U.S. National fungus collection (BPI) dell'USDA a garanzia dell'originalità genetica del materiale depositato; mentrepìù recentemente, a garanzia dell'unicità degli isolati, viene accettata dall'NCBI il codice di riferimento della collezione on line del CRA-CIN.

Infine, 9 isolati in collezione al CRA-CIN sono inseriti anche nella collezione del CBS, Fungal Biodiversity Centre (Utrecht, The Netherlands) <http://www.cbs.knaw.nl>. I corrispondenti codici CBS sono disponibili nella lista on line della micoteca CRA-CIN.

Numerosi isolati della collezione du fungjhi del CRA-CIN sono stati utilizzati per studi di popolazione svolti da altri ricercatori (Beas-Fernández *et al.*, 2006).

Infine, la collezione include isolati provenienti da diversi paesi, non tutti visibili on line, in particolare *Macrophomina phaseolina* dagli USA, I *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razze 1 e 2 dalla American Type Culture Collection (ATCC) e diversi gruppi di anastomosi di *Rhizoctonia solani* e di *Rhizoctonia* sp. binucleata concessa da Ricercatori Israeliani.

Figura 2 Pagina di apertura DATABASE ACCESS della micoteca funzionale alla ricerca del gruppo CRA-CIN Agronomy and Agricultural Systems.

The image shows two overlapping browser windows from the CRA-CIN database. The top window displays the main 'MICOTECA COLLECTION' page with navigation buttons for 'Micoteca', 'Print List', and 'Barcode'. A red arrow points from the 'Micoteca' button to the second window. The second window shows a search result for 'Rhizoctonia' with a table of records and a detailed record view for 'Rhizoctonia sp. AG-A'.

Table 1: Search Results for Rhizoctonia

Genus	Specie	Host	Project
Rhizoctonia	sp. AG-A	strawberry	SNEH
Rhizoctonia	sp. AG-F	strawberry	SNEH
Rhizoctonia	sp. AG-F	strawberry	SNEH
Rhizoctonia	sp. AG-G	strawberry	SNEH
Rhizoctonia	sp. AG-G	strawberry	SNEH
Rhizoctonia	sp. AG-I	strawberry	SNEH
Rhizoctonia	sp. AG-G	strawberry	RHZO-AMOVA
Rhizoctonia	sp. AG-A	strawberry	RHZO-AMOVA
Rhizoctonia	solani	green house	UNKNOWN

Table 2: Detailed Record for Rhizoctonia sp. AG-A

Genus	Rhizoctonia
Specie	sp. AG-A
Division	Basidiomycota
Project	RHZO-AMOVA
Label	RH02
Date	2006
Host	strawberry
Origin	Metaponto (MT), IT
Isolation year	2001
CRA-PAV collection link	
GenBank N	AY927315

Conservation Options:

- Potato Sucrose Agar
- Carrot Agar
- Water
- Liquid Nitrogen

References: [abstract 2007](#)

1.4 Prospettive

La collezione CRA-CIN di funghi del suolo è in costante ampliamento come pure la parte di isolati inseriti nel database CRA-COLMIA. La collezione è stata riorganizzata e periodicamente rigenerata dal 2007 in poi, ovvero, da quando la collezione ha iniziato a ricevere finanziamenti specifici dal MiPAAF per le collezioni di microorganismi . Ad oggi l'organizzazione del database

per la catalogazione con codice a barre, l'acquisizione della specifica cella per micologia ed altre strumentazioni garantiscono il mantenimento degli isolati e permettono un razionale accrescimento della collezione. Attualmente si mira a migliorare la parte didattica della collezione corredando con foto micro e macroscopiche le descrizioni degli isolati.

1.5 Bibliografia

- Beas-Fernández R., De Santiago-De Santiago A., Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N 2006. Characterization of Mexican and non Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seed and endoglucanase gene. Journal of Plant Pathology (ed. ETS Pisa) 88: 53-60.
- Bailey V.L., Smith J.L., Bolton Jr H. 2002 Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated to enhancing C sequestration. Soil Biology & Biochemistry 34:997-1007.
- Ganguli B.N. 2007 Fungal Secondary Metabolites: a Pandora's Box of Treasures. pp 1-15 in Fungi Multifaceted Microbes. Ganguli B.N and Deshmukh S.K. CRC Taylor & Francis, NewYork U.S.A.
- Fila G., Manici L.M. Caputo F. 2001. In vitro evaluation of dew retting of flax by fungi from southern Europe. Annals of Applied Biology 138: 343-351
- Herre E.A., Mejía L.C., Kyllö D.A., Rojas E., Maynard Z., Butler A., Van Bael, S.A. 2007. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. Ecology 88:550-558.
- Kelderer M., Manici, L.M., Caputo, F., Thalheimer M. 2012 Planting in the 'inter-row' to overcome replant disease in apple orchards: a study on the effectiveness of the practice based on microbial indicators. Plant and Soil 357: 381-393
- Manici L.M., Caputo F. 2010 Soil fungal communities as indicators for replanting new peach orchards in intensively cultivated areas. European Journal of Agronomy 33: 3 188-196
- Manici L.M., Caputo F.; Benedetti A. 2010 Soil microbial diversity as indicator for agro-eco systems producing high quality products. Case study: typical cherry production in Italy. AGRO2010, Proc. XI ESA Cong. Montpellier, 233-234.
- Manici L.M., Caputo F. 2009 Fungal community diversity and soil health in intensive potato cropping systems of the east Po valley, northern Italy. Annals of Applied Biology 155: 2 245-258.
- Manici L.M., Bonora P. 2007 Molecular genetic variability of Italian binucleate *Rhizoctonia* spp. isolates from strawberry European Journal Plant Pathology 118: 31-42
- Manici L.M., Caputo F., Baruzzi G. 2005. Additional experiences to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex. Annals of Applied Biology 146: 421-431
- Manici L.M., Caputo F., Babini V. 2004 Effect of green manure on *Pythium* spp. Population and microbial communities in intensive cropping systems. Plant & Soil 263: 133-142
- Manici L.M., Cerato C., Burzi P.L. 1999 *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* isolates associated with dry rot and wilting of potatoes in Italy. Proc. 14^o Conference of the Eu. Ass. for Potato Research del 2-7 may 1999. Sorrento, pp. 515-516
- Manici L.M., Caputo F., Cerato C. 1995. Temperature response of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy Plant Disease 79: 834-838.
- Manici L.M., Cerato C. 1994. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* isolates from tubers and potato plants. Potato Research 37: 129-134
- Redman R.S., Dunigan D.D., Rodriguez R.J. 2001 Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? New Phytologist 151:705-16
- Nelson P.E., Tousson T.A., Marasas W.F.O. 1983 *Fusarium* Species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. 193 pp.
- Smith D., Onions A.H.S. 1994. The preservation and maintenance of living fungi, 2nd ed. IMI Technical Handbook 2. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- Vilgalys R. 2003. Taxonomic misidentification in public DNA databases. New Phytologist 160: 4-5.
- Watanabe T. 2002 Soil and seed Fungi. 2ed CRC Taylor & Francis, New York U.S.A.486 pp.

MICROORGANISMI ENTOMOPATOGENI*

Responsabile Scientifico: Dr. Pietro Rumine; Collaboratore: Dr. Gian Paolo Barzanti

CRA-ABP Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia – Settore Entomologia
Via Lanciola, 12/A – Cascine del Riccio - 50125 Firenze

Riassunto

I microrganismi entomopatogeni, presenti in natura in numerosi substrati, sono organismi microscopici dotati della capacità di esercitare azione antagonista verso popolazioni di artropodi o di nematodi. I microrganismi maggiormente impiegati nei sistemi di lotta biologica e integrata appartengono ai regni dei batteri e dei funghi. Tali sistemi di difesa sono fondati sul principio della biosostenibilità, del mantenimento della biodiversità, delle strategie a basso impatto ambientale. L'esistenza di collezioni di microrganismi entomopatogeni sta alla base della difesa microbiologica delle piante dagli attacchi di natura entomologica. Presso il CRA-ABP (ex Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria) di Firenze è presente una collezione di tali organismi. La collezione comprende più di 300 isolati di cui 266 sono funghi e il resto batteri.

È importante ricordare che numerosi isolati di questa collezione sono inseriti nel database COLMIA <http://www.colmia.it/>, una rete di collezioni finanziata dal MiPAAF, sotto il coordinamento del CRA-PAV, Centro di ricerca per la patologia vegetale di Roma.

Nel testo viene succintamente descritta la peculiarità della collezione e indicata l'attività ad essa connessa per il mantenimento, la cura, l'accrescimento, il saggio e l'utilizzazione dei ceppi conservati.

Summary

Entomopathogenic micro-organisms, present in numerous substrates in the wild, are microscopic organisms with antagonistic effects on populations of arthropods or nematodes. The micro-organisms most commonly employed in biological and integrated control systems belong to the bacterial and fungal kingdoms. These control systems are based on the principle of biosustainability, maintenance of biodiversity and low environmental impact strategies. Collections of entomopathogenic micro-organisms are the basis of the microbiological defence of plants against insect attacks. The CRA-ABP (formerly Experimental Institute for Agrarian Zoology) of Florence houses a collection of these organisms consisting of over 300 isolates, of which 266 are fungi and the rest bacteria. Many of the isolates in this collection are included in the COLMIA database <http://www.colmia.it/>, a network of collections financed by the Italian Ministry of Agriculture (MiPAAF) under the coordination of Rome's Research Centre for Plant Pathology (CRA-PAV).

In the text, we give a brief description of the collection and indicate the activities required for the maintenance, care, growth, assay and use of the conserved strains.

Parole chiave

Lotta microbiologica, microrganismi entomopatogeni, collezioni, biodiversità, biosostenibilità

Keywords

Microbiological control, entomopathogenic micro-organisms, collections, biodiversity, biosustainability

1 I microrganismi entomopatogeni

I microrganismi entomopatogeni sono organismi di dimensione microscopica presenti in natura in numerosi substrati e dotati, in condizioni favorevoli, della capacità di esercitare azione antagonista (parassitismo, competizione, ecc.) verso popolazioni di artropodi o di nematodi appartenenti a interi ordini, famiglie, generi o, più specificamente, a specie.

Nell'ambito di tali popolazioni che possono essere combattute con strategie di lotta biologica, particolare interesse è rivolto ai fitofagi che sono in grado di causare danni anche ingenti a

* doi:10.4458/0986-19

coltivazioni agrarie e forestali con ripercussioni di vario impatto: economico, ambientale, paesaggistico, sociale ecc.

I microrganismi maggiormente impiegati nei sistemi di lotta biologica e integrata appartengono ai regni dei batteri e dei funghi. Essi possono trovare ampia utilizzazione in interventi di difesa basati sul principio della biosostenibilità, del mantenimento della biodiversità, delle strategie a basso impatto ambientale. Tali strategie trovano fondamento nella esistenza di collezioni viventi di microrganismi intese come "riserva" di variabilità genetica in termini di virulenza, spettro d'azione, capacità di produrre metaboliti ecc. per le diverse esigenze di difesa delle colture dalle avversità di origine entomologica.

1.2 La Collezione del CRA-ABP (ex Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria)

La "Collezione di microrganismi entomopatogeni" creata presso il CRA-ABP - Settore Entomologia ha scopi scientifici e applicativi. Nata per l'interessamento di alcuni ricercatori all'interno della "vecchia" Sezione di Biologia e Difesa dell'ex Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria di Firenze, è stata nel tempo ampliata e ristrutturata sulle esigenze di ricerca del gruppo di lavoro. La collezione comprende attualmente oltre 300 isolati di microrganismi appartenenti prevalentemente al grande regno dei funghi o miceti (266) e, in numero più esiguo, a quello dei batteri. Fra i batteri si annoverano numerosi isolati di *Bacillus thuringiensis* e alcuni di *Bacillus cereus*; fra i ceppi fungini sono presenti in prevalenza isolati di *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces variotii*, *Verticillium lecanii* e alcuni di *Metarhizium anisopliae*. Tutti i microrganismi sono oggetto di studio e applicazione in strategie di lotta biologica ed integrata per il controllo dell'entomofauna dannosa alle piante.

Parte degli isolati della collezione è stata inserita nel database COLMIA <http://www.colmia.it/>, una rete pluridisciplinare di collezioni finanziata dal MiPAAF sotto il coordinamento del CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma. I ceppi inseriti in questo database sono stati scelti per costituire un settore di interesse nell'ambito di una collezione nazionale comune per quanto riguarda la matrice microbiologica ma caratterizzata da finalità disciplinari diverse. L'aggiornamento della collezione avviene costantemente in stretta correlazione con l'approfondimento delle tecniche e delle problematiche legate alle metodologie di difesa dai fitofagi nell'ottica ormai imprescindibile, come accennato, della biosostenibilità, del basso impatto ambientale, della salvaguardia della biodiversità.

Nell'ambito della "cura" della collezione (isolamento, accrescimento, caratterizzazione, mantenimento) viene costantemente condotta tutta una serie di attività di cui viene sotto riportata una sintetica descrizione preceduta da una succinta presentazione dei microrganismi prevalenti nella collezione stessa.

1.2.1 Microrganismi entomopatogeni di particolare interesse nella Collezione

Batteri

Bacillus thuringiensis

Si tratta del batterio, sporigeno e tossigeno, forse più studiato e che ha trovato la più ampia utilizzazione in ambito forestale oltre che in contesti agrari e urbani. La specie è diffusa ovunque, nel terreno, sulla vegetazione, su insetti morti. In coltura su substrati adatti (Fig. 1) forma colonie di colore bianco-crema con superficie e contorni corrugati.

Del batterio sono attualmente conosciute diverse sottospecie, tra le quali si ricordano le ssp. *kurstaki*, ssp. *tenebrionis*, ssp. *aizawai*, ssp. *israelensis*. Ognuna di esse è caratterizzata da un'attività prevalente nei confronti di determinati gruppi di insetti.



Figura 1 Coltura di *Bacillus thuringiensis* su substrato agarizzato NA.

Funghi

Beauveria bassiana

Tra i miceti entomopatogeni *B. bassiana* è estesamente impiegata nella difesa microbiologica contro artropodi dannosi in campo agro-forestale. Specie ubiquitaria, è rinvenibile nel terreno, sulla vegetazione, sul corpo di insetti morti. In coltura artificiale (Fig. 2) è caratterizzata da micelio bianco, tendente al giallo-crema con l'invecchiamento, di aspetto polverulento per l'abbondante produzione di conidi (variabile con gli isolati).



Figura 2 Coltura di *Beauveria bassiana* su substrato agarizzato SDA.

Metarhizium anisopliae

Il micete è molto diffuso nel terreno ed è in grado di aggredire un'ampia gamma di insetti fra cui ortotteri, emitteri, lepidotteri e coleotteri.

È caratterizzato da conidi di forma allungata e privi di setti, di colore verde, riuniti in catene.

In coltura artificiale (Fig. 3) forma colonie inizialmente di colore bianco che in seguito virano al verde oliva.

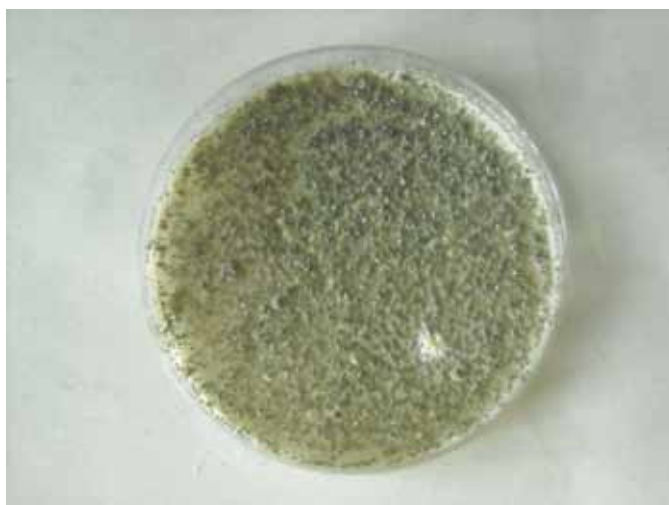


Figura 3 Coltura di *Metarhizium anisopliae* su substrato agarizzato SDA.

Paecilomyces spp.

Le specie appartenenti al genere indicato sono assai diffuse nei diversi areali agro-forestali. Alcune di esse risultano adatte per applicazioni di lotta biologica contro larve di lepidotteri e coleotteri ed anche nei confronti di alcuni nematodi.

In coltura pura (Fig. 4) formano colonie di colore variabile dal grigio al crema, al viola più o meno scuro a seconda della specie.



Figura 4 Coltura di *Paecilomyces lilacinus* su substrato agarizzato PDA.

Verticillium lecanii

Il micete è rinvenibile su numerosi substrati fra cui diversi artropodi. In strategie di lotta biologica trova applicazione di lotta contro afidi, aleurodidi e lepidotteri su colture ornamentali in coltura protetta. Può risultare attivo anche nei confronti di acari e nematodi.



In coltura artificiale (Fig. 5) il microrganismo evidenzia un micelio di colore bianco ghiaccio.

Figura 5 Coltura di *Verticillium lecanii* su substrato agarizzato PDA.

1.2.2 Materiali e Metodi nella cura della Collezione

Per le procedure riguardanti la cura della "Collezione di Microrganismi entomopatogeni", in senso più ampio si rimanda alla Bibliografia generale sotto riportata mentre in senso più particolareggiato si fa riferimento a quanto pubblicato su Petria (Barba *et al.*, 2011) ed all'altra Bibliografia specifica sotto indicata.

Di seguito si accenna, in sintesi, alle principali fasi che caratterizzano l'attività finalizzata all'acquisizione di nuovi microrganismi entomopatogeni, la realizzazione di test di patogenicità, la sperimentazione di metodi diversi e complementari di conservazione degli isolati.

1.2.2.1 Campionamento

Il campionamento per l'ottenimento di ceppi di microrganismi prevede la ricerca di "fonti" diverse in vari ambienti (boschi, foreste, campi coltivati ecc.) in funzione degli obiettivi proposti. I materiali più frequentemente presi in esame sono il terreno, parti di vegetali (cortecce, rami, foglie, semi ecc.) gli insetti.

Le tecniche di prelievo dei campioni sono quelle ordinariamente impiegate in ambito agro-forestale in funzione dei contesti ambientali e degli altri principali parametri.

1.2.2.2 Isolamento

L'isolamento dei microrganismi entomopatogeni avviene attraverso metodologie di laboratorio che differiscono in relazione all'organismo cercato ed al substrato di partenza.

Isolamento da terreno

Partendo da campioni di terreno, possono essere adottate tecniche diverse. Per quanto riguarda i batteri, possono essere fatte sospensioni in acqua sterile a diluizioni progressive da distribuire in piastra su substrati selettivi. Nel caso dei miceti, oltre a quanto indicato per i batteri, può essere usata la tecnica del "baiting" mediante insetti-esca aventi lo scopo di attirare sul proprio corpo il micelio di funghi eventualmente presenti.

Isolamento da materiale vegetale

Per l'isolamento da porzioni di vegetali, nella ricerca di batteri può essere impiegato il lavaggio delle superfici vegetali per l'utilizzo del percolato a varie diluizioni su mezzo agarizzato selettivo. Per la ricerca di funghi si può procedere con i lavaggi o, nella ricerca di funghi endofiti, con l'utilizzo diretto di porzioni di tessuti vegetali poste su substrati selettivi.

Isolamento dal corpo di artropodi

L'ottenimento di microrganismi dal corpo di un artropode comporta, di norma, nel caso dei batteri, la dissezione del corpo dell'insetto ed il recupero del liquido dell'emocele oppure il

prelievo di piccole porzioni di tessuto interno e l'immissione in piastra su mezzo selettivo. Per l'isolamento di funghi, invece, si può favorire l'emersione del micelio fungino all'esterno del corpo dell'insetto (camere umide) per procedere quindi al prelievo del micete ed all'incubazione su substrato selettivo.

1.2.2.3 Purificazione

Una volta ottenuto l'isolato, è spesso necessario procedere alla sua purificazione in quanto non è infrequente verificare la presenza di più microrganismi in antagonismo o in coabitazione sul terreno di coltura. Il ricorso ripetuto all'impiego di substrati selettivi abbinato ad una incubazione a temperature specifiche facilita l'esclusione di alcuni microrganismi indesiderati. Un "passaggio" spesso obbligato consiste nella realizzazione di colture monosporiche.

1.2.2.4 Identificazione

L'identificazione del microrganismo richiede innanzitutto la conoscenza della morfologia sia in osservazioni macroscopiche che in osservazioni microscopiche delle colture.

Nel caso dei batteri la morfologia della colonia in coltura artificiale fornisce le prime indicazioni utili all'identificazione.

L'osservazione al microscopio ottico, specialmente in contrasto di fase, consente di evidenziare la presenza di "formazioni" specifiche come endospore e cristalli (Fig. 6).

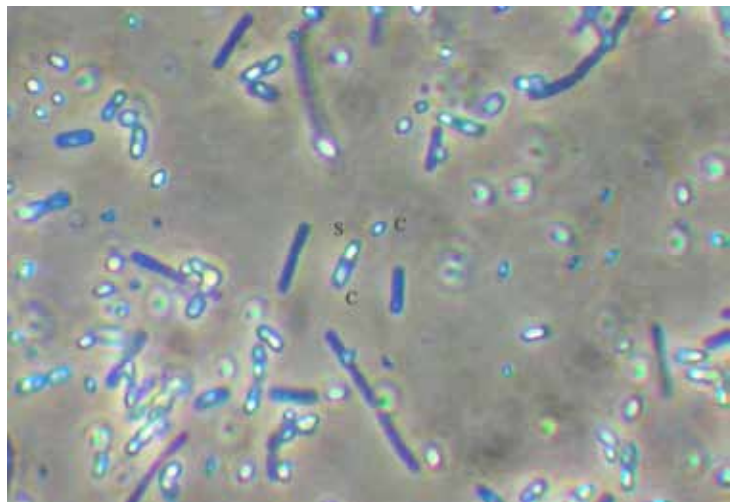


Figura 6 Endospore ellittiche e cristalli di *B. thuringiensis*.

Metodologie di identificazione più approfondite si basano su saggi sierologici o sull'analisi dei geni codificanti (geni *cry*) mediante PCR.

Per quanto riguarda i funghi, l'identificazione di un micete può essere favorita dall'osservazione macroscopica dei sintomi sull'ospite o della morfologia della colonia *in vitro*. L'osservazione al microscopio consente di evidenziare dimensione e forma delle strutture vegetative (conidiofori, cellule conidiogene, conidi) (Fig. 7) e riproduttive.

Nel caso di alcuni Ascomiceti, come quelli appartenenti al genere *Cordyceps*, è possibile talvolta rilevare sul corpo degli insetti morti vistose formazioni osservabili ad occhio nudo.

Tecniche molecolari basate sulla PCR con l'uso di marcatori molecolari consentono un'identificazione più approfondita.



Figura 7 Cellule conidiogene e conidi di *Paecilomyces* sp.

1.2.2.5 Caratterizzazione

Accertata l'identità del microrganismo, risulta fondamentale procedere ulteriormente nella sua caratterizzazione. Esistono metodologie diverse in funzione di finalità diverse. Per esempio, parallelamente ad una caratterizzazione genetica (analisi del DNA) possono essere effettuati saggi fisiologici di sviluppo *in vitro* (velocità di accrescimento delle colonie, produzione di spore o conidi, ecc.), analisi dei metaboliti prodotti, saggi di patogenicità su insetti target (artropodi diversi in stadi di sviluppo diversi in condizioni ambientali diverse ecc.) e altro.

In tutti i casi si deve tendere a comporre un mosaico il più ampio possibile.

1.2.2.6 Conservazione

La buona conservazione dei microrganismi è condizione indispensabile per un loro impiego nella lotta microbiologica. Tramite la conservazione si intende innanzitutto mantenere il più possibile inalterate nel tempo le caratteristiche del microrganismo stesso e inoltre poterne disporre in maniera pronta e facilmente utilizzabile. Fra i metodi saggiati, la conservazione tradizionale in tubo su substrato agarizzato è quella di più rapida manualità per assicurare in breve tempo il rinnovo delle colture. Di fatto però, anche a seguito di frequenti trapianti, essa può riservare sorprese sgradite per quanto riguarda il mantenimento delle caratteristiche degli isolati che, come è noto, possono andar soggetti a mutazioni indesiderate. Per ovviare a ciò si può ricorrere alla crioconservazione a basse e bassissime temperature o all'inglobamento in "pellets" di alginato di sodio. Questi metodi consentono di mantenere gli isolati per periodi relativamente lunghi (superiori ad un anno). Nell'ambito della conservazione attraverso metodologie che comprendono l'uso del freddo, è frequentemente utilizzata la liofilizzazione.

Consideriamo più in dettaglio i metodi da noi maggiormente usati.

Conservazione su substrato agarizzato (tubi a becco di flauto)

Dagli isolati ottenuti in purezza viene prelevata una minima quantità della coltura che viene trasferita in provetta sterile contenente un substrato agarizzato specifico. Posti in termostato al buio, a sviluppo avvenuto i tubi vengono conservati in frigorifero a +4°C (Fig. 8).

Al momento dell'impiego i ceppi necessitano di "rivitalizzazione" mediante trasferimento in piastra su substrato agarizzato adatto.

Il metodo di conservazione risulta piuttosto semplice nelle normali condizioni di laboratorio anche se, come detto, sussiste il rischio di alterazione di alcune peculiarità del ceppo. Per ovviare a ciò potrebbe essere preferibile scegliere altri sistemi come quelli sotto riportati.



Figura 8 Conservazione di miceti entomopatogeni in tubi su terreno agarizzato.

Conservazione a basse temperature (crioconservazione)

La tecnologia del freddo è risultata molto utile per la conservazione di numerosi microrganismi entomopatogeni. Prove di mantenimento di isolati di *B. thuringiensis* a temperature ultrabasse (-140°C) in glicerolato sembrano promettenti. Risultati positivi sono stati ottenuti anche conservando a basse temperature (-20°C) alcuni miceti (*B. bassiana*) allevati in tubo su substrato agarizzato. Le colonie fungine sono risultate vitali dopo oltre tre anni.

Conservazione in "pellets" di alginato di sodio

La conservazione di batteri e funghi in formulazioni di alginato di sodio può essere consigliata, sia per il mantenimento della vitalità che per fini pratici (es. distribuzione dei microrganismi nel terreno per il controllo di insetti ad habitat terricolo). In pratica, l'incapsulamento in "pellets" di

alginato consiste nella preparazione di una sospensione del microrganismo da unire ad una sospensione di sodio-alginato e caolino. Si fa gocciolare il materiale in calcio-cloruro. I pellets che si formano vengono prelevati, lasciati asciugare (Fig. 9) e introdotti in contenitori sterili.



I pellets sono mantenuti in frigo a +4°C oppure semplicemente a temperatura ambiente. Il metodo consente una lunga conservazione (oltre l'anno), risulta di pratica attuazione e non richiede attrezzature costose o sofisticate.

Figura 9 La preparazione dei pellets di alginato.

Conservazione per liofilizzazione

La liofilizzazione è invece un processo che implica la disponibilità di attrezzature specifiche e piuttosto costose. In laboratorio il procedimento si attua a partire da quantità adeguate di materiale batterico o fungino coltivato su adatti substrati.

Per quanto riguarda i batteri, si effettua l'inoculo in piastre Petri. A sviluppo ottimale si procede



Figura 10 Conservazione di microrganismi entomopatogeni liofilizzati.

alla "raccolta" della colonia ed alla sua immissione in contenitori sterili come provette eppendorf, piccole fiale o ampolle di vetro.

Per quanto si riferisce ai funghi, si agisce come per i batteri su substrati specifici. La produzione di micelio e conidi è favorita dal mezzo selettivo. Il materiale ottenuto viene introdotto in contenitori sterili e sottoposto a liofilizzazione.

L'operazione di liofilizzazione richiede molte ore.

La conservazione dei liofilizzati è effettuata a temperatura ambiente, in frigorifero a +4°C oppure in congelatore a -20°C . (Fig. 10).

L'utilizzazione dei liofilizzati avviene mediante prelievo del microrganismo e il suo reinoculo su substrato specifico, a secco o dopo sospensione in acqua.

La liofilizzazione consente periodi di conservazione lunghi, lo stoccaggio di un gran numero di ceppi in poco spazio e l'agevole manipolazione e trasporto.

1.2.2.7 Esempi di impiego dei microrganismi della collezione in attività sperimentali

I microrganismi della nostra collezione sono stati oggetto di attività sperimentale di laboratorio e di campo allo scopo di valutare le possibilità di impiego nella difesa delle piante attaccate dall'entomofauna dannosa. A titolo esemplificativo si ricorda l'utilizzo di alcuni dei ceppi fungini isolati e conservati in collezione. Tutte le specie microbiche coinvolte nelle sperimentazioni sono state testate in prove di laboratorio su larve del lepidottero-esca *Galleria mellonella*. Diversi isolati del fungo *Beauveria bassiana* sono stati saggiati per il controllo di esemplari adulti del coleottero cerambicide *Monochamus galloprovincialis*, xilofago di rilevante interesse forestale (Francardi *et al.*, 2003; Rumine & Francardi, 2006 e 2007). Altri isolati del fungo sono stati testati su larve del coleottero crisomelide *Agelastica alni*, defogliatore dell'ontano (Rumine

et al., 2005), dei lepidotteri nottuidi *Agrotis ipsilon* e *Mamestra brassicae*, del coleottero crisomelide *Diabrotica virgifera*, organismo nocivo del mais soggetto a lotta obbligatoria. Isolati di *Beauveria bassiana* e/o *Metarhizium anisopliae* sono stati oggetto di attività sperimentale su adulti dell'emittero *Leptoglossus occidentalis* (Rumine & Barzanti, 2008; Rumine & Barzanti, 2009), su larve del coleottero *Curculio elephas*, il "balanino delle castagne" (Barzanti & Rumine, 2008; Barzanti & Rumine, 2009), su adulti del coleottero *Otiorrhynchus* spp. (Rumine & Barzanti, 2010) e sui diversi stadi dell'emittero *Trialeurodes vaporariorum* (Rumine & Barzanti, 2010). L'efficacia di interventi con isolati di *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* è stata oggetto di sperimentazioni su larve e adulti del coleottero *Rhynchophorus ferrugineus*, il "Punteruolo rosso delle palme" (Rumine et al., 2010; Barzanti et al., 2010; Rumine et al., 2010) attualmente di grande attualità per l'azione distruttiva operata in intere aree del nostro Paese. Prove di laboratorio sono state inoltre condotte con il fungo *Paecilomyces lilacinus* per la lotta a nematodi fitoparassiti di piante del gen. *Quercus* (Barzanti et al., 2007). Nel settore dei batteri della collezione sono state condotte sperimentazioni con l'impiego di isolati della specie *Bacillus thuringiensis* per il controllo del lepidottero *Hyphantria cunea* (Rumine & De Silva, 2002).

1.3 Bibliografia

- Barba M., Belisario A., Luongo L. (Eds.), 2011. Manuale d'uso. Collezione di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale. Petria - Giornale di Patologia delle Piante, CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale - Roma, Vol 21 (1): 1-164.
- Barzanti G. P., Carletti B., Rumine P., 2007. - Potential use of isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson for the control of phytoparasitic nematodes: first trials against *Bursaphelenchus eremus* Rühm (Goodey). IX Cong. Naz. S.I.N., Firenze 22-24 novembre 2007. Redia XCI, 2008: 171-172.
- Barzanti G. P., Rumine P., 2008. - Impiego di isolati di *Beauveria bassiana* per il controllo del "balanino" delle castagne. Atti Giornate Fitopatologiche, Cervia (RA), 12-14 marzo, I: 309-310.
- Barzanti G. P., Rumine P., 2009. - L'impiego della lotta microbiologica nel controllo del "balanino" delle castagne per una produzione di qualità. "Castanea 2009": 1st European Congress on Chestnut; 5^o Convegno Nazionale Castagno - Cuneo, 13-16 Ottobre. Abstracts: 195.
- Barzanti G. P., Rumine P., Benvenuti C., Francardi V., 2010. - Microbiological control of the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Society for Invertebrate Pathology SIP 2010, 43th Annual Meeting, Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey, July 11-15.
- Butt T. M., Jackson C. W., Magan N., 2001. Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. CABI Publishing.
- Deseö Kovács K. V., Rovesti L., 1992. Lotta microbiologica contro i fitofagi. Teoria e pratica. Edagricole, Bologna.
- Francardi V., Rumine P., De Silva J., 2003. On microbial control of *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) (Coleoptera Cerambycidae) by means of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Deuteromycotina Hyphomycetes). Redia, LXXXVI, 2003: 129-132.
- Poinar JR. G. O., Thomas G. M., 1978. Diagnostic manual for the identification of insect pathogens. Plenum Press, New York and London.
- Rumine P., De Silva J., 2002. Verifica in laboratorio della patogenicità di ceppi di *Bacillus thuringiensis* Berliner nei confronti di *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera Arctiidae). Entomologica, Bari, 36: 153-160.
- Rumine P., Francardi V., De Silva J., 2005. - Microbiological control of *Agelastica alni* L. with some *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuill. isolates in laboratory trials. - 10th European Meeting IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes", Locorotondo (BA), June 10-15, 2005.
- Rumine P., Francardi V., 2006. - Prospects for microbiological control of *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) vector of the nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. - International Symposium "Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems" 10-14 July, Fundacao Calouste Gulbenkian, Lisbon, Portugal.
- Rumine P., Francardi V., 2007. - Microbiological control of *Monochamus* spp. vectors of *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle by means of *Beauveria bassiana*

- (Bals.) Vuill. IX Cong. Naz. S.I.N., Firenze 22-24 novembre 2007. Redia XCI, 2008: 139-142.
- Rumine P., Barzanti G. P., 2008. – Controllo microbiologico della "cimice delle conifere": prove preliminari di laboratorio. Atti Giornate Fitopatologiche, Cervia (RA), 12-14 marzo, I: 307-308.
- Rumine P., Barzanti G. P., 2009. – La "cimice delle conifere" nelle pinete italiane: prospettive di controllo microbiologico. IV Convegno Nazionale Piante Mediterranee, Marina di Nova Siri (MT), 7-10 ottobre. Riassunti: 148.
- Rumine P., Barzanti G. P., Benvenuti C., Francardi V., 2010. - Controllo microbiologico del punteruolo rosso delle palme: sperimentazioni di laboratorio. Giornate Fitopatologiche, Atti Vol. I: 303-304.
- Rumine P., Barzanti G. P., 2010. - Difesa microbiologica dagli attacchi di Oziorrinco su colture florovivaistiche. Il Floricoltore, n.6, giugno: 20-25.
- Rumine P., Barzanti G. P., 2010. - Misure di controllo microbiologico dell'aleurode su gerbera in coltura protetta. IX Giornate Scientifiche SOI, Riassunti dei lavori. Italus Hortus 17/2 Suppl.: 126.
- Rumine P., Francardi V., Benvenuti C., Barzanti G. P., 2010. - Valutazione dell'entomopatogenicità di isolati di *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* su stadi diversi di sviluppo di *Rhynchophorus ferrugineus*. Dies Palmarum, Sanremo, 18-21 novembre. Atti:32-34.
- Samson R. A., Evans H. C., Latgé J. P., 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo.

COLLEZIONE DI MICRORGANISMI DI INTERESSE LATTIERO-CASEARIO*

Responsabili Scientifici: Dr. Domenico Carminati, Dr.ssa Miriam Zago, Dr. Giorgio Giraffa
Responsabili Tecnici: Maria Emanuela Fornasari, Lia Rossetti, Barbara Bonvini

CRA-FLC Centro di ricerca per le produzioni foraggere e lattiero-casearie
Via Antonio Lombardo, 11 – 26900 Lodi

Riassunto

La collezione di microrganismi di interesse lattiero-caseario di CRA-FLC comprende per la maggior parte batteri lattici isolati da matrici lattiero casearie, ma anche batteri responsabili di difetti, batteri patogeni e batteriofagi di batteri lattici. La raccolta e catalogazione di batteri e batteriofagi da matrici lattiero-casearie è un'attività iniziata da oltre 30 anni e da sempre considerata fondamentale per gli interessi scientifici del Centro. La conservazione della microflora tipica di produzioni casearie italiane è stata finalizzata innanzitutto alla salvaguardia della biodiversità microbica, compromessa dalla progressiva industrializzazione e standardizzazione delle produzioni, e allo stesso tempo rappresenta un serbatoio di germoplasma di elevato valore per le potenzialità che tali microrganismi possono avere per applicazioni nella tecnologia di alimenti fermentati, non solo caseari, o per altre applicazioni biotecnologiche e nutrizionali.

Una serie di ceppi rappresentativi della collezione CRA-FLC è inserita nel database COLMIA (<http://www.colmia.it/>), la Collezione di microrganismi di interesse agrario, industriale e ambientale del CRA, sotto il coordinamento del CRA-PAV e con il patrocinio del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Mipaaf).

Summary

The collection of microorganisms of dairy interest of CRA-FLC includes mostly lactic acid bacteria isolated from dairy matrices, but also of spoilage and pathogenic bacteria, and bacteriophages of lactic acid bacteria. The collection and filing of bacteria and bacteriophages from dairy matrices is an activity started more than 30 years ago and that it has always been considered essential for the scientific interests of the Center. The preservation of the microflora found in many typical Italian cheeses was primarily aimed to the protection of microbial biodiversity, compromised by the progressive industrialization and standardization of dairy productions, and at the same time it represents a reservoir of germoplasm of high value for the usefulness that these organisms may have for the applications in fermented food technology, not only dairy products, or for other biotechnological and nutritional applications.

A series of strains, representative of the CRA-FLC collection, is inserted into the COLMIA database (<http://www.colmia.it/>), the collection of microorganisms involved in agriculture and in agro-industrial processes of the CRA, under the coordination of CRA-PAV and the patronage of the Italian Ministry of Agriculture and Forestry (Mipaaf).

Parole chiave

Batteri lattici, batteriofagi, diversità microbica, microbiologia lattiero-casearia, alimenti fermentati

Keywords

Lactic acid bacteria, bacteriophages, microbial diversity, dairy microbiology, fermented foods

1 La Collezione CRA-FLC

La Collezione di microrganismi di origine lattiero casearia di CRA-FLC è finalizzata alla salvaguardia della diversità microbica ancora presente in molti prodotti tradizionali ed è improntata alla selezione, identificazione e caratterizzazione di batteri lattici di potenziale interesse biotecnologico, che possa essere di riferimento per fini di studio e di servizio.

* doi:10.4458/0986-30

Presso il laboratorio di microbiologia di CRA-FLC sono conservati oltre 7000 microrganismi la cui suddivisione è qui di seguito riportata.

- Circa 1400 ceppi microbici (dei quali 1200 batteri lattici), identificati e tipizzati con metodi molecolari (PCR specie-specifica, sequenziamento gene 16S rRNA, RAPD-PCR) e liofilizzati per garantire una conservazione di lunga durata. Dei batteri lattici, 245 ceppi appartenenti alle principali specie ritrovate nei prodotti lattiero caseari sono inseriti nella Collezione Nazionale di Microrganismi di interesse Agrario ed Industriale ed Ambientale del CRA (COL.MIA - www.colmia.it). I batteri della Collezione, rappresentativi della biodiversità microbica finora ritrovata presso CRA-FLC nei prodotti caseari italiani, sono oggetto di continua indagine al fine di acquisire informazioni relative a caratteri fenotipici, fisiologici, genetici o tecnologici che ne valorizzino l'interesse applicativo (Rossetti *et al.*, 2006, 2009; Zago *et al.* 2011).
- Oltre 6000 isolati microbici, pertanto non ancora completamente identificati e caratterizzati, preliminarmente suddivisi sulla base di caratteristiche morfologiche, fisiologiche e per origine (area geografica) o matrice di isolamento. Questa "isolatoteca" rappresenta un vero "serbatoio" di diversità microbica ancora da esplorare e valorizzare. Questi isolati, attualmente conservati in forma congelata a -80°C, vengono man mano identificati, tipizzati e conservati in forma liofilizzata prima di essere inseriti nella collezione di ceppi di CRA-FLC. Le fasi di purificazione, identificazione e stoccaggio in forma liofilizzata, cioè le attività di mantenimento e implementazione della collezione di CRA-FLC, sono sostenute dal finanziamento BIODATI.
- Circa 60 batteriofagi di batteri lattici termofili. I fagi sono stati catalogati in base alla specie microbica di propagazione. Alcuni sono stati caratterizzati a livello fisiologico e molecolare (Zago *et al.*, 2006, 2008). Tutti i fagi sono conservati in forma congelata a -80°C.

1.1 Composizione specifica della collezione

I circa 1200 ceppi di batteri lattici identificati su base molecolare appartengono alle seguenti specie:

- 270 *Lactobacillus helveticus* (33 in COLMIA);
- 170 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis/bulgaricus* (32 in COLMIA);
- 130 *Lactobacillus plantarum/paraplantarum/pentosus* (32 in COLMIA);
- 90 *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus/sakei* (20 in COLMIA);
- 30 *Lactobacillus buchneri/hilgardii/brevis/coryniformis/curvatus/farciminis* (13 in COLMIA);
- 190 *Streptococcus thermophilus* (36 in COLMIA);
- 50 *Streptococcus macedonicus* (10 in COLMIA);
- 160 *Lactococcus lactis/cremoris/diacetylactis* (25 in COLMIA);
- 180 *Enterococcus faecium/faecalis/italicus/gilvus/durans* (35 in COLMIA);
- 30 *Leuconostoc mesenteroides/lactis/garlicum/citreum* (6 in COLMIA);
- 10 *Pediococcus* spp. (3 in COLMIA).

Completano inoltre la collezione circa 60 batteriofagi appartenenti alle specie *Lb. helveticus* (20), *Lb. delbr. lactis* (30), *Lb. delbr. bulgaricus* (3), *Lb. plantarum* (5), *S. thermophilus* (5).

1.2 Mantenimento e gestione della collezione

Le fasi di mantenimento, organizzazione e gestione della "ceppoteca" sono state ottimizzate negli anni al fine di aumentare il numero dei ceppi conservati, realizzando nel contempo la liofilizzazione di tutti i ceppi identificati e l'inserimento nel software di gestione della ceppoteca di tutte le informazioni disponibili relative ai nuovi ceppi inseriti. A tal fine è stato specificamente sviluppato un software di gestione per la raccolta e la rapida consultazione di tutti i dati a corredo di ogni ceppo (Figura 1). Il software, oltre a permettere una catalogazione razionale e completa delle informazioni, può essere facilmente interrogato per conoscere la consistenza della ceppoteca, confrontare le informazioni a disposizione, verificare la collocazione del materiale. Si sta completando anche la raccolta del DNA dei ceppi della collezione, per eventuali esigenze di studi e approfondimenti sul materiale genetico, evitando quindi di coltivare il microrganismo. Tutti i ceppi che vengono identificati, catalogati ed inseriti nel database sono conservati in forma liofilizzata per garantire una conservazione di lungo periodo a 4°C. Il mantenimento di breve periodo a -80°C è previsto per i ceppi ancora da identificare, non ancora inseriti nella collezione.

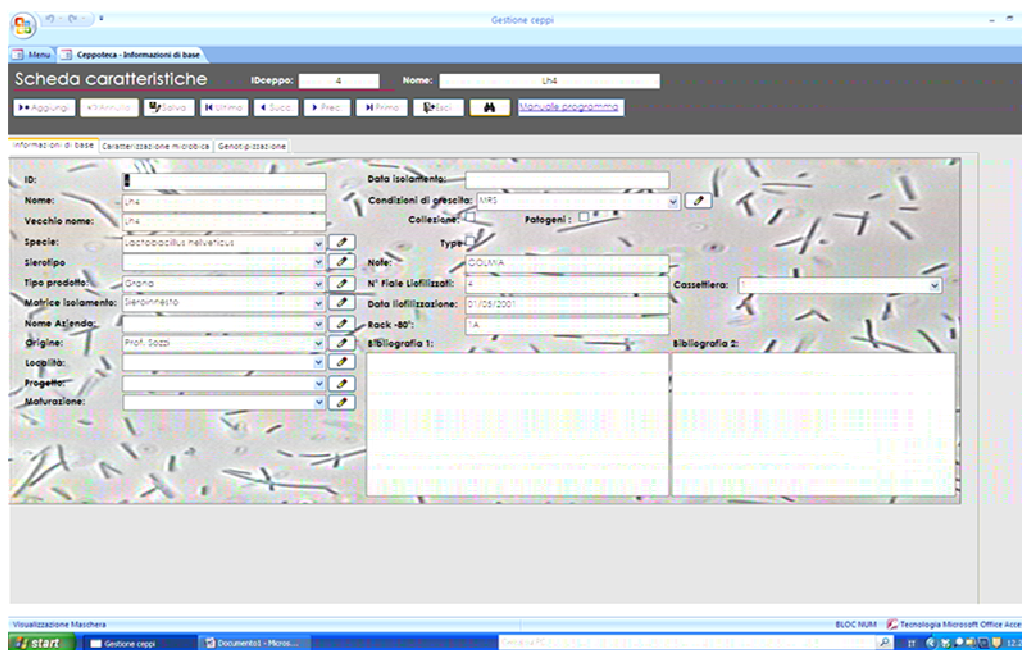


Figura 1 Software di gestione della collezione CRA-FLC: acquisizione informazioni di base.

1.2.1 Implementazione della collezione e della banca dati

Al fine di preservare la biodiversità microbica ancora esistente in prodotti lattiero caseari e di implementare la collezione CRA-FLC, continua il lavoro di isolamento di ceppi di batteri lattici ogni qual volta si rendono disponibili matrici, quali latte crudo, formaggi a latte crudo, fermenti naturali, che per origine geografica, modalità di produzione e tipologia di prodotto possiedono i prerequisiti per rappresentare una fonte di diversità microbica, ovvero un'opportunità per isolare "nuovi" ceppi, autoctoni, originali, naturalmente selezionati dalle tecnologie di produzione adottate. La collezione viene quindi continuamente "alimentata" da queste nuove acquisizioni che, dopo opportune procedure di purificazione, vengono preliminarmente conservate in forma refrigerata a -80°C andando a costituire una raccolta denominata "isolatoteca" costituita da colture non ancora identificate, oggetto di successivi studi tassonomici per accertarne la corretta identificazione (genere e specie) così da poter essere inseriti nella collezione definitiva. Anche per la gestione di questa collezione di "isolati" è stato sviluppato un software specificamente dedicato che consente una catalogazione razionale e completa dei dati, ed un efficace utilizzo delle informazioni a disposizione.

1.3 Classificazione e caratterizzazione delle colture batteriche

1.3.1 Differenziazione preliminare

I ceppi di nuovo isolamento vengono differenziati sulla base di caratteri morfologici (forma e motilità cellulare per osservazione al microscopio ottico), fisiologici (temperature min e max di crescita) e biochimici (attività catalasica, produzione di gas) prima di essere inseriti nell'"isolatoteca".

1.3.2 Identificazione e tipizzazione

CRA-FLC ha sviluppato una metodologia di "biotipizzazione genotipica" dei ceppi batterici basata sull'analisi dei profili molecolari ottenuti con tecnica RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) che utilizza un primer (M13) con sequenza "arbitraria" diffusa in molti microrganismi (Rossetti e Giraffa, 2005). Dall'amplificazione si genera una serie di frammenti che, separati elettroforeticamente, vanno a costituire un profilo che può essere caratteristico del microrganismo e ne consente la tipizzazione. La raccolta di profili diversi di ceppi della stessa specie permette di differenziare oltre ai ceppi anche le

diverse specie e quindi consente un'identificazione presuntiva della specie. I profili RAPD, intesi come numero, intensità e disposizione delle bande elettroforetiche, vengono analizzati con un software bioinformatico (BioNumerics™ ver. 5.1) che li elabora secondo modelli statistici dedicati. Si ottengono dendrogrammi che raggruppano in "cluster" i profili in base alla similarità e che permettono la costruzione di specifici database. Per costruire il database sono stati raccolti i profili RAPD di tanti ceppi diversi di ogni specie ("librerie"). Si sono costituiti cluster per ogni specie, a loro volta suddivisi in sottogruppi di similarità.

Oggi il database di CRA-FLC consente di identificare nuovi isolati in base alla semplice comparazione di un nuovo profilo ritrovato. Il software, opportunamente interrogato, indica la libreria (cioè la specie) con la quale il profilo sconosciuto è più simile ed attribuisce un punteggio (score) di identificazione:

- similarità > 80%, probabilità di corretta identificazione: buona;
- similarità > 40% - < 80%, probabilità di identificazione: insufficiente (profilo dell'isolato ignoto risulta simile, ma non identico, a una delle librerie in collezione); in questo caso è consigliata un'identificazione di conferma;
- similarità < 40%, probabilità di identificazione: scarsa (profilo atipico per la specie). E' necessaria un'identificazione di conferma.

La capacità identificativa del database è continuamente implementata con l'inserimento di nuovi profili RAPD. Quando dal confronto con le librerie un nuovo profilo RAPD risulta assimilabile ad una determinata specie, ma è diverso da quelli già depositati, il ceppo viene adeguatamente classificato con tecniche identificative consolidate (PCR specie-specifica o sequenziamento del gene 16S rRNA). Una volta confermata la specie, il profilo viene aggiunto alla libreria di quella specie per aumentare la performance identificativa del database.

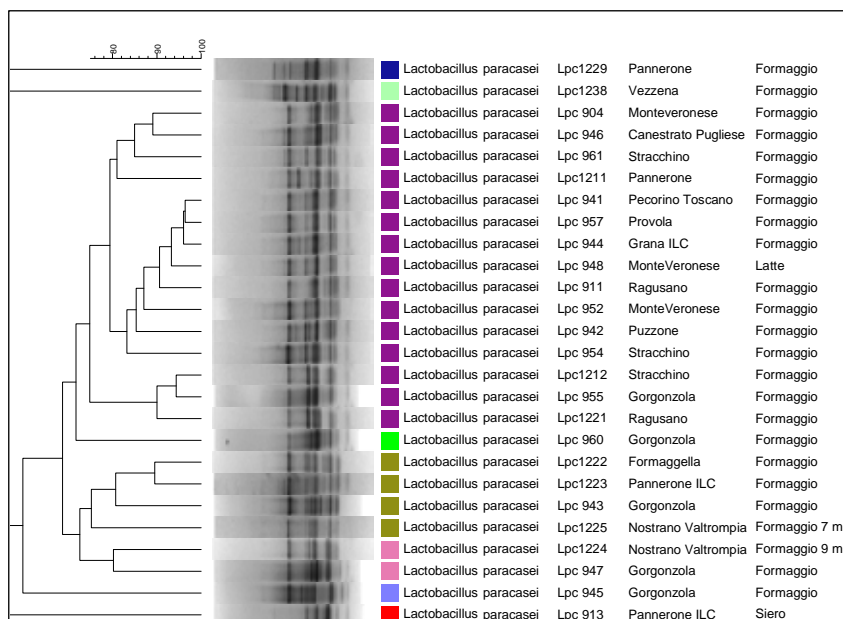


Figura 2 Dendrogramma profili RAPD-PCR M13 di *Lb. paracasei* della collezione CRA-FLC.

1.3.3 Caratterizzazione

1.3.3.1 Caratterizzazione fenotipica

La caratterizzazione fenotipica dei ceppi, a seconda della specie o di finalità particolari di studio, si articola su una serie di prove specifiche, anche in relazione alle possibili modalità di impiego (coltura starter, accessoria, funzionale, o protettiva).

Caratterizzazione per tratti di interesse tecnologico:

- attività acidificante in latte o siero di latte, a temperatura costante o variabile; acquisizione variazione di pH con sistema di registrazione multicanale ed elaborazione dei parametri cinetici di acidificazione con software dedicato;
- resistenza al sale, con prove di crescita in presenza di concentrazioni diverse di NaCl;

- attività enzimatiche generiche e specifiche (attività proteolitica in latte, attività peptidolitica su substrati sintetici; attività glutammato deidrogenasica);
- lisotipizzazione, screening di sensibilità a batteriofagi specifici (per lattobacilli termofili);
- lisogenia dei ceppi, mediante trattamento della coltura con mitomicina C (induzione del profago integrato nel genoma batterico);
- antibiotico-resistenza, valutazione della sensibilità agli antibiotici (test di diffusione in piastra) e determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).

Caratterizzazione per proprietà di interesse biochimico:

- screening attività metaboliche con sistema high-throughput Omnilog Phenotype MicroArrays per valutare esigenze nutrizionali (fonti di carbonio, azoto, fosforo, zolfo), vie biosintetiche, attività enzimatiche, effetti di pH ed osmoliti;
- produzione vitamine (riboflavina, acido folico).

Caratterizzazione per caratteri di interesse nutrizionale e funzionale (valutazione potenzialità probiotiche):

- capacità adesione, test di aggregazione cellulare con concanavalina, o con cellule di lievito;
- capacità di idrolisi dei sali biliari con metodo microbiologico;
- test di sopravvivenza alle barriere biologiche, lisozima, bile, acidità gastrica;
- attività β -galattosidasi su substrato sintetico;
- capacità di utilizzazione di composti prebiotici;
- idrofobicità cellulare;
- attività decolesteralizzante.

1.3.3.2 Caratterizzazione molecolare

Sono disponibili protocolli molecolari di amplificazione PCR per la ricerca di geni specifici (gene searching) codificanti proteine strutturali (S-layer), funzionali (enzimi metabolici), o coinvolte in meccanismi di resistenza (a fattori di stress, antibiotici, ecc.) e di virulenza.

Sono stati sviluppati protocolli di real time-PCR per studiare l'espressione genetica di caratteri di interesse nutrizionale (es. produzione di vitamine).

1.4 Caratterizzazione dei batteriofagi

Per i batteriofagi dei batteri lattici (lattobacilli soprattutto) sono disponibili protocolli di caratterizzazione fisiologica (spettro d'ospite, ciclo di crescita, efficienza di replicazione, adsorbimento) e molecolare [profilo di endorestrizione, fingerprinting RAPD-PCR, ricerca e sequenziamento di geni strutturali (*tail proteins*) e funzionali (*endolysin*)].

1.5 Bibliografia

- Rossetti L., Giraffa G., 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods* 63: 135-144.
- Rossetti L., Remagni M.C., Zago M., Bonvini B., Fornasari M.E., Cerri D., Carminati D., Giraffa G., 2006. Diversità microbica di batteri lattici non-starter isolati da formaggi artigianali italiani. *Scienza Tecnica Lattiero Casearia* 57: 479-487.
- Rossetti L., Mancuso G., Lucifora G., Zago M., Remagni M.C., Giraffa G., Carminati D., 2009. Studio della biodiversità microbica di alcuni formaggi tipici calabresi. *Scienza Tecnica Lattiero Casearia* 60: 525-539.
- Zago M., De Lorentiis A., Carminati D., Comaschi L., Giraffa G., 2006. Detection and identification of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophages by PCR. *Journal Dairy Research* 73: 146-153.
- Zago M., Rossetti L., Reinheimer J., Carminati D., Giraffa G., 2008: Detection and identification of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by PCR. *Journal Dairy Research* 75: 196-201.
- Zago M., Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J.A., Giraffa G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* 28: 1033-1040.
- Remagni M.C., Paladino M., Locci F., Romeo F.V., Zago M., Povoletto M., Contarini G., Carminati D. (2013) Cholesterol removal capability of lactic acid bacteria and related cell membrane fatty acid modifications. *Folia Microbiologica*, DOI 10.1007/s12223-013-0228-8.

COLLEZIONE DI *SINORHIZOBIUM MELILOTI* *

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Carla Scotti e Dr.ssa Maria Carelli

CRA–FLC Centro di ricerca per le produzioni foraggere e lattiero-casearie
Viale Piacenza, 29 –26900 Lodi

Riassunto

La collezione riguarda il batterio *Sinorhizobium* specie *meliloti*, simbiote di erba medica (*Medicago sativa*) e di *Medicago truncatula*. La simbiosi tra *S. meliloti* ed erba medica, con la formazione di noduli radicali fissatori dell'azoto atmosferico, assicura il 43-64% dei fabbisogni azotati della coltura e consente di eliminare quasi del tutto l'apporto di azoto minerale alla leguminosa e di ridurre quello alle colture in successione. Le conoscenze genetiche riguardanti *S. meliloti* sono estese, mentre meno sviluppata, è la ricerca relativa alla risposta di *S. meliloti* agli stress ambientali e quella pertinente le basi molecolari dell'adattamento a fattori limitanti di tipo abiotico. Un approfondimento di questi aspetti è fondamentale per ampliare e stabilizzare la coltivazione di erba medica, e di altre leguminose, in areali caratterizzati da specifici fattori limitanti. Per questi motivi è stata costituita una collezione di *S. meliloti* con lo scopo di rappresentare la variabilità presente all'interno della specie in relazione a fattori geografici, bio-agronomici (caratteristiche del suolo degli ambienti di origine, dell'acqua di irrigazione, ecc.) e alla diversità genetica e fisiologica dell'ospite pianta. La collezione (1450 accessioni totali) è organizzata in quattro sezioni corrispondenti a diverse campagne di collettazione: 1) accessioni di *S. meliloti* nodulanti diverse varietà di erba medica in due suoli italiani; 2) ceppi simbiotici di ecotipi di erba medica dell'oasi di Siwa (Sahara egiziano); 3) ceppi di *S. meliloti* isolati in aree alpine; 4) ceppi simbiotici di ecotipi italiani di erba medica.

Summary

The collection deals with the bacterium *Sinorhizobium* species *meliloti*, the symbiont of alfalfa (*Medicago sativa*) and *Medicago truncatula*. The symbiosis between *S. meliloti* and alfalfa, with the production of root N₂-fixing nodules, accounts for 43-64% of the nitrogen requirements of the crop allowing to eliminate the mineral nitrogen fertilization to the legume and to reduce it for the crops following legume in rotation. *S. meliloti* has been the subject of extensive genetic researches; however, information on the variation of bacterial responses to environmental stimuli and the molecular basis of its tolerance to abiotic stresses is still lagging behind. This knowledge is of importance to extend the cultivation area and to stabilize yield of alfalfa and other legumes in limiting environments. For these reasons we have established a collection of *S. meliloti* with the aim to represent the intraspecific variation in relation to geographical and bio-agronomical (soil and water characteristics, etc.) factors and to the genetic/physiological diversity of the host plant. The collection (1450 total accessions) is divided in four sections corresponding to different collecting missions: 1) *S. meliloti* strains nodulating different alfalfa cultivars in two Italian soils; 2) symbiont strains of alfalfa ecotypes from Siwa oasis (Egyptian Sahara); 3) *S. meliloti* strains isolated in alpine areas; 4) symbiont strains of Italian alfalfa ecotypes.

Parole chiave

Azotofissazione, erba medica, *Medicago truncatula*, simbiosi, *Sinorhizobium meliloti*, stress abiotico

Keywords

Nitrogen fixation, alfalfa, *Medicago truncatula*, symbiosis, *Sinorhizobium meliloti*, abiotic stress

1.1 Presentazione generale della collezione di *Sinorhizobium meliloti*

La collezione riguarda il genere *Sinorhizobium* (sinonimo del genere *Rhizobium*, Franck 1889) specie *meliloti*, simbiote di erba medica (*Medicago sativa* L.) – autotetraploide, allogama, perenne, la più importante leguminosa foraggiera a livello mondiale – e di *Medicago truncatula*

* doi:10.4458/0986-32

– diploide, autogama, annuale, specie modello per le leguminose. La simbiosi tra il batterio *Sinorhizobium meliloti* ed erba medica, che porta alla formazione di noduli radicali fissatori dell'azoto atmosferico, assicura una parte importante (43-64%) dei fabbisogni azotati della coltura e consente di eliminare quasi del tutto l'apporto di azoto minerale alla leguminosa e di ridurre quello alle colture in successione.

Le conoscenze genetiche riguardanti *Sinorhizobium meliloti* sono estese: il genoma (un cromosoma e due megaplasmidi, per un totale di 6.7 Mb) è stato interamente sequenziato nel 2001. I megaplasmidi pSymA (1.35 Mb) - che ospita una parte importante dei geni richiesti per la simbiosi, la N₂-fissazione e il metabolismo dell'azoto - e, in misura inferiore, pSymB (1.68 Mb) sono risultati fra i più coinvolti nella differenziazione intraspecifica di *S. meliloti* (Giuntini *et al.*, 2005).

Sono invece ridotte le conoscenze sulla risposta di *S. meliloti* agli stress ambientali e sulle basi molecolari dell'adattamento a fattori limitanti di tipo abiotico. Un approfondimento di questi aspetti è al contrario fondamentale per ampliare e stabilizzare la coltivazione di erba medica, e di altre leguminose, in areali caratterizzati da specifici fattori limitanti.

Per questi motivi è stata costituita da ISCF e, successivamente, da CRA-FLC di Lodi una collezione di *S. meliloti* rappresentativa della variabilità presente nella specie in relazione a fattori geografici, bio-agronomici (caratteristiche del suolo degli ambienti di origine) e alla diversità genetica e fisiologica dell'ospite pianta (isolamento da varietà/popolazioni di erba medica note e specifiche dell'ambiente di isolamento). Gli ambiti territoriali coinvolti sono a livello regionale, nazionale e internazionale. Una sintesi della collezione è presentata in Tabella 1.

Tabella 1 Numero e origine dei ceppi di *Sinorhizobium meliloti* isolati e conservati presso CRA-FLC Lodi.

Numero accessioni	Origine	Località di isolamento	Anno di isolamento
131 ¹	Italia – Lombardia - Lodi	Lodi	1994-97
135 ¹	Italia – Lazio - Roma	Monterotondo	1994-97
578 ²	Egitto – Gov. di Matruh	Oasi di Siwa	1998
166 ³	Italia – Veneto - Vicenza	Altopiano di Asiago	1999
394 ³	Italia – Piemonte - Torino	Val di Susa	1999
37 ⁴	Italia – Lombardia - Cremona	Stagno Lombardo	2001
7 ⁴	Italia – Lombardia - Pavia	Voghera	2001
3 ⁴	Italia – Toscana - Grosseto	Barbaruta	2001
Tot. 1451			

¹Studio della variabilità genetica di popolazioni di *S. meliloti* nodulanti diverse varietà di erba medica in suoli italiani. ²Studio della variabilità genetica di ecotipi di erba medica e delle rispettive popolazioni simbiotici dell'oasi di Siwa. ³Isolamento di popolazioni di *S. meliloti* in aree alpine. ⁴ Studio della variabilità genetica di ecotipi italiani di erba medica e delle rispettive popolazioni simbiotici.

1.1.1 Studio della variabilità genetica di popolazioni naturali di *S. meliloti* nodulanti diverse varietà di erba medica in suoli italiani.

I ceppi isolati in questo studio sono rappresentativi della dinamica di popolazioni naturali simbiotici di *S. meliloti* in riferimento ad alcuni fattori di variazione: il tipo di terreno – argilloso (Monterotondo), sabbio-limoso (Lodi) -, la varietà di erba medica, la singola pianta entro varietà e il tempo (quattro anni di indagine cioè la durata media di un medicaio).

Materiali

Ceppi isolati da piante singole appartenenti a tre varietà di erba medica, diverse per origine e caratteristiche bio-agronomiche, allevate nei due terreni. Gli isolamenti sono stati effettuati

nell'anno di semina, in tre periodi (primaverile, estivo, autunnale) del primo anno produttivo e alla fine del terzo anno produttivo (Scotti *et al.*, 1997).

Tecnica di isolamento

Le procedure e le tecniche di allevamento e isolamento utilizzate sono le seguenti: uso di microparcelle tubolari doppie (densità equivalente a 500 piante.m⁻²) che permettono l'indagine non distruttiva di parte del sistema radicale (radici secondarie) e dei rispettivi tubercoli (Foto 1); isolamento, a partire dai tubercoli prelevati da una singola pianta, dei ceppi di *S. meliloti*.

Caratterizzazione

La diversità genetica dei ceppi è stata indagata mediante marcatori RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); i ceppi in collezione rappresentano aplotipi RAPD differenti (non ridondanza della collezione). I risultati dell'analisi di diversità genetica delle popolazioni di *S. meliloti* sono stati pubblicati in Carelli *et al.* 2000.

Un ceppo proveniente da questa sezione della collezione è stato incluso in un progetto (JGI-2009 Sequencing Project; coordinatore Dr. E. Biondi, DBE, Università di Firenze) di sequenziamento completo del genoma ad opera del Joint Genome Institute (USA Department of Energy) con lo scopo di chiarire le basi genetiche della variabilità intraspecifica in *S. meliloti*. Due ceppi sono inoltre stati oggetto di un'analisi fenotipica (571 differenti condizioni) mediante 'phenotype microarray' per indagare la variabilità metabolica di *S. meliloti* (Biondi *et al.*, 2009). La variabilità intraspecifica di *S. meliloti* sta emergendo come un campo di indagine essenziale per l'utilizzo di specifici ceppi a scopi agro-ecologici (adattamento a condizioni limitanti, bioremediation, ecc.). In particolare, il ceppo sequenziato ha presentato differenze di caratteristiche biochimiche e fisiologiche e una variabilità del 5-6% di tutte le ORF rispetto al ceppo di riferimento Rm1021.

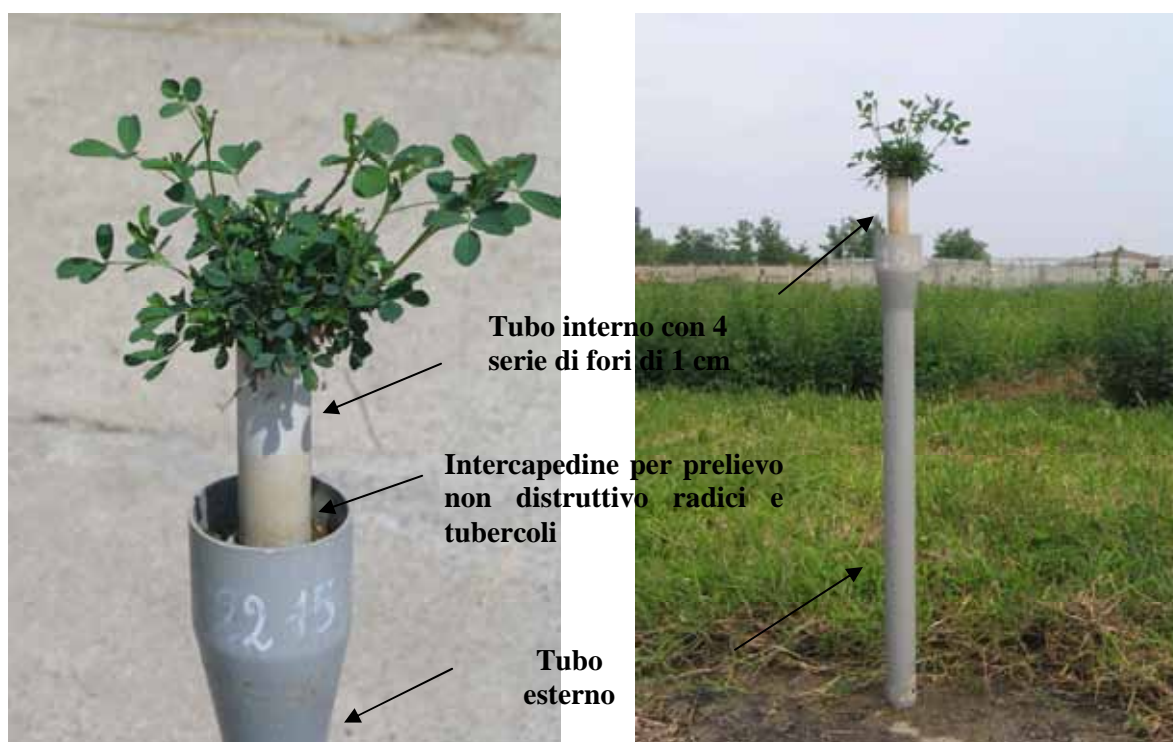


Foto 1 Microparcelle tubolari doppie per il prelievo non distruttivo di radici e tubercoli.

1.1.2 Studio della variabilità genetica di ecotipi di erba medica e delle rispettive popolazioni simbiotiche dell'oasi di Siwa (Egitto)

L'interesse dei ceppi di *S. meliloti* isolati in questo studio è duplice: l'adattamento a specifiche condizioni ambientali e agronomiche, in particolare elevate temperature e salinità dell'acqua di irrigazione e del terreno; la possibilità di studiare in parallelo l'organizzazione della diversità genetica della pianta ospite (erba medica) e del microrganismo simbiote. Infatti, nell'oasi di

Siwa, come in altre oasi sahariane, la coltura di erba medica, e di conseguenza il coadattamento pianta-microorganismo, data da secoli in una situazione di relativo isolamento (Helmy *et al.*, 2002; Carelli *et al.*, 2009).

Materiali

Il seme di 17 popolazioni di erba medica corrispondenti ad altrettante aziende agrarie (ecotipi aziendali o farm landraces) è stato collettato insieme a campioni di terreno e dell'acqua di irrigazione, entrambi analizzati chimicamente. La collettazione è stata effettuata congiuntamente dall'Istituto Sperimentale Colture Foraggere di Lodi (Dr. P. Rotili, Dr.ssa C. Scotti) e dal Field Crops Research Institute di Giza nel 1998 (Foto 2).

Tecnica di isolamento

Mediante 'plant infection technique' a partire da sospensioni/diluizioni del terreno di ogni azienda agraria. Per ogni campione di terreno è stato utilizzato il corrispondente ecotipo aziendale nella 'plant infection technique'.

Caratterizzazione: analisi molecolare di circa 170 ceppi, rappresentativi di 5 aziende con salinità del suolo da elevata a bassa, mediante marcatori ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e analisi ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) di campioni rappresentativi degli aplotipi ERIC individuati.



Foto 2 Coltivazione di erba medica a Siwa: camere irrigate per sommersione (campagna di collettazione ISCF Lodi e Field Crops Research Institute Giza, 1998).

1.1.3 Isolamento di popolazioni di *S. meliloti* in aree alpine

La coltura di erba medica è stata introdotta in due zone alpine, Val di Susa (Torino) e l'altopiano di Asiago (Vicenza), come parte di una sperimentazione tendente a verificare la possibilità di stabilizzare la resa foraggera mediante l'introduzione di prati artificiali mono e oligofiti a sostegno dell'allevamento zootecnico e della trasformazione casearia in alpeggio. L'introduzione di erba medica al di fuori del proprio areale di coltivazione poneva il problema della presenza e dell'adattamento di una popolazione simbiote alle condizioni alpine.

Materiali

I ceppi di *S. meliloti* sono stati isolati da campi sperimentali di confronto varietale. In particolare, i due siti di prelievo dell'altopiano di Asiago si trovano all'altitudine di 986 e 1150 m; i due siti della Val di Susa a 800 e 1207 m. Tutti i medicaï sono di nuova introduzione (assenza della coltura di erba medica in altitudine).

Tecnica di isolamento

Mediante 'plant infection technique' a partire da sospensioni/diluizioni del terreno e utilizzando per ogni prelievo di terreno la corrispondente varietà in prova, e a partire da tubercoli prelevati dalle radici di piante espiantate.

Caratterizzazione

È stata finora effettuata la sola caratterizzazione morfologica delle colonie.

1.1.4 Studio della variabilità genetica di ecotipi italiani di erba medica e delle rispettive popolazioni simbiotici

Gli ecotipi di erba medica hanno rappresentato la forma prevalente di seme certificato in Italia fino al 1998. L'uscita dal mercato del seme degli ecotipi per effetto del D.M. 3 marzo 1995 ha previsto un lavoro di reperimento del seme dalle aziende produttrici ancora presenti nel territorio di ciascun ecotipo, il loro allevamento e studio per l'individuazione delle accessioni effettivamente rappresentative dei vari ecotipi e la loro conservazione presso l'ISCF di Lodi (Rotili *et al.*, 2000). La popolazione simbiotica di questi ecotipi ha un interesse in quanto rappresentativa di una coesistenza di lungo periodo tra i due partners della simbiosi in ambienti bio-agronomici 'vocati'.

Materiali

Ceppi isolati da due zone della bassa Lombardia (province di Cremona e Pavia) a partire dal terreno di medica situati in aziende che producevano il seme di base degli ecotipi Cremonese e Vogherese di erba medica. E' presente anche un campione ridotto (3 isolati) di ceppi provenienti da un'azienda produttrice del seme di base dell'ecotipo Maremmano.

Tecnica di isolamento

A partire da tubercoli prelevati dalle radici di piante espiantate.

Caratterizzazione

È stata finora effettuata la sola caratterizzazione morfologica delle colonie.

1.2 Mantenimento della collezione

Il mantenimento e il rinnovo della collezione, relativamente alla quota di ceppi con più di 5 anni di conservazione, prevedono l'allevamento in piastra su terreno YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar), la purificazione da eventuali contaminanti, il controllo visuale e al microscopio delle colonie/cellule, la verifica a campione del mantenimento della capacità di nodulazione e azotofissazione mediante l'inoculo su plantule di *M. sativa*/*M. truncatula*. Infine, la ricostituzione della coltura 'long-term storage' in duplice copia per la conservazione a -80°C.

1.3 Ringraziamenti

Si ringraziano Annalisa Carenzi, Patrizia Gaudenzi e Roberto Beghi per l'assistenza tecnica in laboratorio e in campo.

1.4 Bibliografia

- Biondi E.G., Tatti E., Comparini D., Giuntini E., Mocali S., Giovannetti L., Bazzicalupo M., Mengoni A., Viti C., 2009. Metabolic capacity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* strains as determined by phenotype microarray analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5396-5404.
- Carelli M., Gnocchi S., Fancelli S., Mengoni A., Paffetti D., Scotti C., Bazzicalupo M., 2000. Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4785-4789.
- Carelli M., Gnocchi G., Scotti C., 2009. Alfalfa germplasm from a Sahara oasis: characterization by means of bio-agronomic traits and SSR markers. *Plant Breeding* 128: 271-277.
- Giuntini E., Mengoni A., De Filippo C., Cavalieri D., Aubin-Horth N., Landry C.R., Becker A., Bazzicalupo M., 2005. Large-scale genetic variation of the symbiosis-required megaplasmid

- pSymA revealed by comparative genomic analysis of *Sinorhizobium meliloti* natural strains. BMC Genomics 6:158.
- Helmy A.A., Abdelhalim A.Z., Scotti C., Sharawy W.M., Abdel-Aziz T.K., Niemeläinen O., 2002. Interaction between strain mixtures of *Rhizobium meliloti* and alfalfa landraces. In: Durand J.L., Emile J.C., Huyghe C., Lemaire G. (eds.). Proceedings of the 19th European Grassland Federation Meeting, La Rochelle 2002, 7: 424-425.
- Rotili P., Gnocchi G., Scotti C., Gnocchi S., 2000. Studio degli ecotipi italiani di erba medica. L'Informatore Agrario 28: 29-33.
- Scotti C., Gnocchi S., Carelli M., 1997. Studio della simbiosi in varietà di erba medica (*Medicago sativa* L.) allevate in terreni diversi. I. Biomassa aerea e radicale e produzione di tubercoli. Riv. Agron. 31, 1 Suppl.: 202-207.

L'ARCHIVIO AEROBIOLOGICO E LA PALINOTECA DEL CRA-CMA*

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Maria Cecilia Serra e Dr.ssa Maria Carmen Beltrano
Con il contributo della Dr.ssa Francesca Greco

CRA-CMA Unità di ricerca per la climatologia e la meteorologia applicate all'agricoltura
Via del Caravita, 7/a – 00184 Roma

Riassunto

L'Unità di ricerca per la climatologia e la meteorologia applicate all'agricoltura (CRA-CMA) svolge attività di ricerca nel settore agrometeorologico e fenologico; proprio nell'ambito del progetto "Phenagri, fenologia per l'agricoltura", risalente alla fine degli anni '90, è nato l'interesse per la palinologia e l'aerobiologia. Il monitoraggio di pollini anemofili rappresenta, infatti, una forma di monitoraggio fenologico e la raccolta sistematica di dati biologici di questo tipo costituisce un elemento di notevole interesse per lo studio delle relazioni tra la crescita dei vegetali e il regime climatico. Il monitoraggio delle spore fungine aerodiffuse, avviato da pochi anni, fornisce, inoltre, informazioni di grande rilievo per lo studio della diffusione delle fitopatologie. Questo è l'aspetto dell'aerobiologia che il CRA-CMA ha approfondito, ma moltissimi altri sono i campi d'interesse di questa recente disciplina, che vanno dalla prevenzione delle allergie a quella delle malattie crittogamiche per la difesa delle colture; dalla difesa dei beni artistici alla criminologia; dalla paleobotanica alla melisso-palinologia e altro.

L'attività di aerobiologia del CRA-CMA è svolta a Roma principalmente presso l'osservatorio del Collegio Romano. Essa ha permesso di raccogliere un notevole archivio di campioni pollinici derivati dal monitoraggio, oltre a spore e altri elementi biologici diffusi nell'atmosfera. Altra collezione di grande interesse è la palinoteca, in via di progressivo accrescimento, che riunisce i campioni di polline delle specie botaniche di interesse agrario e allergologico più diffuse in Italia.

Summary

The research unit for Climatology and Meteorology applied to Agriculture (CRA-CMA) conducts researches in agro-meteorological and phenological field; just within the project "Phenagri, phenology for agriculture", dating from the late 90s, an interest in Palynology and Aerobiology was born. The monitoring of anemophilous pollen is a form of phenological monitoring; systematic collection of biological data is an essential step for the study of the relations between plant growth and climate regime. Moreover, the recent monitoring of windborne fungal spores represents valuable information for studying plant disease diffusion. CRA-CMA has been investigating about the aerobiological studies above described, but many others are the fields of interest of this new discipline ranging from allergies to the prevention of fungal diseases of crops, from defense of the arts to criminology, from paleo-botany to melisso-palynology and more.

The aerobiological monitoring is mainly performed by CRA-CMA at the Collegio Romano station sited in Rome. It has allowed building a huge archive of pollen grains, as well as spores and other biological elements widespread into the atmosphere. The rich pollens-collection carried out by the CRA-CMA is in progress and it collects samples of the most common pollen from plant species of agricultural and allergy interest in Italy.

Parole chiave

Aerobiologia, polline aerodiffuso, spore fungine, stagione allergenica, aero-allergeni, monitoraggio aerobiologico, campionatore volumetrico, previsioni polliniche

Keywords

Aerobiology, airborne pollen, fungal spores, allergenic season, aeroallergen, aerobiological monitoring, spore trap, pollen forecast

* doi:10.4458/0986-41

1 Premessa

Nel monitoraggio della salubrità dell'ambiente, oltre a considerare i fattori chimico-fisici dell'acqua, dell'aria e del suolo, assumono rilevanza anche le contaminazioni atmosferiche. Sono numerose, infatti, le particelle aerodiffuse in atmosfera: alcune di natura abiotica, come il pulviscolo atmosferico, le polveri, il fumo, il particolato e altre, invisibili a occhio nudo, di origine biologica, come polline, spore, acari, alghe, licheni, frammenti di piante, insetti e artropodi. Questi materiali, che costituiscono l'aerosol biologico, possono causare disturbi alla popolazione e danni alle colture agrarie, ai beni artistici e ai monumenti, al pari dell'inquinamento dovuto ad agenti chimici e fisici.

Le componenti di origine biologica presenti in atmosfera sono oggetto di studio dell'**aerobiologia**, una disciplina scientifica relativamente recente, che concerne differenti campi di interesse scientifico e applicativo. Il rilevamento sistematico di materiale biologico disperso in atmosfera è un settore della ricerca e dei servizi in forte espansione, poiché costituisce una fonte di informazioni di particolare interesse per la sanità, l'agricoltura, la tutela dei beni artistici, la criminologia (palinologia forense) e la stessa meteorologia.

In Italia, si occupano di aerobiologia l'Associazione Italiana di Aerobiologia (AIA), con compiti di indirizzo e coordinamento, le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), i Servizi Sanitari, alcune Università, il CNR e alcuni Istituti di ricerca, tra cui il CRA-CMA.

2 Introduzione

Il CRA-CMA svolge attività di ricerca nel settore agrometeorologico e fenologico e, a partire dal 2000, ha avviato l'attività di monitoraggio palinologico che può considerarsi una forma di monitoraggio fenologico. La raccolta sistematica di dati biologici di questo tipo costituisce un elemento di grande interesse per lo studio delle relazioni tra la crescita dei vegetali e il regime climatico e in tal senso costituisce un efficace strumento di analisi ambientale. Esso, infatti, fornendo indicazioni circa lo stadio fenologico della fioritura – in termini di concentrazione di polline nell'aria, consente di integrare le informazioni meteorologiche con quelle legate allo sviluppo delle specie vegetali.

Foto 1 Immagine al microscopio di un campione giornaliero del Collegio Romano (polline di *Cupressaceae* e particolato).

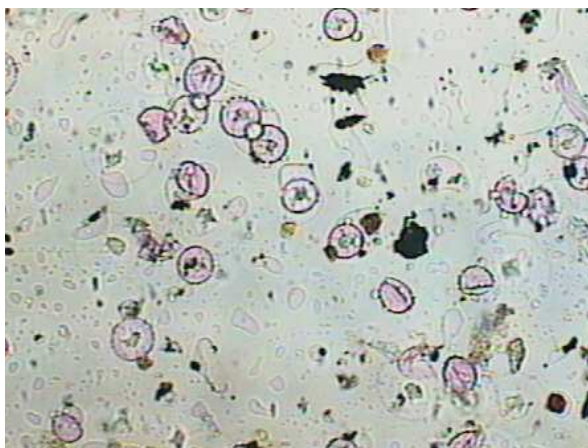


Foto 2 Immagine al microscopio di polline di rosmarino – *Rubiaceae* (palinoteca del CRA-CMA).

L'attività di monitoraggio aerobiologico si svolge principalmente presso l'Osservatorio meteorologico di Roma Collegio Romano, sede del CRA-CMA, e ha consentito di costituire una notevole collezione di campioni pollinici giornalieri (Foto 1), oltre ad un'interessante palinoteca (Foto 2), che, conservata e mantenuta secondo gli standard di conservazione dei reparti biologici, rappresenta un utile strumento di comparazione e verifica per chiunque necessiti di studiare questo tipo di materiale.

2.1 Il polline e le variabili meteorologiche

Per quanto riguarda i pollini presenti in atmosfera, essi sono la manifestazione della flora delle diverse aree geografiche, ma soprattutto delle piante a impollinazione anemofila, che, per la loro riproduzione, liberano notevoli quantità di polline durante il periodo di fioritura: affidando alle correnti atmosferiche grandi quantità di materiale riproduttivo, esse hanno, infatti, migliori probabilità di realizzare l'incontro casuale con il "bersaglio", rappresentato dall'ovulo.

Il contenuto di polline in atmosfera, che si registra giorno per giorno con il monitoraggio, in larga misura è connesso con l'andamento delle condizioni meteorologiche. Le variazioni termiche e di umidità atmosferica influenzano l'apertura delle antere e la diffusione dei granuli pollinici. L'innalzamento della temperatura facilita la liberazione del polline, rendendolo meno ricco di acqua, con minor peso specifico e quindi più leggero e volatile; nelle giornate calde e soleggiate, quando le piante sono asciutte, si ha infatti una concentrazione pollinica più elevata. L'umidità ha la proprietà di far chiudere le antere, causando la ritenzione del polline nella pianta; con l'aumento dell'umidità dell'aria il polline diventa anche più pesante e vola meno. Nelle giornate di pioggia, di nebbia e in quelle con alta umidità relativa la maggior parte dei pollini tende a cadere al suolo; una pioggia breve ma intensa risulta più efficiente nell'abbattere le concentrazioni dei granuli pollinici rispetto a una pioggerella prolungata. I temporali possono trasportare pollini o loro frammenti, soprattutto se sono successivi a periodi asciutti che caricano l'atmosfera di granuli pollinici. Il vento, quando inizia a sollevarsi, aumenta la diffusione del polline; quando invece la sua velocità supera i 12-15 Km orari, i granuli tendono a cadere.

È quindi evidente che le variabili meteorologiche temperatura, radiazione e umidità dell'aria condizionano l'emissione di polline da parte delle piante, mentre precipitazioni e vento ne condizionano il trasporto.

Allo stesso tempo il monitoraggio aerobiologico consente di evidenziare la presenza di specie pioniere o di nuova introduzione, rappresentando un valido strumento di indagine nello studio dei cambiamenti vegetazionali e climatici: per esempio nel nord Italia è stato possibile evidenziare la comparsa e la diffusione di *Ambrosia artemisifolia* L., erbacea infestante, appartenente alla famiglia delle *Compositae*, fortemente allergenica, finora estranea nell'ambiente padano. In questo senso, nelle indagini di carattere ambientale, il monitoraggio aerobiologico è di supporto nella valutazione floristica e della biodiversità vegetale di un sito.

In campo agronomico, il monitoraggio delle spore può essere di aiuto nella gestione eco-compatibile delle malattie crittogamiche; il monitoraggio dei pollini, secondo alcuni autori, costituisce un elemento per la previsione dei raccolti.

Il riconoscimento e la quantificazione dei pollini contenuti nei mieli, la melisso-palinologia, è un'altra applicazione agronomica della palinologia volta alla determinazione della qualità e dell'origine del miele, nonché un'analisi delle frodi.

Il monitoraggio palinologico rappresenta anche uno strumento di analisi e studio della circolazione atmosferica alle basse quote in ambiente urbano, un settore che risulta molto difficile da studiare, a causa della turbolenza creata dalla grande eterogeneità della struttura urbana. Più in generale l'emissione, la diffusione e il trasporto in atmosfera, anche a grandi distanze, di materiale aerodiffuso sono strettamente legati all'andamento meteorologico, pollini, spore, particolato e sabbia rappresentano in questo modo una sorta di traccianti per lo studio della circolazione dell'atmosfera.

2.2 L'aerobiologia e il CRA-CMA

Le informazioni fenologiche sono necessarie per aumentare l'efficacia degli studi di agrometeorologia applicata e per favorire lo sviluppo della modellistica agrometeorologica. Alla necessità di disporre di fonti informative appropriate, provenienti da banche dati agrometeorologiche arricchite costantemente con informazioni fenologiche corrette, omogenee e ben distribuite sul territorio, il Mipaaf negli anni '90 rispose con il finanziamento del progetto "Phenagri: fenologia per l'agricoltura". Il CRA-CMA, allora UCEA, partecipò al progetto curando la realizzazione di una banca dati fenologica e la messa a punto di modelli fenologici. Questi ultimi, applicati in agrometeorologia, permettono di stimare l'evoluzione del ciclo di sviluppo delle colture utilizzando le informazioni climatiche e meteorologiche - in genere molto diffuse sul territorio - per integrare le informazioni fenologiche spesso troppo discontinue nel tempo e nello spazio o addirittura inesistenti.

Dando seguito all'attività avviata con il progetto Phenagri, a partire dal 2000 il CRA-CMA, ha cominciato a interessarsi all'aerobiologia con lo scopo di ampliare le conoscenze nel campo del monitoraggio ambientale, della fenologia e delle ricerche sui cambiamenti climatici. Il monitoraggio aerobiologico, infatti, può fornire indicazioni significative e di facile interpretazione circa la fioritura delle specie vegetali, a sua volta strettamente legata ai regimi termici.

Foto 3 Torre Calandrelli, sede dell'Osservatorio di Roma Collegio Romano. In evidenza, nel cerchio rosso, il campionatore.



L'attività è orientata principalmente a individuare le relazioni tra dati palinologici e dati climatici e va a integrarsi con la pluricentenaria tradizione di monitoraggio meteorologico.

Il CRA-CMA ha avviato il monitoraggio aerobiologico il 1° luglio 2000, con la messa in funzione di un campionatore installato sulla parte sommitale della Torre Calandrelli (Foto 3), sede dell'antico Osservatorio meteo-ologico del Collegio Romano afferente al CRA-CMA. Le sue coordinate geografiche sono 41°53'54" di latitudine Nord, 12°28'46" di longitudine Est da Greenwich e si trova all'altitudine di 56 metri s.l.m., a circa 45 metri dal piano stradale.

Il campionatore (Foto 4), installato a una quota non conforme agli standard AIA, si

trova nel centro della città di Roma e pertanto non riveste un primario interesse agronomico, ma piuttosto assume uno specifico e rilevante interesse per l'allergologia. Infatti, il monitoraggio della circolazione delle particelle aerodiffuse nel contesto urbano è particolarmente utile per la prevenzione delle pollinosi, più frequenti in ambienti antropizzati, laddove all'azione degli allergeni si sovrappone quella degli agenti inquinanti. La stazione, identificata dal codice RM8, dal 2002 è entrata a far parte della Rete Italiana di Monitoraggio in Aerobiologia (RIMA), coordinata dall'Associazione Italiana di Aerobiologia (AIA), contribuendo alle osservazioni aerobiologiche nazionali.



Foto 4 Il campionatore sulla Torre Calandrelli.

Attualmente, il CRA-CMA gestisce anche una seconda stazione di monitoraggio, posta a livello del suolo, nella vicina area archeologica di S. Omobono, ai piedi del Campidoglio (Foto 5), che offre un termine di confronto nel rilevamento palinologico nel centro della città di Roma, a quote diverse.



a



b

Foto 5 Il campionatore installato nell'area archeologica di Sant'Omobono, visto da lontano (a) e da vicino (b).

3 Materiali e Metodi - Verso la realizzazione dell'archivio palinologico

Le procedure adottate dal CRA-CMA nel monitoraggio pollinico seguono pienamente la norma UNI11108-2004 che rappresenta lo standard metodologico utilizzato in tutti i Centri di Rilevamento Aerobiologico italiani. La norma descrive i metodi da adottare nelle fasi di campionamento, preparazione, analisi, elaborazione e archiviazione dei vetrini giornalieri (campioni).

Il metodo di campionamento si basa sulla cattura per impatto di particelle aerodiffuse su una superficie viscosa, attraverso l'aspirazione di un volume d'aria noto. La superficie di campionamento viene successivamente esaminata al microscopio ottico per l'identificazione ed il conteggio delle particelle catturate.

I risultati dell'elaborazione sono successivamente archiviati nella banca dati nazionale RIMA dell'AIA per la produzione di bollettini aerobiologici a livello nazionale. I vetrini, a loro volta, sono ordinatamente archiviati a formare la collezione di campioni aerobiologici.

3.1 Il campionamento

Il primo passo per costituire la raccolta di vetrini è la raccolta del materiale aerodiffuso mediante l'attività di monitoraggio. Lo strumento utilizzato al CRA-CMA è un campionatore volumetrico (pollen trap) di costruzione italiana il *Volumetric Pollens Particles Sampler (VPPS) 2000 Lanzoni* (Tabella 1) o captaspore, programmato per la raccolta di particelle aerodiffuse comprese fra 2 e 200 micron. Il raggio d'azione dello strumento è di circa 10-15 km.

Tabella 1 Dati tecnici campionatore

Scheda tecnica Campionatore Lanzoni VPPS 2000	
Materiale	alluminio e acciaio
Peso	kg 20
Dimensioni:	76 x 100 x 65,5
pompa aspirante	centrifuga, a doppio stadio
alimentazione elettrica	220 Volt, 50 Hz
Assorbimento	30 Watt

L'apparecchio consta di quattro parti fondamentali:

- pompa aspirante
- fenditura di aspirazione
- superficie di deposizione (tamburo)
- dispositivo di avanzamento della superficie.



a



b

Foto 6 Il flussimetro montato sulla fenditura di aspirazione del campionatore (a) e particolare (b).

Il campionatore è costituito da un involucro esterno in lega leggera, resistente agli agenti atmosferici. La base dello strumento è fissa e al suo interno è alloggiata una pompa aspirante a flusso costante (10 litri d'aria / minuto) alimentata elettricamente, che simula la respirazione umana.

Il flusso di aria da campionare viene prelevato dalla pompa e indirizzato sul tamburo su cui è fissato il nastro di plastica trasparente trattato, che funge da superficie di deposito delle particelle aspirate. È necessario che lo strumento sia corredato di un flussimetro specifico (Figure 6a e 6b) che lavora in depressione, per controllare la corretta portata di campionamento, da cui dipende il buon funzionamento dello strumento.

La parte superiore del campionatore è mobile; essa contiene sulla parete esterna, la fenditura di aspirazione (dimensioni 2 x 14 mm), orientata controvento da una banderuola e protetta da una visiera parapioggia sovrastante. All'interno, in corrispondenza della

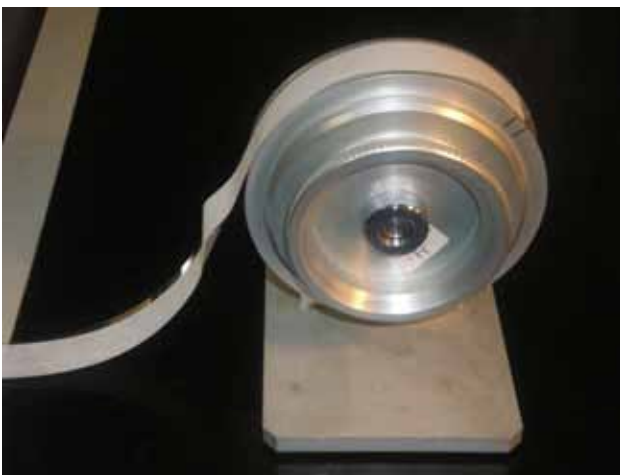
fenditura, si trova il tamburo di campionamento (Foto 7), di 110 mm di diametro che, montato su un meccanismo a orologeria, avanza alla velocità di due mm/h (un giro completo in una settimana).



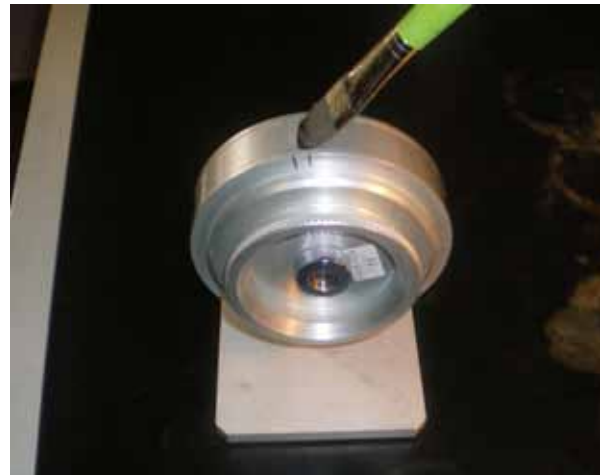
Foto 7 Il meccanismo a orologeria del campionatore.

Il nastro di campionamento adagiato sulla superficie del tamburo è in Melinex (poliestere trasparente) e viene ricoperto da una soluzione al 3% di fluido al silicone in tetracloruro di carbonio, per renderlo viscoso e facilitare la cattura delle particelle (Foto 8).

Foto 8 Le fasi di preparazione del nastro di campionamento. Montaggio del nastro (a) e distribuzione della soluzione di silicone in tetracloruro di carbonio (b).



a



b

La soluzione va distesa uniformemente con un pennello morbido e piatto, di 15 mm di larghezza abbondantemente intriso, passando sul nastro una sola volta lentamente. Il nastro così preparato viene montato in modo da aderire perfettamente al sistema di trascinamento per evitare variazioni di efficienza di campionamento causate dalla non uniformità della distanza fra il nastro e la fenditura che provocherebbe quindi variazioni del flusso d'aria. Il tamburo viene posizionato in modo che l'inizio del nastro si venga trovare in corrispondenza della fenditura di aspirazione. Una volta alla settimana il tamburo viene rimosso e sostituito con uno nuovo opportunamente preparato (Foto 9).



Foto 9 Il cambio del nastro di campionamento.

3.2 La preparazione dei campioni

Alla fine della settimana di campionamento, il nastro viene rimosso dal tamburo, adagiato su di una taglierina (cutting block) (Foto 10) e suddiviso con opportuni accorgimenti in 7 segmenti di 48 mm; ognuno di essi corrisponde a un campione giornaliero, ogni segmento di 2 mm corrisponde a un'ora.



Foto 10 Preparazione dei campioni di monitoraggio: la taglierina e il vassoio porta vetrini.

I campioni giornalieri vengono successivamente montati su normali vetrini da microscopio, sui quali è applicata un'apposta piccola etichetta di identificazione. Il vetrino viene colorato con fucsina basica a caldo (Foto 12) , fissato con gelatina glicerinata e coperto con un copri-oggetto.



Foto 11 La Piastra termostatata.



Foto 12 I vetrini in preparazione.

Tutta l'operazione di preparazione viene eseguita su una piastra termostatata (Foto11) mantenendo il vetrino a temperatura sufficientemente elevata (40-50 °C) per favorire la fluidità della gelatina e l'eliminazione delle bolle d'aria. Il vetrino viene lasciato asciugare in posizione orizzontale per qualche ora prima di effettuare i conteggi al microscopio. In questo modo il campione rimane inglobato fra due strati di gelatina e due vetrini (Foto 13).

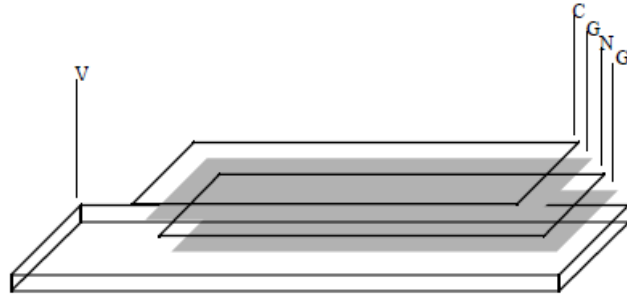


Figura 1 Preparazione del campione giornaliero: il nastro di campionamento (N), rimane inglobato fra due sottili strati di gelatina glicerinata (G) posti sul vetrino portaoggetto (V) e sotto il vetrino copri oggetto (C). (Fonte: Norma UNI11108-2004).

Le lenti del microscopio, i vetrini copri- e porta-oggetto, la gelatina glicerinata e il nastro campionato hanno lo stesso indice di rifrazione per ridurre la dispersione della luce e ottenere così una buona visione.

3.3 L'esame dei campioni

I campioni così preparati sono pronti per la lettura del vetrino al microscopio ottico (Foto 13), volta al riconoscimento e alla conta del materiale aerobiologico (Foto 14 e 15).



Foto 13 Il microscopio e il computer dedicati all'analisi dei campioni aerobiologici.

Il conteggio dei granuli pollinici non viene generalmente effettuato sull'intera superficie di campionamento di 14x48 mm, ma su una frazione dell'intero deposito di particelle (conteggio statistico). Il vetrino viene esaminato su linee orizzontali parallele (lato maggiore del vetrino) con la tecnica dei campi di microscopio tangenti fra di loro o del campo di microscopio continuo (Figura 2). La Norma UNI11108-2004 stabilisce di effettuare la lettura su linee orizzontali in quanto la variazione di concentrazione durante il giorno avviene lungo questo asse (senso di scorrimento del nastro nel campionatore).



Foto 14 Campione di monitoraggio aerobiologico primaverile: è presente una grande varietà di materiale: particolato, frammenti di insetti, spore e pollini di diverso tipo.



a



b

Foto 15 Materiale biologico osservato al microscopio a 10 (a) e 40 (b) ingrandimenti: particolare di zampa di un insetto e due granuli pollinici di camomilla.

Il numero minimo di linee orizzontali di lettura deve corrispondere a una superficie pari a non meno del 20% della superficie campionata (Figura 2).

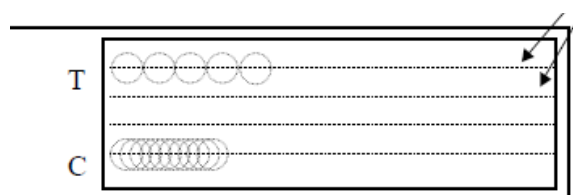


Figura 2 Il conteggio dei granuli pollinici viene effettuato sul vetrino in modo statistico: la lettura avviene infatti su un certo numero di linee trasversali (L) lunghe 48 mm, su campi di microscopio tangenti (T) o su strisciata continua (C) come mostrato in figura. (Fonte: Norma UNI 11108-2004).

I campioni del Collegio Romano vengono esaminati con il metodo della strisciata continua sul 20% della superficie del vetrino, che in dettaglio consiste nelle seguenti operazioni:

- effettuare la conta in tutto il campo osservato;
- traslare da destra verso sinistra il vetrino mediante rotazione continua della vite micrometrica;
- leggere progressivamente senza fermarsi tutte le diverse strisciate.

Il riconoscimento avviene utilizzando solitamente l'obiettivo 40x e l'oculare 10x. Il metodo

adottato permette di esaminare l'intera striscia del campione, poiché l'area esaminata corrisponde a un rettangolo con lato maggiore pari alla lunghezza della strisciata e il lato minore pari al diametro del campo di microscopio. La posizione delle linee orizzontali osservate è distribuita uniformemente e non coincide mai con i bordi superiore e inferiore della superficie di deposizione. Le particelle prese in considerazione nell'analisi aerobiologica sono i pollini e le spore fungine (Foto 16), ma sui vetrini si depositano anche altre particelle biotiche e non, quali granuli di sabbia, piccoli insetti, particelle di smog, frammenti vegetali e animali.

I pollini e le spore sono identificati e contati con l'ausilio di due conta-cellule manuali (Foto 17) che servono a conteggiare contemporaneamente più tipi di polline e spore.



Recentemente, per semplificare la procedura di conteggio delle particelle, gli informatici del CRA-CMA hanno messo a punto un software che permette all'operatore di utilizzare un terzo conta cellule informatizzato. I totali delle conte, suddivisi per specie, vengono riportati su un modulo di conteggio, con lo scopo finale di calcolare il valore medio giornaliero di ciascun tipo di polline. Lo stesso schema di lettura permette di ricavare i valori di concentrazione media oraria predisponendo opportunamente il sistema di annotazione dei risultati di ciascuna lettura.

Foto 16 Esempio di immagine fotografica catturate con il Sistema Axiovision: una spora di *Alternaria* e un granulo di polline di *Urticaceae*, in presenza di particolato.



Il Laboratorio aerobiologico è fornito anche di un sistema Axiovision (videocamera e computer dedicato) (Foto 13) che permette di fotografare le immagini al microscopio e di effettuare la loro archiviazione informatizzata.

Foto 17 Conta-cellule manuali impiegati per la conta dei pollini e delle spore.

3.4 L'elaborazione e l'archiviazione dei dati

La concentrazione delle particelle aerobiologiche, distinta per famiglia e talvolta anche per genere botanico di appartenenza, viene calcolata a partire dalle conte microscopiche, utilizzando specifici coefficienti di conversione che dipendono dalle caratteristiche del microscopio utilizzato.

Alla concentrazione dei pollini aerodiffusi, espressa in granuli/m³ die, viene associata la relativa valutazione (alta, media, bassa), facendo riferimento alla classificazione proposta a livello nazionale dall'A.I.A. (quantità di polline prodotto dalle diverse famiglie botaniche in funzione del loro ciclo biologico di sviluppo). Va sottolineato che, comunque, la suddivisione in classi non identifica il valore soglia scatenante una reazione allergica.

I valori di concentrazione settimanalmente vengono archiviati nel database del CRA-CMA dove sono disponibili per le successive analisi ed elaborazioni. Inoltre sono archiviati nella

banca dati nazionale RIMA dell'AIA e resi disponibili alla comunità sul sito <http://www.ilpolline.it/la-rete-di-monitoraggio/>. I vetrini vengono anch'essi ordinatamente archiviati.

4 Risultati

Il monitoraggio aerobiologico viene svolto durante tutto l'anno e permette di ricavare sia dati qualitativi che quantitativi relativi ai principali pollini e spore, d'interesse non solo allergenico, fornendo la base informativa necessaria per compiere studi e ricerche sui pollini aerodiffusi nell'area romana, elaborare i dati e analizzarli in funzione delle condizioni meteorologiche osservate nel periodo di monitoraggio. A titolo d'esempio si riportano in Figura 3 i risultati di un'analisi compiuta nel mese di febbraio del 2009.

L'elaborazione dei dati del monitoraggio svolto dal 2000 al 2010 ha permesso, tra l'altro, di predisporre il calendario pollinico per la città di Roma.

I dati del monitoraggio pollinico sono principalmente diffusi mediante bollettini che vengono aggiornati e pubblicati con cadenza periodica in diversi formati. Si tratta in estrema sintesi di bollettini settimanali, che forniscono un quadro di tendenza delle concentrazioni polliniche e sporologiche nell'aria e di bollettini annuali che presentano elaborazioni e risultati di analisi statistiche.

La raccolta dei campioni giornalieri ha costituito nel tempo l'attuale archivio dei vetrini aerobiologici dell'osservatorio di Roma Collegio Romano e di Roma- Sant'Omobono.

Una collezione a parte è rappresentata dalla palinoteca, raccolta di pollini delle principali specie vegetali diffuse in Italia.

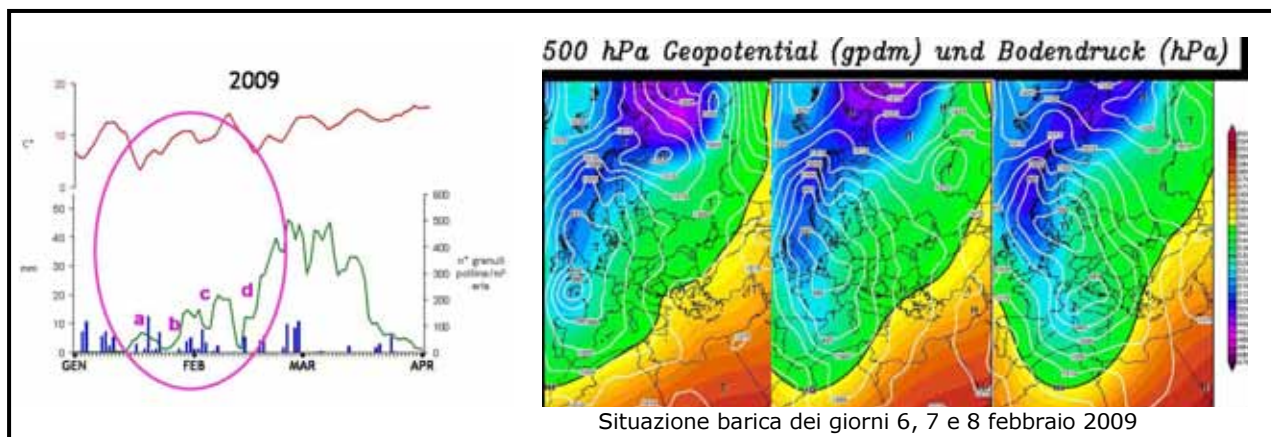


Figura 3 L'influenza delle condizioni meteorologiche sulla diffusione dei pollini rilevati all'osservatorio di Roma- Collegio Romano nel febbraio 2009.

Un primo accenno di aumento di polline si è verificato il 18 Gen. (a) in concomitanza dell'aumento di temperatura (T) che però viene immediatamente interrotto da 6 giorni di pioggia (il mese è stato molto piovoso: 109 mm di pioggia, +50% della media mensile, distribuiti in 18 giorni). La stessa situazione si presenta i primi di febbraio: T in aumento, concentrazione polline in aumento (b), ma 6 giorni consecutivi di pioggia e una diminuzione di T abbassano i valori di concentrazione di polline (c). La 2^a decade di febbraio è caratterizzata da un ritorno del freddo che si protrae per 20 giorni con rischio gelate, ma la diffusione dei pollini è in crescita (d): i microsporofilli del Cipresso sono maturi e il processo riproduttivo è ormai avviato.

4.1 I Bollettini aerobiologici

Il bollettino aerobiologico pubblicato sul sito web <http://www.cra-cma.it/Pollini/> (Figura 4) fornisce, con aggiornamenti settimanali, le informazioni circa la concentrazione di particelle aerobiologiche disperse in atmosfera nel centro della città di Roma.

Nel bollettino, ciascuna tipologia di polline e spora viene rappresentata con uno specifico simbolo che ne indica l'andamento (aumento, stazionarietà, diminuzione) ed è associata a uno specifico colore (giallo = bassa, arancione = media, rosso = alta) che ne indica la concentrazione.

Il bollettino, strumento di informazione sul monitoraggio e sulla tendenza delle concentrazioni dei principali pollini allergenici e non, risulta di particolare interesse per medici e farmacisti, per effettuare una programmazione degli interventi preventivi e terapeutici, ma anche, e soprattutto, per i soggetti allergici che, conoscendo il periodo di fioritura delle piante responsabili delle manifestazioni allergiche, possono adottare modalità comportamentali adeguate o ad esempio, programmare le proprie vacanze in zone o località o periodi in cui la concentrazione del polline sia bassa.

A partire dal 2006, il bollettino con i dati palinologici rilevati all'osservatorio di Roma Collegio Romano è pubblicato anche sulla bacheca elettronica posta al portone d'ingresso del CMA, dove è attivo un sistema di visualizzazione in tempo reale dei dati della stazione meteorologica automatica del Collegio Romano.

La divulgazione di dati aerobiologici presentati in forma chiara e invitante è molto apprezzata dal pubblico, rappresentato dai passanti che si soffermano con curiosità davanti al monitor.



Figura 4 Esempio di bollettino aerobiologico settimanale di Roma Collegio Romano.

A partire dall'anno 2001, un resoconto palinologico annuale, in forma di appendice, è stato inserito nella pubblicazione annuale "Bollettino meteorologico del Collegio Romano", disponibile sia in formato cartaceo sia sulle pagine web del sito del CRA-CMA.

A partire dal 2008, l'appendice si è arricchita di una serie di elaborazioni grafiche che rappresentano visivamente l'andamento delle principali quantità di spore fungine e della concentrazione di polline nei diversi mesi dell'anno e la correlazione tra le grandezze meteorologiche e le concentrazioni polliniche al centro di Roma (Figure 5, Figura 6).

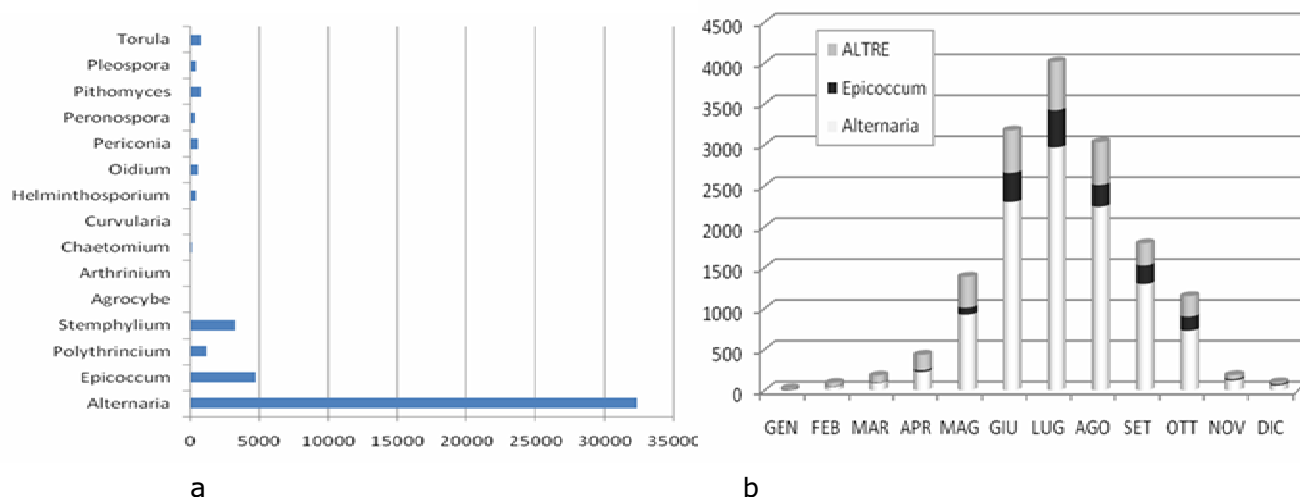


Figura 5 Esempi di analisi quantitativa delle spore fungine che si riferiscono all'anno 2010: a) numero di spore rilevate per genere fungino; b) quantità di spore fungine per singolo mese, riscontrata durante l'anno, evidenziando quella dei generi *Alternaria* ed *Epicoccum* (dal "Bollettino meteorologico annuale del Collegio Romano").

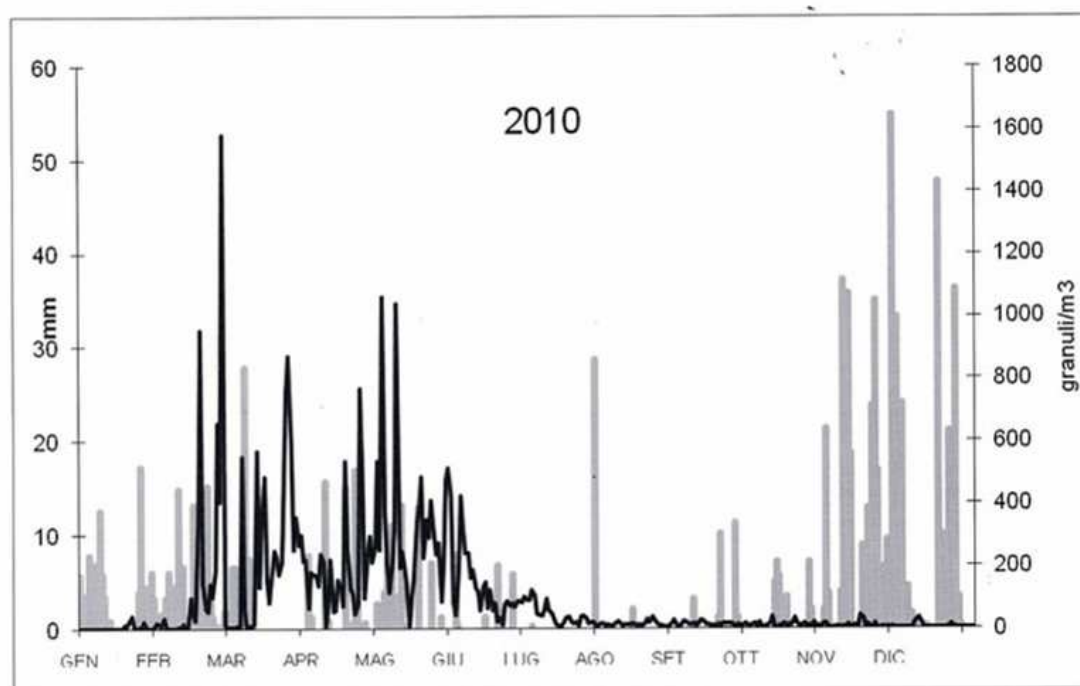


Figura 6 Concentrazione di polline totale (curva nera) e precipitazione giornaliera (istogramma in grigio) che si riferiscono all'anno 2010 (dal "Bollettino meteorologico annuale del Collegio Romano").

4.2 Il Calendario pollinico

L'elaborazione dei dati aerobiologici effettuata a partire dal conteggio giornaliero dei pollini di dieci anni alla stazione del Collegio Romano (2001-2010) ha consentito di mettere a punto il Calendario pollinico relativo alla stessa stazione di monitoraggio (Figura 7).

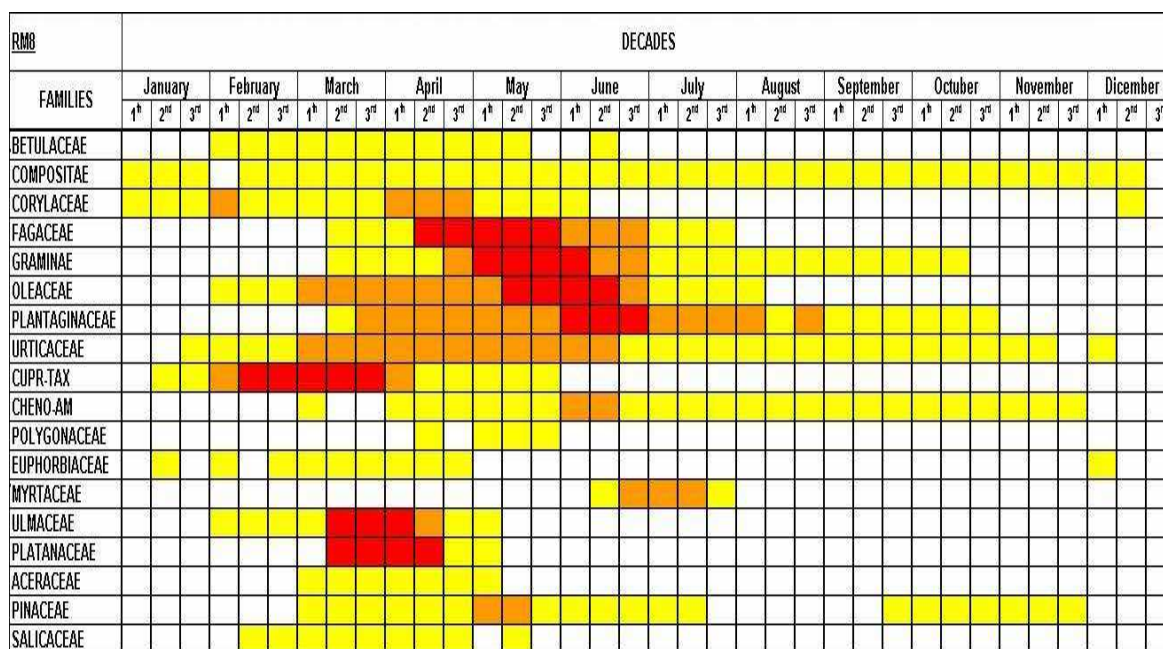


Figura 7 Il calendario pollinico di Roma - Collegio Romano (stazione RM8 della Rete di monitoraggio aerobiologico dell'AIA).

Il calendario pollinico è uno strumento di informazione circa le concentrazioni polliniche delle principali famiglie aerodiffuse durante l'intero arco dell'anno. Esso ha connotazioni strettamente locali e cambia da regione a regione; fornisce indicazioni di carattere generale poiché il periodo di pollinazione può variare significativamente da anno in anno; tuttavia costituisce un termine di riferimento per determinare l'andamento delle concentrazioni di polline in ciascuna decade dell'anno. Specifici colori indicano la concentrazione media di polline aerodiffuso in ogni decade (giallo = bassa, arancione = media, rosso = alta).

4.3 La collezione dei vetrini di monitoraggio aerobiologico

La raccolta dei vetrini microscopici rappresenta la collezione aerobiologica del CRA-CMA. Essa è costituita da circa 5100 campioni giornalieri relativi all'Osservatorio del Collegio Romano (rilevamenti del periodo 2000-2011) e da circa 1.600 campioni relativi alla stazione di monitoraggio di Sant'Omobono.

La collezione è in progressivo aggiornamento poiché l'attività di monitoraggio è costante e continua nel tempo.

I vetrini, ciascuno etichettato con la data di rilevamento e il nome della stazione, come già detto, sono conservati in appositi contenitori che contengono ciascuno 100 campioni. Essi sono sistemati cronologicamente e i contenitori sono a loro volta regolarmente custoditi in un armadio dedicato. Le scatole porta-vetrini sono ordinatamente collocate in assetto verticale per garantire la qualità di conservazione dei reperti che, in questo modo, si trovano a essere mantenuti in piano e non rischiano di rovinarsi.

La collezione è fruibile per svolgere studi sui dati dei campioni.

4.3.1. Principali tipi di spore rilevate dal campionatore.[†]

Alternaria

Presente ovunque, contribuisce alla decomposizione del materiale organico, parassita su alberi da frutto, fiori, cereali, pomodori, etc.

Il distacco delle spore avviene a una temperatura di 25-28° C nel periodo estivo, tra giugno e settembre. I conidi hanno dimensioni da 20 a 500 µm di lunghezza e tra 9-13 µm di larghezza.



Stemphylium

è tra i funghi allergenici cosmopoliti più comuni.

Le ife sono settate e filamentose; i conidiofori possono essere semplici o ramificati e settati;

I conidi sono multicellulari, con setti trasversali e verticali, di colore marrone chiaro, oblungi, arrotondati alle estremità, ellissoidali o subsferici, lisci o in parte verrucosi.



Cladosporium

Genere cosmopolita estremamente diffuso.

Temperatura ottimale 18 – 28°C, ma resistono anche sotto lo zero. Colonizza substrati vegetali contenenti cellulosa, pectina e lignina, e ortaggi.

I conidi di forma lenticolare, solitari o riuniti in catene hanno dimensioni da 10 a 40 µm di lunghezza e tra 5-8 µm di larghezza.



4.4 La palinoteca

Per gli studi di palinologia è importante disporre di una raccolta di pollini - la palinoteca - delle diverse piante che caratterizzano la vegetazione di un territorio per coadiuvare l'identificazione e il riconoscimento delle diverse forme di pollini: essa è in definitiva una collezione di vetrini contenenti ciascuno una tipologia pollinica appartenente a un singolo genere botanico. La palinoteca del CRA-CMA è nata con lo scopo di disporre, in laboratorio, di reperti di ciascuna tipologia pollinica, quali termini di confronto per il riconoscimento certo delle tipologie di polline presenti nei vetrini dei campioni.

La collezione è stata creata raccogliendo per ogni singola specie il polline nel periodo di fioritura. Per la sua realizzazione sono stati effettuati ripetuti sopralluoghi all'orto botanico di Villa Corsini a Roma, nei parchi, in campagna, al fine di raccogliere campioni di polline direttamente dalle piante, identificate con certezza. La palinoteca è in continuo aggiornamento.

L'allestimento di preparati microscopici è stato eseguito in laboratorio, in ambiente chiuso e non contaminato. Alcuni vetrini, preparati direttamente sul campo, sono stati scartati dopo l'osservazione microscopica, perché risultavano inquinati da tipologie polliniche diverse da quella che si voleva campionare.

In laboratorio, i vetrini sono stati preparati spargendo su di essi piccole quantità di polvere pollinica e alcune gocce di glicerina con fucsina per la loro colorazione. Successivamente, si è posto il vetrino copri-oggetto lasciandolo riscaldare sulla piastra termostata per facilitare la reazione del colorante, come si usa per i vetrini del monitoraggio.

La palinoteca è costituita da circa 150 pezzi tutti conservati in apposite scatole, poste in assetto verticale per garantire la corretta conservazione dei reperti (Foto 8).

[†] Le immagini delle spore hanno dimensioni non rapportate all'ingrandimento generalmente utilizzato.

Il materiale conservato è fruibile e può essere messo a disposizione di chiunque richieda di visionarlo per fini di studio.

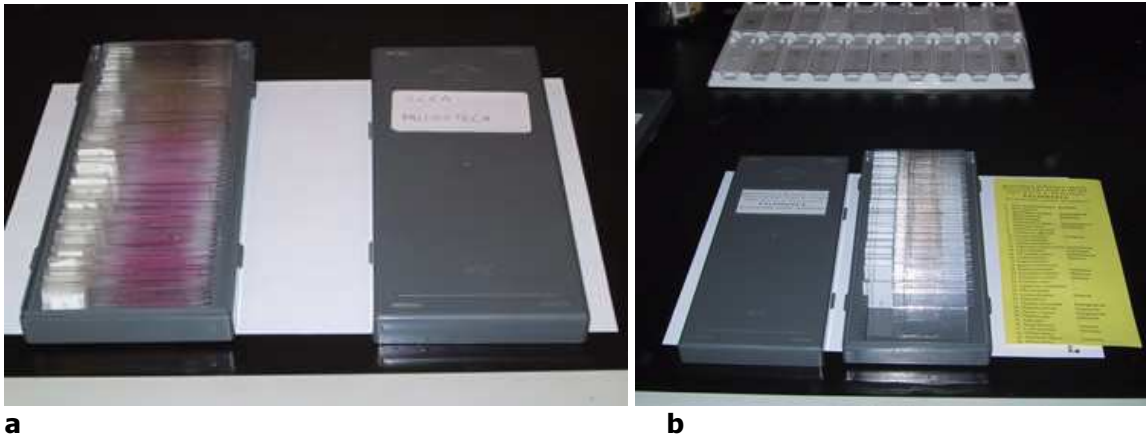


Foto 8 Le custodie e i vetrini della palinoteca (a, b).

4.4.1 Principali pollini presenti nella palinoteca[†]

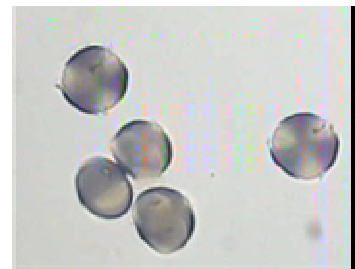
Fam. *Aceraceae*

Acer sp. pl.: (Acer)

A. negundo (acero americano), *A. pseudoplatanus* (acero montano), *A. campestre* (acero campestre, loppio, albero da vite)

Fioritura: da marzo ad aprile.

Polline: isopolare, suboblato, dimensioni medio-piccole (23-28 μm), trizono-colpato. Esina rugulata; colpi larghi e lunghi, area polare ristretta. Allergenicit  bassa.



Fam. *Araliaceae*

Hedera helix L. (Edera)

Fioritura: autunnale, da settembre ad ottobre.

Polline: isopolare, subtriangolare in visione polare, depresso ovale in visione equatoriale. Tricolporato, poro lalongato, colpo a margini acuti; esina semitectata-reticolata-eterobracata, intina sottile citoplasma granuloso.



[†] Le immagini dei pollini hanno dimensioni non rapportate all'ingrandimento generalmente utilizzato.

Fam. *Betulaceae*

Alnus sp. pl.: (Ontano)

A. Glutinosa (O. nero o comune), *A. incana* (O. bianco), *A. cordata* (O. napoletano)

Fioritura: nel periodo febbraio-aprile.

Polline: isopolare, oblato o suboblato, dimensioni piccolo-medie (22-34 μm), tetra-pentozonoporato, esina microechinata e ispessita intorno ai pori a formare aspidi; l'intina forma onci convessi sotto i pori. Allergenicit  molto alta.



Betula alba Ehrh. (Betulla)

Fioritura: da marzo fino a maggio.

Polline: trizonoporato isopolare, suboblato, dimensioni piccolo-medie (18-28 μm) pori sporgenti, vestibolati. Esina microechinata ed ispessita intorno ai pori a formare aspidi. Intina forma onci lievemente convessi sotto i pori. Allergenicit  molto alta.



Fam. *Casuarinaceae*

Casuarina equisetifolia Forster. (Casuarina)

Fioritura: da agosto ad ottobre.

Polline: isopolare, oblato, subtriangolare in visione polare, isopolare in visione equatoriale. Porato; poro con aspidi; esina tectato-scabrata; intina sottile, citoplasma liscio.



Fam. *Compositae*

Artemisia sp. pl.: (Artemisia, Assenzio)

Erba perenne aromatica cresce nelle zone ruderali, nei prati e lungo i margini delle strade.

Fioritura: fra agosto e settembre.

Polline: trizonocolporato, isopolare, piccolo (18-24 μm). Esina microechinata, ispessita nella parte mediana del mesocolpium. Area polare piccola. Allergenicit  molto alta.



Helianthus annuus L. (Girasole)

Pianta annuale coltivata per la produzione dei semi oleosi.

Fioritura: tra giugno e luglio.

Polline: isopolare, di forma oblato sferoidale, subcircolare in veduta polare, ovale in visione equatoriale; tricolporato, pori circolari, colpo con spigoli vivi e apice appuntito. Esina tectato-echinata-perforata, intina sottile, citoplasma liscio.

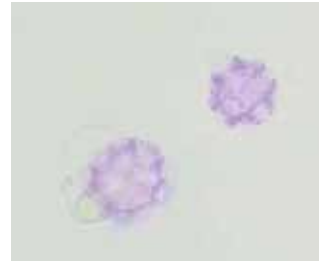


Taraxacum officinale Weber (Tarassaco)

Pianta erbacea infestante.

Fioritura: da aprile a maggio.

Polline: isopolare, di forma sferoidale, subtriangolare in visione polare, ovale schiacciato in visione equatoriale; tricolporato, pori circolari, colpi con margini acuti e apici arrotondati; esina tectato-fenestrata, intina sottile, citoplasma granuloso.

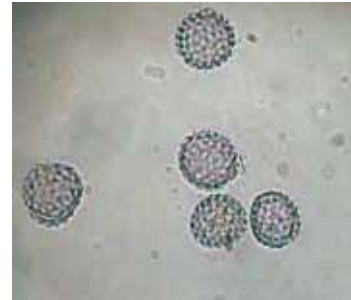


Ambrosia sp. pl. (*A. Artemisiifolia*, *A. coronopifolia*, *A. maritima*) (Ambrosia)

Pianta infestante di nuova introduzione (origine nord America). Cresce in zone ruderali, margini di strade e ferrovie. Molto presente in Lombardia, habitat su terreno alluvionale tra Lago Maggiore e l'interland milanese.

Fioritura: dalla seconda metà di luglio a settembre.

Polline trizonocolporato, isopolare, oblato-sferoidale, piccolo (15-24 μm). Colpi corti, area polare estesa. Esina echinata. Allergenicità molto alta.



Fam. Corylaceae

Corylus avellana L. (Nocciolo)

Fioritura: può iniziare già a dicembre e si protrae fino all'inizio di marzo.

Polline: isopolare, suboblato, piccolo (19-28 μm). trizonoporato, pori visibili sulla linea perimetrale, goniotrema in visione polare. Intina sottile forma onci convessi sotto i pori. Esina scabrata microechinata. Allergenicità molto alta.



Carpinus betulus L. (Carpino bianco)

Fioritura: dai primi di aprile alla fine di maggio.

Polline: isopolare, oblato-sferoidale, dimensioni medie (30-43 μm). Tri-tetra-pentazonoporato, pori con opercoli. Esina psilato-scabrata, sottile con ispessimenti attorno ai pori. Intina forma onci grandi poco convessi. Allergenicit  molto alta.



Ostrya carpinifolia Scop. (Carpino nero)

Fioritura: dagli inizi di aprile alla fine di maggio.

Polline: isopolare, oblato-sferoidale, dimensioni piccole (19-29 μm); tri-tetrazonoporato, pori con opercoli. Esina granulata, Intina ispessita forma onci. Allergenicit  molto alta.

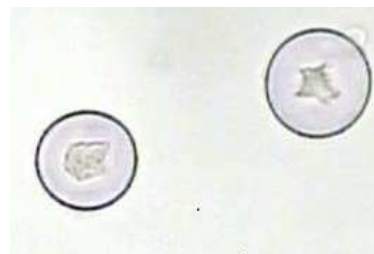


Fam. Cupressaceae-Taxaceae

Cupressus sempervirens L. (Cipresso)

Fioritura: da fine inverno, si protrae per tutta la primavera.

Polline: apolare, sferoidale, dimensioni medio piccole (25-30 μm), monoporato-inaperturato. Esina sottile, psilata, con granulazioni in gruppi irregolari. Il citoplasma, represso al centro, assume forma stellata. Allergenicit  molto alta.



Taxus baccata L. (Tasso)

Fioritura: da marzo a maggio

Polline: apolare, sferoidale, dimensioni medie (20-28 μm). Inaperturato, esina sottile, psilata con granulazioni in gruppi irregolari. Il citoplasma, represso al centro, assume forma stellata. Allergenicit  molto alta.



Fam. Euphorbiaceae

***Mercurialis annua* L.** (Mercorella)

Erbacea infestante, diffusa nei luoghi incolti, boschi e coltivi.

Fioritura: da maggio a ottobre.

Polline: isopolare, subprolato o sferoidale, piccolo (18-25 μm), trizonocolporato. Colpi lunghi ad apici acuti. Isola sexinica sulla membrana colpale. Pori con margine sporgente e labiato. Area polare piccola. Esina con sculturazione \square icro reticolata. Allergenicit  bassa.



Fam. Fagaceae

Quercus sp.pl: (Quercia) *Q. ilex* L. (Leccio), *Q. cerris* L. (Cerro), *Q. suber* L. (Sughera), *Q. pedunculata* Ehrh (Farnia), *Q. pubescens* (Roverella), *Q. petraea* (Rovere), *Q. frainetto* (Farnetto), *Q. coccifera* L. (*Q. spinosa*).

Fioritura: da aprile a maggio.

Polline: isopolare, oblato-sferoidale, medio-piccolo (20-30 μm). trizonocolpato, colpi lunghi con membrana colpale sporgente, apici acuti, area polare estesa. Pori con margine sporgente e labiato. Allergenicit  bassa.



***Castanea sativa* Mill.** (Castagno)

Fioritura: tra giugno e luglio.

Polline: isopolare, subprolato, piccolo (11-16 μm), trizonocolporato. Esina sottile, rugulata; circolare in visione polare; colpi sottili e lunghi; area polare piccola. Allergenicit  bassa.



Fam. Poaceae o Gramineae (*nomen conservandum*)

Famiglia botanica con numerosissimi generi e specie di piante erbacee, diffusa in ogni fascia climatica: forma praterie, steppe, savane, coltura per l'alimentazione umana e del bestiame.

Fioritura: da aprile a fine estate.

Polline: eteropolare, dimensioni medie (25-40 μm); monoporato, il poro è generalmente circolare, circondato da un anulus e coperto da un opercolo. Esina granulata o scabrata con elementi riuniti a gruppi. Intina più spessa dell'esina, soprattutto sotto il poro. Allergenicità alta.



Fam. Hippocastanaceae

Aesculus hippocastanum L. (Ippocastano)

Grande albero ornamentale.

Fioritura: tra aprile e giugno.

Polline: di forma prolato-sferoidale, subcircolare in visione polare, subovale in visione equatoriale. Tricolporato; poro circolare, colpo a margini irregolari e residui di esina; esina tectato-psilata; intina sottile, citoplasma liscio.



Fam. Juglandaceae

Juglans regia L. (Noce)

Albero originario dell'Asia; coltivato per i frutti e il legno pregiato.

Fioritura: da aprile a maggio.

Polline: apolare, oblato sferoidale, di dimensioni medie (30 - 40 μm), polipantoporato (10-15 pori), esina sottile, granulata, forma aspidi attorno ai pori, intina sottile forma onci sotto i pori. Allergenicità scarsa.

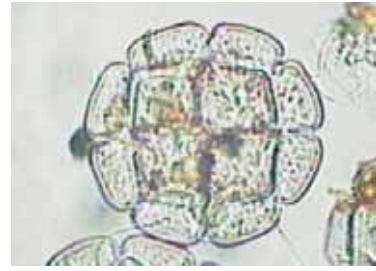


Fam. Leguminosae

Albizia julibrissim Durazzini (Gaggia)
Piccoli alberi ornamentali.

Fioritura: da giugno ad agosto.

Polline: poliade, a simmetria bilaterale, inaperturato, esina tectato-psilata; intina sottile, citoplasma liscio.

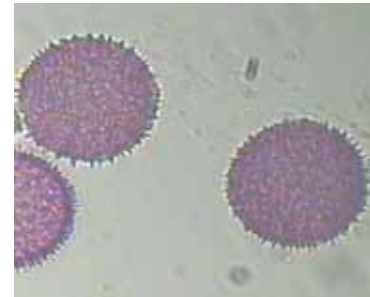


Fam. Malvaceae

Malva sylvestris L. (Malva)

Fioritura: da maggio ad agosto.

Polline: apolare, periporato, poro circolare; esina tectato-echinata, presenta spine di 5 -12 μ , intina fine, citoplasma granuloso.



Fam. Mimosaceae

Acacia dealbata Link (Mimosa)

Fioritura: da gennaio a marzo.

Polline: poliade, a simmetria bilaterale, inaperturato, esina tectato-psilata; intina sottile, citoplasma liscio.



Fam. Myrthaceae

Eucalyptus camaldulensis Dehnh (Eucalipto)

Fioritura: tra luglio e agosto

Polline: isopolare, oblato, subtriangolare in visione polare, ovale depresso in visione equatoriale. Tricolporato syncolpato; poro circolare, colpo con margini acuti; esina tectato-psilata-scabrata; intina sottile, citoplasma liscio.



Fam. Oleacee

***Olea europaea* L.** (Olivo)

Tipico dell'area mediterranea, economicamente importante come pianta agraria, ornamentale e come elemento del paesaggio.

Fioritura: tra maggio e giugno.

Polline: isopolare, sub-oblato oblatto-sferoidale, piccolo (16-26 μm), trizonocolporato. Colpi fusiformi, ad apici lunghi. In visione polare ha forma subtriangolare (goniotremi). Esina reticolata; intina ispessita con onci al di sotto delle aperture.

Allergenicità molto alta.



***Ligustrum vulgare* L.** (Ligustro)

Fioritura: tra maggio e luglio.

Polline: isopolare, oblatto-sferoidale, dimensioni medie (22-30 μm). Trizonocolporato, colpi fusiformi lunghi, area polare non molto estesa. Esina spessa e reticolata, con lumina di grandezza variabile, columelle; intina sottile forma piccoli onci al di sotto delle aperture.

Allergenicità bassa.



***Fraxinus excelsior* L.** (Frassino)

Pianta diffusa nei boschi misti di latifoglie.

Fioritura: tra marzo e aprile.

Polline: isopolare, suboblatto, piccoli (18-27 μm), trizonocolpato, colpi lunghi e stretti. Esina reticolata, con lumina di grandezza variabile (eterobrocata), columelle; intina sottile forma piccoli onci al di sotto delle aperture.

Allergenicità bassa.



Fam. Papaveraceae

***Papaver rhoeas* L.** (Papavero)

Erba annuale, infestante ed invasiva.

Fioritura: tra aprile e giugno.

Polline: isopolare, di forma sferoidale; subcircolare in visione polare, subovale in visione equatoriale.

Tricolpato, colpo a margini irregolari, apici acuti con residui di exina. Sexina tectato-scabrata, intina sottile, citoplasma granuloso.



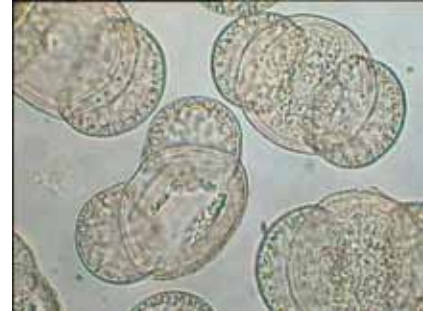
Fam. Pinaceae

Pinus sp. pl.: (Pino)

P. pinea (Pino domestico), *P. pinaster* (P. marittimo), *P. nigra* (P. nero), *P. sylvestris* (P. silvestre), *P. strobus* (P. strobo), etc.

Fioritura: primaverile

Polline: eteropolare, disaccato, grandi (80 µm), le sacche hanno forma di tre quarti di sfera; esina granulata sul corpo, con trabecole reticolate che impediscono lo schiacciamento delle sacche. Intina di spessore variabile. Allergenicità bassa.



Fam. Plantaginaceae

Plantago lanceolata L. (Lanciola, Piantaggine)

Erba perenne con foglie a rosetta. Fiori in spighe molto dense.

Fioritura: in primavera estate.

Polline: apolari, sferoidali, dimensioni medio-piccolo (16-30 µm). Polipantaporato (8-14 pori), esina verrucata scabrata, ispessita attorno ai pori a formare anulus; pori con opercolo, intina sottile, citoplasma granuloso. Allergenicità bassa.



Fam. Platanaceae

Platanus hybrida Brot. (Platano)

Grande albero ornamentale introdotto nel verde urbano, perché resiste bene all'inquinamento.

Fioritura: da aprile a maggio.

Polline: isopolare, suboblato o oblato, dimensioni piccolo (18-25 µm), trizonocolpato; colpi lunghi ad apici arrotondati, area polare piccola; membrana colpale granulata; esina microreticolata. Allergenicità bassa



Fam. Polygonaceae

Rumex sp. pl. (Romice)

Fioritura: dalla primavera all'estate.

Polline: isopolare, oblato-sferoidale, medio-piccolo (20-30 μm), tri-(tetra) zonocolporato. Colpi lunghi e stretti, area polare piccola. Esina sottile, tettata perforata-foveolata e ispessita attorno ai pori; intina sottile, il citoplasma mostra granulazioni.



Fam. Salicaceae

Populus sp.pl. (Pioppo)

P. tremula (P. Tremulo), *P. Nigra* (P. Nero), *P.italica* (P. Cipressino), *P. Alba* (P. Bianco).

Fioritura: tra marzo – aprile e maggio.

Polline: apolare, sferoidale, di dimensioni medie (25 – 30 μm), inaperturato. Esina sottile microreticolata. Intina spessa; si distacca lasciando uno spazio di 2 μm intorno al granulo, formando una corona circolare.

Allergenicità bassa.



Salix sp. pl. (Salice)

S. alba L. (S. Bianco), *S. Caprea* L. (Salicone), *S. Viminalis* L. (S. da vimini), *S. retusa* (S. Nano), *S. Babilonica* L. (S. Piangente).

Fioritura: da marzo a maggio; impollinazione entomofila e anemolila.

Polline: isopolare, oblato-sferoidale, piccolo (16 – 25 μm); trizonocolporato, , pori circolari, colpo con margini acuti arrotondati ai margini, presenza di margo.

Allergenicità bassa.



Fam. Umbelliferae

Daucus grandiflorus Scop. (Carota selvatica)

Fioritura: tra giugno e settembre.

Polline: isopolare, forma perprolato, subcircolare in visione polare, ovale compresso in visione equatoriale. Tricolporato, poro lalongato, colpo con spigoli acuti con estremità appuntita.

Esina tectato- scabrata, itina sottile, citoplasma liscio. Allergenicità bassa.

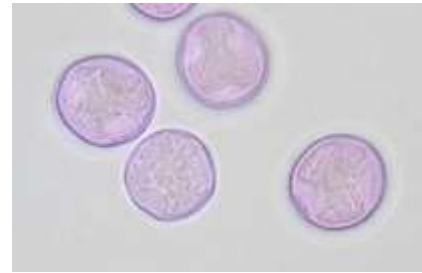


Fam. *Urticaceae*

Parietaria sp.pl. (Erba muraiola, Parietaria)

Fioritura: da marzo a ottobre. La concentrazione di questo polline è molto elevata e presente quasi tutto l'anno.

Polline: tri-zonoporato, isopolare, oblato-sferoidale, piccolo (14-19 μm). Esina microverrucata, poco ispessita attorno ai pori, opercolati; intina forma onci.
Allergenicit  alta.



Fam. *Ulmaceae*

***Ulmus* sp. pl.** (Olmo)

U. campestris L. (O. campestre), *U. montana* L. (O. montano o riccio)

Fioritura: da gennaio a marzo.

Polline: isopolare, di forma suboblata, esagonale in visione polare, subovale in visione equatoriale. Stefanoporato; pori ovali con anulus; esina tectato-rugulata; intina sottile.



***Celtis australis* L.** (Bagolaro)

Pianta della zona termofila mediterranea, diffusa come ornamentale nelle alberature stradali e parchi cittadini.

Fioritura: tra aprile e maggio.

Polline: isopolare, di forma suboblato sferoidale, dimensioni medie (25-35 μm). Tetra-pentazonoporati, i pori sul perimetro, con sottile opercolo; esina scabrata, intina forma onci sotto i pori.



5 Ringraziamenti

Si ringraziano i collaboratori Alessandra Saioni e Domenico Sansone del CRA-CMA per il supporto tecnico-operativo fornito allo svolgimento dell'attivit  di monitoraggio.

6 Bibliografia

- AA.VV. 2002 Progetto finalizzato PHENAGRI fenologia per l'agricoltura: Atti del convegno nazionale roma, 5 e 6 dicembre 2002 Mipaaf Roma, Italia
- AA.VV., 2004. Monitoraggio aerobiologico e pollinosi in Toscana. ARPAT, Firenze, Italia.
- Abel F.B., Morgan P.W., Saltveit M.F., 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd Ed. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- Brighetti M.A., Viglietti J., Froio F., Epifani C., Serra M.C., Travaglini A., 2009. Ambrosia a Roma: una pianta in espansione. Giornale Europeo di Aerobiologia Medicina Ambientale e Infezioni Aerotrasmesse, 1:159-160.
- Brunetti A., Zinoni F.1999. Progetto finalizzato PHENAGRI fenologia per l'agricoltura: Mipaaf Roma, Italia.

- Brunetti, A., Serra, M.C., Travaglini, A., Mazzitelli, A. & Palmieri, S., 2004. Correlation between pollen concentration and meteorological factors. In: *XI International Palynological Congress*, 4 - 9 luglio 2004, Granada (Spain), 371-372
- Dal Monte G., Epifani C., Serra M.C., 2009. Cambiamenti Climatici e Fenologia Giornale Europeo di Aerobiologia Medicina Ambientale e Infezioni Aerotrasmesse, 1:44-47.
- Epifani C., Serra M.C., 2009. Peso di alcuni parametri agrometeorologici sulla variabilità della stagione pollinica delle Cupressaceae a Roma centro: studio preliminare. Giornale Europeo di Aerobiologia Medicina Ambientale e Infezioni Aerotrasmesse 1:171.
- Feliziani, V., 1986. Pollini di interesse allergologico, guida al loro riconoscimento. Ed. Massoni, Milano, Italia.
- Ferrari M., Medici D., 1998. Alberi e Arbusti in Italia. Manuale di riconoscimento. Edagricole, Bologna, Italia.
- Mandrioli P., 2004. Qualità dell'aria - Metodo di campionamento e conteggio dei granuli pollinici e delle spore fungine aerodispersi, UNI 11108:2004
- Mandrioli, P., Puppi, G., 1978. Pollini allergenici in Emilia-Romagna. Collana Studi e Documentazione n.13, Dip. Ambiente e territorio R.E.R., pp. 79, Bologna, Italia.
- Sanapo, E., Silvestri, S., Serra M.C, Travaglini A., 2007. L'aerobiologia come strumento di indagine del cambiamento globale del clima. In: *102° Congresso della Società Botanica Italiana (S.B.I.) sez. poster P2*, 26-29 settembre 2007, Palermo.
- Serra M.C., C. Epifani, F. Mangianti, 2009. L'influenza delle condizioni meteorologiche sulla diffusione dei pollini rilevati all'osservatorio di Roma-Collegio romano, analisi dei casi estremi. In: *Environment including global change*, Palermo 5-9 Ottobre, Italia.
- Serra M.C., Palmieri S., Sanapo E., A. Travaglini, 2006. Relazioni tra concentrazioni polliniche e fattori meteorologici. G.E.A. Supplemento I:34.
- Travaglini A., Brighetti M.A., Epifani C., Serra M.C., 2008. Ambrosia in Rome. In: *Colloque Européen 2008 sur l'Ambroisie*, Aix-Les Bains (Lione), France 21 Novembre 2008 (Atti pubblicati sul sito internet (15.05.2009) <http://www.ambrosie.info/>, <http://www.ambrosie.info/pages/doc2.htm>).
- Travaglini A., Brighetti M.A., Serra M.C. , Epifani C., Froio F., 2008. Pollen Calendar of Rome (Italy). In: *4th ESA European Symposium on Aerobiology* 12-16 August 2008 Turku, Finland, pg. 99.
- Travaglini A., Silvestri, S, Mazzitelli A., Brunetti A., Serra M.C., 2004. Comparison between pollen monitoring at different altitudes above the ground level: the Rome experience. In: *XI International Palynological Congress*, 4-9 luglio 2004, Granada (Spain). p. 348.

COLLEZIONE DI FUNGHI FILAMENTOSI NON PATOGENI DI INTERESSE AGRO-INDUSTRIALE*

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Stefania Galletti, Dr. Pier Luigi Burzi, Dr. Stefano Cianchetta, Dr. Claudio Cerato

CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali
Via di Corticella, 133 – 40128 Bologna

Riassunto

La collezione di funghi filamentosi non fitopatogeni conservata presso il CRA-CIN di Bologna conta oltre 500 isolati "wild-type" per lo più appartenenti al genere *Trichoderma*, ma anche *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e altri. Le colture monosporiche vengono conservate prevalentemente a 4°C in tubi contenenti substrato nutritivo, con periodico trasferimento su nuovo substrato. Parte della collezione è conservata anche a temperatura ambiente sotto forma di micelio liofilizzato, mentre alcuni isolati sono conservati in azoto liquido. La collezione, ad oggi, ha consentito l'ottenimento di finanziamenti nell'ambito di diversi progetti di ricerca MiPAAF. Negli anni, gruppi di isolati sono stati sottoposti a screening al fine di individuarne alcuni dotati di particolari caratteristiche per applicazioni nei settori della difesa sostenibile, in virtù delle doti di biocontrollo, induzione di resistenza, tolleranza a fungicidi e biofumigazione, e nel settore della biodegradazione, grazie alla secrezione di enzimi litici, in particolare nei confronti di materiali lignocellulosici e bioplastici. Di recente la collezione si è arricchita di nuovi isolati potenzialmente utilizzabili in settori di studio emergenti quali la biorimediazione e le bioraffinerie.

Summary

The collection of non pathogenic filamentous fungi kept at CRA-CIN of Bologna is composed by over 500 wild-type isolates, mainly belonging to *Trichoderma* genus, but also to *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and others. Monosporic cultures are kept at 4°C in 5 ml-tubes containing nutritive substrate and are periodically transferred on new substrate. A part of the collection is also stored at room temperature as freeze-dried mycelium, while some isolates are stored under liquid nitrogen. The collection has allowed to obtain financial support by different research project funded by MiPAAF. During the years, groups of isolates have been screened to find characteristics exploitable in the sectors of sustainable crop protection, as biocontrol, resistance induction, fungicide and biofumigation tolerance, and in the biodegradation sector, thank to lytic enzyme secretion, particularly towards lignocellulosic and bioplastic materials. Recently the collection has been enriched by new isolates potentially exploitable in emerging study sectors, like bioremediation and biorefinery.

Parole chiave

Funghi, *Trichoderma*, difesa, biocontrollo, induzione di resistenza, enzimi litici, biodegradazione, biorimediazione

Keywords

Fungi, *Trichoderma*, crop protection, biocontrol, induced resistance, lytic enzymes, biodegradation, bioremediation

1 Caratteristiche della Collezione

La collezione di funghi filamentosi non fitopatogeni conservata presso il CRA-CIN di Bologna è stata realizzata a partire dagli anni '80 e viene costantemente arricchita con nuovi isolati potenzialmente interessanti, che trovano applicazioni in diversi settori di interesse agro-industriale.

La collezione al momento conta oltre 500 isolati fungini "wild-type" per lo più appartenenti al genere *Trichoderma*, ma più di recente è stata implementata anche con isolati di *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e altri (Figura 1).

* doi:10.4458/0986-56

Gli isolati sono stati ottenuti generalmente da campioni di terreno, materiale vegetale o organico, provenienti per oltre l'80% da regioni italiane (il 40% dalla provincia di Bologna) e per il 12% dall'estero.

Ai fini dell'isolamento, l'acqua di lavaggio o porzioni delle matrici di origine vengono piastrate su substrato agarizzato addizionato di antibiotici. Campioni di micelio delle colonie fungine che si sviluppano vengono trasferiti in purezza in singole piastre Petri su substrato nutritivo. Si procede poi al riconoscimento del genere botanico con tecniche microscopiche.

Le colture monosporiche vengono conservate prevalentemente a 4°C in tubi da 5 ml contenenti substrato nutritivo. Parte della collezione è conservata anche a temperatura ambiente sotto forma di micelio liofilizzato, mentre alcuni isolati sono conservati in azoto liquido.

Alcuni degli isolati più interessanti, oggetto di pubblicazioni scientifiche, sono inviati a centri specializzati nell'identificazione, in modo da avere informazioni sulla specie di appartenenza, qualora non sia possibile effettuare in laboratorio il riconoscimento con le classiche tecniche microscopiche.

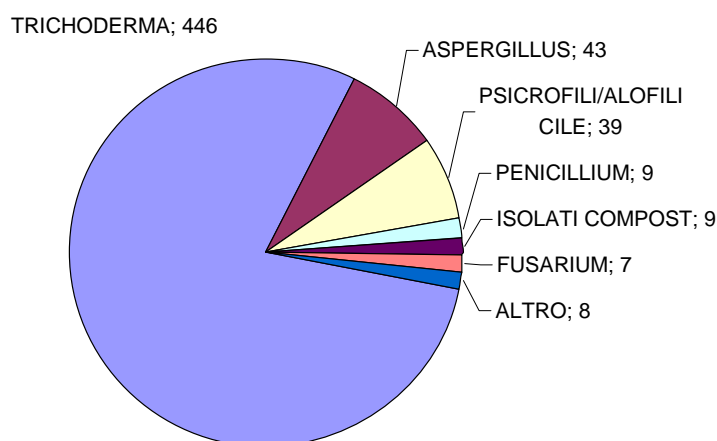


Figura 1 Composizione della collezione di funghi filamentosi non fitopatogeni conservata presso il CRA-CIN di Bologna.

2 Attività di mantenimento

Gli isolati conservati a 4°C vengono trasferiti almeno una volta all'anno su nuovo terreno nutritivo, per mantenerne la vitalità. Periodicamente occorre controllare anche la vitalità degli isolati liofilizzati o conservati in azoto liquido.

3 Attività di valorizzazione

La collezione ha consentito ad oggi l'ottenimento di finanziamenti nell'ambito di diversi progetti di ricerca MiPAAF (Miglioramento della barbabietola da zucchero per l'ambiente mediterraneo, BIOGEA, BIOENERGIE, VALSO, BIOSEGEN) e la partecipazione a bandi per progetti di ricerca in ambito nazionale ed europeo.

Occorre altresì sottolineare che il possesso di una collezione tanto ampia di "wild-type" risulta essere di grande richiamo per gruppi di ricerca esterni operanti in altri settori scientifici (ingegneria, biotecnologie industriali) che non possiedono competenze nel settore microbiologico.

Nel corso dell'ultimo decennio, di volta in volta gruppi più o meno ampi di isolati sono stati sottoposti a screening al fine di individuarne alcuni dotati di particolari caratteristiche per applicazioni specifiche nei diversi settori di interesse agro-industriale, di seguito descritti più in dettaglio.

3.1 Difesa sostenibile

Il genere *Trichoderma* è un noto agente di biocontrollo di patogeni vegetali, capace di agire per mezzo di diversi meccanismi, come rilascio di metaboliti antifungini, competizione per spazio e nutrienti, micoparassitismo, promozione della crescita e soprattutto induzione di resistenza nell'ospite.

Diversi isolati provenienti dalla collezione sono stati valorizzati nel recente passato in progetti di ricerca finanziati dal MiPAAF (Miglioramento della barbabietola da zucchero per l'ambiente

mediterraneo, BIOGEA), i cui risultati sono stati pubblicati su riviste scientifiche, oltre che presentati a convegni nazionali ed internazionali.

Inoltre specifici isolati sono stati oggetto di convenzioni con ditte commerciali private per lo sviluppo di formulati bioattivi da impiegare in agricoltura.

Attualmente alcuni isolati sono oggetto di studio nell'ambito del progetto VALSO, finanziato dal MiPAAF, allo scopo di mettere in luce eventuali sinergie tra l'applicazione di microrganismi antagonisti e/o induttori di resistenza e la tecnica della biofumigazione del terreno con formulati a base di farine di *Brassicaceae*.

3.1.1 Caratteristiche di biocontrollo degli isolati

Nell'ambito della difesa sostenibile sono state realizzate ricerche volte ad indagare particolari proprietà degli isolati di *Trichoderma*, come ad esempio la capacità di antagonismo nei confronti di diversi funghi fitopatogeni della fillo- o della rizosfera (Sala *et al.*, 2007; Galletti *et al.*, 2008 a, b; Galletti *et al.*, 2009).

Un pre-requisito importante perché un fungo antagonista possa esplicare la sua azione diretta o indiretta verso il patogeno è la capacità di accrescersi nella rizosfera della pianta ospite, occupando il sito di infezione. Alcuni isolati della collezione sono stati quindi valutati anche per questo aspetto (Sala *et al.*, 2007; Galletti *et al.*, 2009a).

La colonizzazione dell'apparato radicale da parte dell'antagonista rappresenta inoltre un mezzo di diffusione nel terreno dell'antagonista stesso (Galletti *et al.*, 2004c).

A titolo di esempio si riportano dati già pubblicati relativi alla capacità di antagonismo nei confronti di *Cercospora beticola* ed alla capacità di accrescersi nella rizosfera di *Brassicaceae* mostrata da parte di alcuni isolati di *Trichoderma*, rispettivamente in tabella 1 e 2.

Poiché l'induzione di resistenza nell'ospite sembra essere il meccanismo d'azione principale attraverso cui il *Trichoderma* esplica la sua attività benefica nei confronti della pianta, stimolandone le reazioni di difesa, alcuni isolati della collezione sono stati valutati in questo senso, monitorando nelle piante trattate l'induzione di enzimi 'marker', quali perossidasi e chitinasi, come si riporta a titolo di esempio in Figura 2 (Galletti *et al.*, 2007; Sala *et al.*, 2007; Galletti *et al.*, 2008a).

Tabella 1 Isolati di *Trichoderma*, e relativa origine, con valori di inibizione della crescita *in vitro* di colonie di *Cercospora beticola* maggiori del 20%, su Potato Dextrose Agar (PDA) addizionato del 25% (v/v) di filtrato colturale di *Trichoderma*, e riportati come percentuale del controllo su PDA (\pm S.E.) (Da: Galletti *et al.*, 2008a).

Isolati di <i>Trichoderma</i>	Inibizione crescita colonia (%)*	Matrice di origine	Località	Regione
Ba9/86	63.5 \pm 1.7 a	Terreno di bietola	Battipaglia (Sa)	Sud Italia
Ba8/86	52.5 \pm 2.2 b	Terreno di bietola	Battipaglia (Sa)	Sud Italia
MPVP 104	39.2 \pm 2.1 c	Formulato commerciale	Cesena (FC)	Nord Italia
B21	31.6 \pm 0.7 cd	Rizosfera di bietola	Baricella (Bo)	Nord Italia
Ba1/86	27.9 \pm 2.2 de	Terreno di bietola	Battipaglia (Sa)	Sud Italia
B44	27.2 \pm 0.8 de	Rizosfera di bietola	Baricella (Bo)	Nord Italia
X12	24.8 \pm 0.7 de	Rizosfera di spontanea	Campo Lomaso (Tn)	Nord Italia
K15	23.4 \pm 1.2 e	Rizosfera di spontanea	Kusadasi	Turchia
K2	22.7 \pm 1.4 e	Rizosfera di spontanea	Kusadasi	Turchia
B42	22.2 \pm 4.3 e	Rizosfera di bietola	Baricella (Bo)	Nord Italia
B55	22.2 \pm 2.2 e	Rizosfera di bietola	Bentivoglio (Bo)	Nord Italia
B66	22.2 \pm 1.2 e	Rizosfera di bietola	Siracusa	Sud Italia

P3	22.0±1.4 e	Rizosfera di patata	Siracusa	Sud Italia
P6	21.3±1.2 e	Rizosfera di patata	Angri (Sa)	Sud Italia
X7	21.3±2.5 e	Rizosfera di spontanea	Campo Lomaso (Tn)	Nord Italia
B31	20.8±1.9 e	Rizosfera di bietola	Baricella (Bo)	Nord Italia
B43	20.8±1.9 e	Rizosfera di bietola	Baricella (Bo)	Nord Italia
Ba12/86	20.6±0.0 e	Terreno di bietola	Battipaglia (Sa)	Sud Italia
P11	20.6±1.9 e	Rizosfera di patata	Monopoli (Ba)	Sud Italia
B12	20.0±9.2 e	Rizosfera di bietola	Baricella (Bo)	Nord Italia

*Le medie seguite dalla stessa lettera non sono significativamente differenti ($p \leq 0.05$) secondo il test D.M.S., dopo ANOVA dei dati trasformati in arcsin.

Tabella 2 Competenza di *Trichoderma* per la rizosfera di *Brassicaceae*, misurata come grado di colonizzazione della radice su substrato selettivo per *Trichoderma* (0-9 punteggio visuale*) (Da: Galletti *et al.*, 2004c).

Isolati di <i>Trichoderma</i>	<i>Eruca sativa</i>	<i>Rapistrum rugosum</i>	<i>Brassica nigra</i>
Control	3.1	9.0	2.5
B41	8.6	9.0	9.0
P5	8.3	9.0	7.8
B77	7.2	9.0	8.2
B22	6.8	9.0	8.4
K2	5.4	9.0	6.6
BA12/86	3.0	9.0	8.0
J33	8.5	n. d.**	n. d.
K12	8.3	n. d.	n. d.
B19	8.5	n. d.	n. d.
N3	7.8	n. d.	n. d.
P8	5.6	n. d.	n. d.

*0=nessuna colonizzazione, 9=completa colonizzazione; **n. d.: non determinato

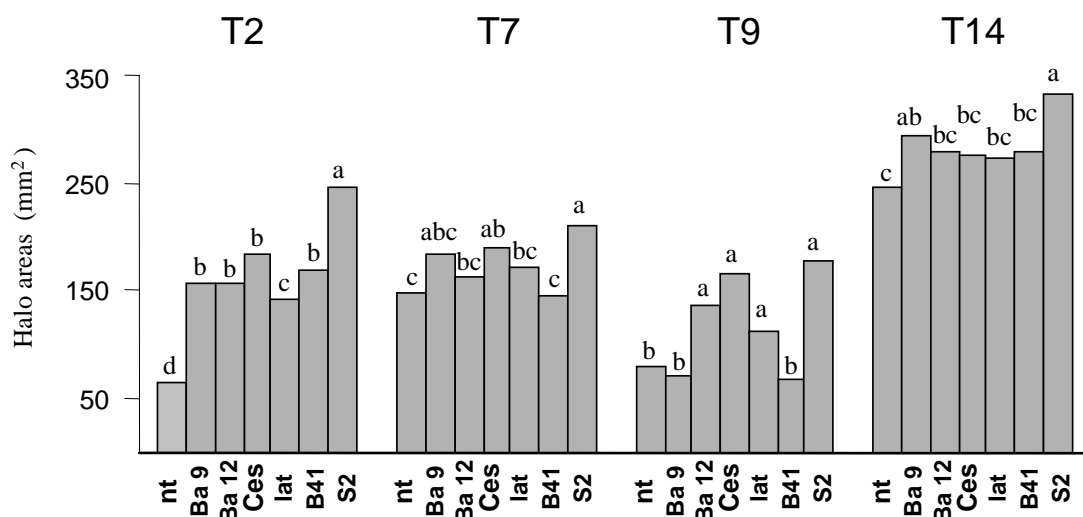


Figura 2 Induzione di chitinasi in foglie di barbabietola da zucchero da parte di omogenati colturali di *Trichoderma*. Gli istogrammi rappresentano le aree degli aloni prodotti da filtrato colturale di diversi isolati su apposito substrato, misurati per mezzo di Quantity One Software (Bio-rad). T2 = 2 gg dopo il primo trattamento; T7= 7 gg dopo il primo trattamento; T9 = 2 gg dopo il secondo trattamento; T14= 7 gg dopo il secondo trattamento. Le barre contrassegnate con la stessa lettera non differiscono per $P \leq 0.05$ (D.M.S. test dopo ANOVA)(Da: Sala *et al.*, 2007).

3.1.2 Integrazione in programmi di difesa

È stata indagata la possibilità di inserire isolati di *Trichoderma* come agenti di biocontrollo in programmi di difesa chimica a basso input, con particolare riferimento alla difesa della barbabietola da zucchero dalla cercosporiosi (Galletti *et al.*, 2004a; Galletti *et al.*, 2006a). Alcuni isolati inoltre hanno mostrato *in vitro* capacità di tollerare ossicloruro e idrossido di rame (tabella 3) e pertanto sono state condotte prove per verificare la possibilità di effettuare trattamenti di *Trichoderma* in combinazione a dosi ridotte di rame su barbabietola da zucchero contro *Cercospora beticola* (Burzi *et al.*, 2004; Galletti *et al.*, 2004b).

Con riferimento a tecniche di difesa applicabili in sistemi di agricoltura biologica, è stata evidenziata la possibilità di integrare applicazioni di *Trichoderma* con la tecnica della biofumigazione del terreno, effettuata con prodotti a base di farine di *Brassicaceae*. Alcuni isolati di *Trichoderma*, infatti, hanno mostrato tolleranza nei confronti dei composti tossici emessi da tali farine, oltre che doti di antagonismo (tabella 4) (Galletti *et al.*, 2006b; Galletti *et al.*, 2008b; Galletti *et al.*, 2009a).

Tabella 3 Inibizione della crescita delle colonie degli isolati di *Trichoderma* su PDA addizionato con prodotti rameici. (Da: Burzi *et al.*, 2004).

Isolato	% inibizione della crescita	
	Cu ossicloruro	Cu idrossido
	0,05%	0,03%
Ba 9/86	39,4 a	82,9 c
K 18	42,7 b	77,9 ab
K 12	43,3 b	77,2 a
X 20	46,6 b	79,3 b
Ce 4	51,1 c	81,5 c
Ba 1/86	52,1 cd	90,8 gh
Ba 12/86	54,8 de	91,0 gh
J 55	57,4 ef	86,9 de
Bf 3	58,3 ef	89,9 fg
Lt 2*	58,7 fg	91,1 gh

Bf 2*	61,9 g	87,6 e
B 41	68,9 h	85,4 b
X 25	69,8 h	76,9 a
Bf 1	72,7 hi	90,0 fg
B 80	76,4 il	88,4 ef
S 2	78,4 l	92,1 h

*isolati in grado di formare l'alone trasparente nel substrato addizionato di rame. I valori seguiti da lettera uguale non sono statisticamente differenti per $P \leq 0,05$ (D.M.S. test dopo ANOVA dei dati trasformati in arcsin).

Tabella 4 Matrice di isolamento, capacità di crescere sopra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*, (in classi) e su farine disoleate di *Brassica carinata*, misurata come lunghezza (gg) della fase di latenza (Lag) e velocità di crescita (mm/giorno), dei 40 isolati di *Trichoderma* saggiati (Da Galletti *et al.*, 2008b).

Isolati di <i>Trichoderma</i>	Matrice di origine	Crescita sui patogeni*			Colonizzazione di farina di <i>B. carinata</i>	
		<i>F.</i> <i>oxysp.</i>	<i>R.</i> <i>solani</i>	<i>P.</i> <i>ultimum</i>	Lag (gg)	Velocità crescita# (mm/giorno)
Lt35	Suolo di barbabietola	0	2	2	4	12.9
X44	Pianta spontanea	2+	2+	2	4	12.2
Regione	Da collezione	2	0	2	4	11.9
S2	Torba	2	2	2	6	11.6
Lt36	Suolo di barbabietola	0	0	2	6	10.9
B13	Rizosfera di barbabietola	1+	2+	2	4	10.8
Lt31	Suolo di barbabietola	2+	2+	2	4	10.8
N2	Rizosfera di <i>Brassica nigra</i>	2+	1+	2	4	10.4
N3	Rizosfera di <i>Brassica nigra</i>	2+	2+	2	8	10.0
B51	Rizosfera di barbabietola	2+	2+	2	4	9.8
Ba10	Suolo di barbabietola	0	2	2	5	9.8
3B8	Suolo di barbabietola	2	2	2	4	9.6
B25	Rizosfera di barbabietola	1+	2+	2	4	9.5
Ba24	Suolo di barbabietola	2	0	2	6	9.1
J21	Rizosfera di <i>Brassica juncea</i>	2+	2+	2	4	8.3
J23	Rizosfera di <i>Brassica juncea</i>	1+	2+	2	5	8.0
N1	Rizosfera di <i>Brassica nigra</i>	2+	1+	2	4	7.9
K15	Pianta spontanea	0	2	2	6	7.8
J15	Rizosfera di <i>Brassica juncea</i>	2+	2+	2	4	7.7
X11	Pianta spontanea	1+	1+	2	4	7.6
B41	Rizosfera di barbabietola	2+	2+	2	4	7.5
J14	Rizosfera di <i>Brassica juncea</i>	2+	2+	2	4	7.5
Ba13	Suolo di barbabietola	2	2	2	4	7.3
J33	Rizosfera di <i>Brassica juncea</i>	2+	2+	2	5	6.7
Ba9	Suolo di barbabietola	0	2	2	6	6.3
3B24	Suolo di barbabietola	2	2	2	6	6.3
Ba18	Suolo di barbabietola	2	2	2	6	6.0
J56	Rizosfera di <i>Brassica juncea</i>	1+	1+	2	5	6.0
ISCI86/6	Suolo di barbabietola	2	2	2	4	5.9
Bf2	Foglia di barbabietola	0	2	2	6	5.5
P8	Rizosfera di patata	0	2	2	6	5.0

J27	Rizosfera di <i>Brassica juncea</i>	1+	2+	2	9	5.0
P5	Rizosfera di patata	1	2	2	5	4.0
Ba12	Suolo di barbabietola	2	2	2	4	3.6
Ba15	Suolo di barbabietola	0	0	0	4	3.4
B57	Rizosfera di barbabietola	1	0	2	5	3.3
Ba8	Suolo di barbabietola	0	2	2	6	2.3
Lt1/05	Suolo di barbabietola	2+	2+	2	6	2.1
Ba19	Suolo di barbabietola	0	0	0	f.e.	0
Ba21	Suolo di barbabietola	2	2	2	f.e.	0

*: 0, 1, 2: nessuna crescita, incompleta o completa sulla colonia del patogeno, rispettivamente;
 +: forte imbrunimento della colonia del patogeno (*F. oxysporum*) o della zona di contatto (*R. solani*);
 f.e.: effetto fungicida;

#: le medie sono state separate per mezzo del test protetto di Fisher (D.M.S.:±1.939) per p≤0.05 dopo ANOVA.

3.2 Biodegradazione

Il genere *Trichoderma* produce enzimi litici quali cellulasi, xilanasi, laccasi, ecc. in grado di attaccare biomasse vegetali lignocellulosiche, liberando zuccheri fermentescibili, impiegabili nella produzione di biocarburanti (bioetanolo di seconda generazione). A questo riguardo 310 isolati di *Trichoderma* sp. sono stati valutati nell'ambito del progetto MiPAAF Bioenergie per attività cellulastica e xylanasica (Cianchetta *et al.*, 2010 a, b) (Figura 3).

Attualmente lo studio prosegue nell'ambito del progetto MiPAAF BIOSEGEN.

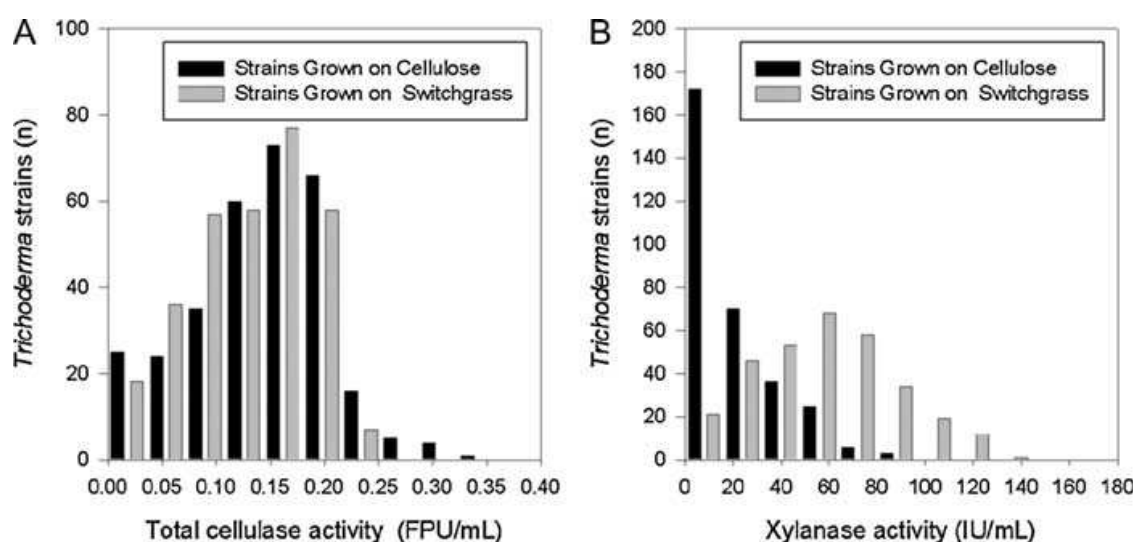


Figura 3 Distribuzione delle attività cellulastica (A) e xilanasica (B) totali per la collezione dei 310 isolati di *Trichoderma* dopo 10 gg di crescita in piastre a 24 pozzetti su substrato agarizzato. Gli isolati sono stati raggruppati in intervalli discreti in accordo con l'attività enzimatica osservata. FPU=Filter Paper Unit; IU=International Units (Da: Cianchetta *et al.*, 2010b)

Negli ultimi anni la collezione si è arricchita di isolati appartenenti anche ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* in quanto noti per essere produttori di enzimi di interesse industriale.

In particolare, un isolato di *A. flavus* è risultato capace di degradare i glucosinolati delle *Brassicaceae* a nitrili, attraverso una via enzimatica diversa da quella mirosinasi e più conosciuta, tipica dei tessuti vegetali (Galletti *et al.*, 2008c).

Inoltre è stato possibile osservare che alcuni isolati fungini rappresentativi della flora tellurica, appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Trichoderma*, sono in grado di tollerare ed accelerare la scomparsa di composti tossici quali l'allil-isotiocianato, che è alla base dell'azione biofumigante delle *Brassicaceae*, come si osserva in Figura 4 (Galletti *et al.*, 2011).

Più di recente, isolati fungini con spiccata attività cellulolitica appartenenti al genere *Acremonium*, ed altri capaci di aggredire le bioplastiche come il MaterBi® sono stati ottenuti da compost di residui agricoli ed inclusi nella collezione, in seguito ad una ricerca sulla biodegradazione di pannolini ecologici, commissionata da un'azienda privata, su finanziamento della Regione Toscana.

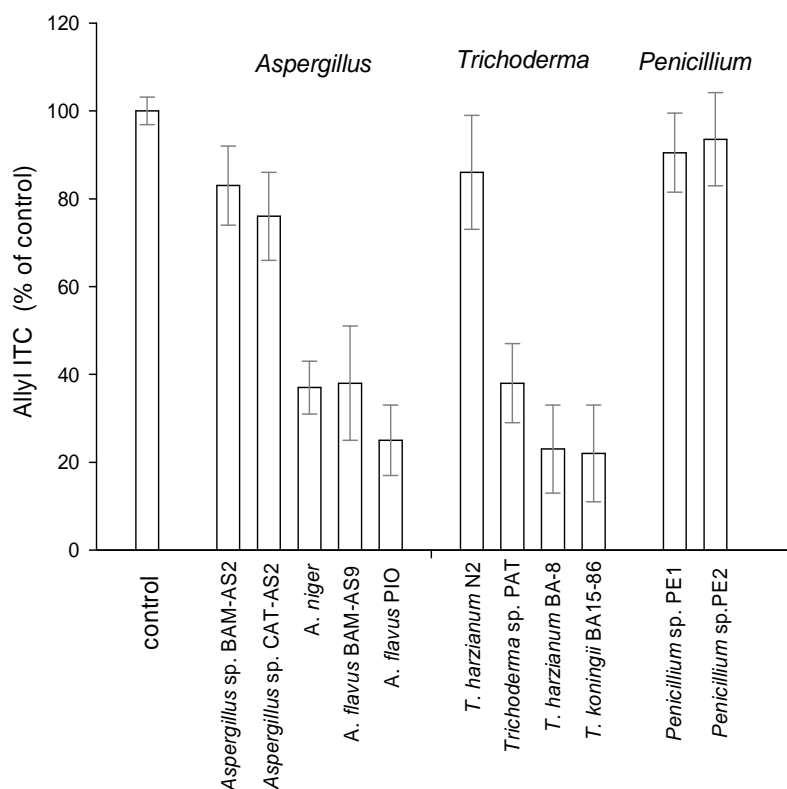


Figura 4 Persistenza di isotiocianato di allile in piastre Petri di allevamento di differenti funghi del suolo dopo 5 ore di esposizione ai vapori rilasciati da farine disoleate (15 mg) di semi di *Brassica carinata*, inumidite, a 25 °C (Da: Galletti *et al.*, 2011).

3.3 Biorimediazione e bioraffinerie

Sono stati di recente inclusi nella collezione anche circa 40 isolati provenienti da ambienti estremi cileni, caratterizzati da basse temperature ed elevata salinità, per eventuali applicazioni in nuovi settori di interesse, quali ad esempio la biorimediazione.

La collezione di funghi filamentosi, in continua implementazione, potrebbe infine essere impiegata per ricerche inerenti la biotrasformazione di diverse frazioni della biomassa vegetale nella produzione di intermedi, enzimi detossificanti o molecole bioattive per l'agro-industria.

4 Bibliografia

- Burzi P.L., Galletti S., Cerato C., Marinello S., 2004. Interazione tra isolati di *Trichoderma* e prodotti rameici per la difesa in agricoltura biologica. *Notiziario sulla protezione delle piante* 18:119-124.
- Cianchetta S., Galletti S., Burzi P.L., Cerato C., 2010a. A novel microplate-based screening strategy to assess the cellulolytic potential of *Trichoderma* strains. *Biotechnology and Bioengineering* 107 (3):461-468.
- Cianchetta S., Galletti S., Burzi P.L., Cerato C., 2010b. Hydrolytic potential of *Trichoderma* sp. strains evaluated by a microplate-based screening on switchgrass. *Journal of Biotechnology*. 150 Supplement 1, pag 138.
- Galletti S., Cerato C., Burzi P.L., Marinello S., Stevanato P., 2004a. *Trichoderma* applications on sugar beet leaves reduce lesion size and sporulation of *Cercospora beticola* and increase sucrose yield. *IOBC wprs Bulletin* 27 (8):211-214.
- Galletti S., Burzi P.L., Cerato C., Marinello S., Stevanato P., Sala E., 2004b. Esperienze di difesa dalla cercosporiosi in barbabietola da zucchero biologica. *Notiziario sulla protezione delle piante* 18:113-118.
- Galletti S., Burzi P.L., Cerato C., Marinello S., Lazzeri L., 2004c. Colonisation of *Brassicaceae* rhizosphere by selected *Trichoderma* spp. *Agroindustria* 3 (3):375-378.

- Galletti S., Burzi P.L., Marinello S., Sala E., Cerato C., 2006a. Applicazioni di *Trichoderma* in pieno campo per la difesa integrata dalla cercosporiosi della barbabietola da zucchero. *Agroindustria* 5 (3):111-116.
- Galletti S., Burzi P.L., Sala E., Marinello S., Cerato C., 2006b. Combining *Brassicaceae* green manure with *Trichoderma* seed treatment against damping-off in sugar beet. *IOBC wprs Bulletin* 29 (2):71-75.
- Galletti S., Burzi P.L., Marinello S., Sala E., Cerato C., 2007. Contenimento della cercosporiosi della barbabietola da zucchero in agricoltura biologica: esperienze di utilizzo di ossicloruro di rame e di *Trichoderma* come induttore di resistenza. *Agroindustria* 6 (3):121-126.
- Galletti S., Burzi P.L., Marinello S., Sala E., Cerato C., 2008a. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. *BioControl* 53:917-930
- Galletti S., Sala E., Leoni O., Burzi P.L., Cerato C., 2008b. *Trichoderma* spp. tolerance to biocidal compounds from *Brassica carinata* seed meals for a combined use in biofumigation. *Biological control* 45:319-327.
- Galletti S., Sala E., Leoni O., Cinti S., Cerato C., 2008c. *Aspergillus flavus* transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and a β -thio-glucosidase. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (9):2170-2173.
- Galletti S., Burzi P.L., Sala E., Marinello S., Cerato C., 2009. Synergy of *Brassica napus* green manure and *Trichoderma* seed treatment against *Sclerotium rolfii* of sugar beet. *IOBC wprs Bulletin* 42:69-72.
- Galletti S., Ugolini L., Cinti S., Burzi P.L., Cianchetta S., Leoni O., 2011. *Aspergillus flavus* interaction with biofumigation related compounds in soil. *IOBC wprs Bulletin* 63:17-21.
- Sala E., Burzi P.L., Marinello S., Galletti S., Cerato C., 2007. Multiple effects of *Trichoderma* spp. applied to sugar beet seeds towards soil-borne pathogens. *IOBC wprs Bulletin* 30 (6-1):199-202.

LA COLLEZIONE DI MICROORGANISMI DI INTERESSE ENOLOGICO DEL CRA-CENTRO DI RICERCA PER L'ENOLOGIA DI ASTI*

Responsabili Scientifici: Dr.ssa Emilia Garcia-Moruno, Dr. Enrico Vaudano

CRA-ENO Centro di ricerca per l'enologia
Via Pietro Micca, 35 – 14100 Asti

Riassunto

La collezione di lieviti e batteri isolati di interesse enologico del CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia di Asti, ha raccolto, in 40 anni di attività, più di un migliaio di ceppi di lievito e centinaia di ceppi batterici attraverso l'isolamento da uve, mosti, vini e negli ambienti di cantina. Oltre alle specie responsabili delle fermentazioni alcolica e malolattica sono presenti tutte le specie di interesse del settore, comprese quelle considerate come contaminanti, che risultano dannose nel vino a causa della produzione di molecole ad impatto organolettico negativo o addirittura dannoso dal punto di vista salutistico. Mentre le tecniche di isolamento e propagazione non sono pressoché mutate nel corso degli anni, altrettanto non si può dire per le tecniche di identificazione e caratterizzazione tassonomica, che hanno visto notevoli progressi. Attraverso le metodologie di analisi basate sul DNA, oggi è possibile identificare i microrganismi presenti nel vino con un'affidabilità ed una rapidità difficilmente raggiungibili con le tecniche microbiologiche "classiche". La collezione oggi è parte del progetto nazionale COLMIA (collezioni di microrganismi di interesse agrario, industriale e ambientale) finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF) che raccoglie le collezioni dei microrganismi di interesse agrario ed industriale presenti nei diversi centri del CRA-Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (<http://www.colmia.it/>).

Summary

During 40 years of activity, the collection of oenological yeasts and bacteria belonging to the CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia, has collected from grapes, musts, wines and winery environment, more than one thousand yeast strains and hundreds of bacteria isolates. In addition of the microorganisms responsible for the alcoholic and malolactic fermentations, all the species of oenological interest are present, comprised the ones considered as contaminants, resulting dangerous owing to their production of molecules with negative sensorial impact or in certain cases, hazardous for the health. While the isolation and maintenance techniques is not almost changed to date, remarkable advances in microorganisms identification and characterization has been done in the last decades. With the new methodologies based on the DNA analysis, now it is possible to identify microorganisms with a reliability and a rapidity not possible to reach with the "classical" microbiological tests. The collection join in the national project COLMIA (acronym for the microorganism collections with agricultural, industrial and environmental interest) granted by the Italian ministry of Agriculture, Food and Forestry (MiPAAF) which contains collections of microorganisms of interest in agriculture and industry in the various centers of the CRA-Council for Research and Testing in Agriculture (<http://www.colmia.it/>)

Parole chiave

Lieviti, batteri lattici *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, vino

Keywords

Yeast, lactic bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, wine

Introduzione

Nell'ambito enologico i microrganismi ricoprono un ruolo indispensabile essendo i primi attori nella trasformazione dell'uva in vino. In particolare i lieviti, funghi unicellulari, sono i responsabili della fermentazione alcolica, mentre i batteri lattici compiono la fermentazione

* doi:10.4458/0986-58

malolattica, che porta alla trasformazione dell'acido malico dell'uva in acido lattico, d'importanza fondamentale sia per quanto riguarda l'aspetto organolettico sia per l'ottenimento di un prodotto stabile microbiologicamente. Oltre a questo ruolo, negli ultimi anni è stata chiarita l'influenza che i microrganismi possono avere, nella loro naturale variabilità metabolica, sulle caratteristiche organolettiche del vino. Attraverso un'azione diretta su numerose classi di molecole presenti nell'uva e la produzione di molecole derivanti dal proprio metabolismo, essi generano tutta una serie di composti che, insieme ai prodotti principali della fermentazione, caratterizzano il vino prodotto con un'influenza di tipo ceppo-dipendente. (Lambrechts and Pretorius, 2000). Questa importanza è stata ben compresa dalle industrie produttrici di LSA (lievito secco attivo, ceppi di lievito venduti in forma disidratata) che, infatti, propongono sul mercato centinaia di ceppi di lievito diversi, di solito appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, che possono concorrere a produrre vini con caratteristiche particolari. Consapevoli dell'importanza dei microrganismi nella vinificazione, il CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia ha da tempo dato vita ad una collezione di lieviti e batteri di interesse enologico. Da alcuni anni la collezione partecipa al progetto nazionale COLMIA (collezioni di microrganismi di interesse agrario, industriale e ambientale) finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF) con lo scopo di conservare ed ampliare le collezioni dei microrganismi di interesse agrario ed industriale presenti nei diversi centri dell'ente di ricerca nazionale CRA-Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (Barba *et al*, 2011).

La collezione CRA-COLMIA è inserita con il codice WDCM 945 nella lista delle collezioni "Culture Collections Information Worldwide" <http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/> del World Data Centre for Microorganisms <http://www.wfcc.info/ccinfo/home/>.

1.1 Organizzazione della collezione

La Collezione presente presso il CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia è stata costituita a partire dagli anni '70 del secolo scorso. Nel 1989 è stata denominata con il nome di "Collezione Nazionale dei Lieviti e dei Batteri Selezionati Dal Vino - Istituto Sperimentale per l'Enologia" (CNLBSV-ISE).

Ad oggi la collezione conta 1490 isolati (ceppi conservati come coltura pura) di lieviti e 280 isolati di batteri lattici raccolti in ambito enologico durante fermentazioni alcoliche e malolattiche, in vigneti o ambienti di cantina. I ceppi sono catalogati utilizzando il prefisso ISE (ad esempio *ISE1145*) acronimo di Istituto Sperimentale per l'Enologia, la precedente denominazione del Centro.

In questo grande numero di isolati sono rappresentate tutte le principali specie di interesse enologico. Per quanto riguarda i lieviti la maggior parte dei ceppi è rappresentato dal genere *Saccharomyces* nelle sue due principali specie protagoniste della fermentazione alcolica *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Accanto a questi sono stati raccolti i lieviti presenti nelle prime fasi fermentative, nelle alterazioni e rifermentazioni per un totale di circa 35 specie diverse. Tra questi ceppi sono presenti alcuni *type strains* cioè i "ceppi tipo" di riferimento tassonomico internazionale conservati presso le più importanti collezioni di microrganismi quali la ATCC statunitense, la CBS olandese o la DBVPG dell'Università di Perugia, che sono stati inseriti nella collezione grazie a scambi o acquisizioni.

I batteri lattici presenti nella collezione sono per la gran parte appartenenti alla specie *Oenococcus oeni* e al genere *Lactobacillus*, responsabili delle fermentazioni malolattiche. Oltre a questi sono presenti alcune specie considerate come dannose nei vini quali, ad esempio, batteri appartenenti al genere *Pediococcus*, responsabili del difetto del vino detto "filante", o ceppi del genere *Lactobacillus* in grado di generare ammine biogene.

1.2 Tecniche di isolamento, conservazione e propagazione dei lieviti e batteri

L'acquisizione di nuovi isolati fungini e batterici avviene essenzialmente in due modi. Il primo largamente minoritario, consiste nello scambio di ceppi con altri ricercatori in tutto il mondo o attraverso l'acquisto diretto presso le collezioni internazionali. In questo caso il ceppo perviene al centro già sotto forma di coltura pura in forma liofilizzata o su substrato agarizzato.

Nella maggior parte dei casi l'acquisizione avviene attraverso l'isolamento dall'ambiente. In questo caso è interessante descriverne rapidamente il procedimento. Il campione, proveniente da vino, mosto o altra matrice, viene diluito in acqua peptonata sterile e disseminato su

terreno selettivo. Nel caso di isolamento di specie fungine ed in particolare di lieviti, il terreno agarizzato (di solito YPGA Yeast Peptone Glucose Agar) viene addizionato di una sostanza antibatterica come l'ampicillina. Questo permette la crescita selettiva dei lieviti ed impedisce la crescita batterica. Le colonie così cresciute vengono ulteriormente disseminate singolarmente su YPGA ed una colonia cresciuta su quest'ultima piastra viene seminata su tubo a becco di clarino che sarà fonte di cellule vive per le successive analisi tassonomiche. Parallelamente il ceppo in coltura pura viene inoculato in YPG liquido e, una volta cresciuto, miscelato a glicerolo sterile e conservato a -80°C in tubi adatti alla crioconservazione. Per quanto riguarda i batteri il procedimento è simile a quanto visto prima con la differenza che, in questo caso è necessario inibire i lieviti e favorire la crescita batterica utilizzando un terreno agarizzato specifico per i batteri quali MRS a pH 5.0 addizionato di cicloesimide, un potente antifungino. Le procedure successive, per l'ottenimento di una coltura pura, sono simili a quelle viste per i lieviti ma in questo caso si preferisce utilizzare un terreno in forma liquida, in quanto i batteri lattici, soprattutto *O. oeni*, crescono in modo stentato su substrato agarizzato.

Terminate le analisi tassonomiche e giunti alla classificazione specifica, il ceppo può entrare ufficialmente nella collezione attraverso l'assegnazione di un codice e l'inserimento nella banca dati. Per ogni isolato vengono preparate tre copie conservate in distinti congelatori a -80°C.

1.3 Le analisi microbiologiche di identificazione e caratterizzazione dei lieviti vinari

La classificazione tassonomica rappresenta ancora oggi una delle sfide più interessante per i microbiologi. Il testo di riferimento per la tassonomia dei lieviti è ormai da parecchi decenni "The yeast: a taxonomic study" fino al 1984 curato da autori olandesi e, nell'ultime edizioni del 1998 e 2011, edito da Kurtzman *et al.*, in cui sono raccolte le caratteristiche di circa 1500 specie appartenenti a più di 100 generi. Nel corso degli anni le classiche tecniche microbiologiche basate sull'osservazione micro e macroscopiche si sono raffinate e completate con moderni test fisiologici fino ad arrivare, recentemente, alle analisi del DNA. Queste ultime permettono in breve tempo di determinare la specie (identificazione o discriminazione interspecifica) ed in alcuni casi, distinguere il ceppo (caratterizzazione o discriminazione intraspecifica).

Le "classiche" tecniche fenotipiche di analisi microbiologica rimangono comunque la base di partenza per l'identificazione ed è interessante vedere come si svolge il procedimento di identificazione.

Prima di descrivere i vari tipi di analisi bisogna ricordare che è necessario raccogliere la maggiore quantità di informazione sul campionamento da cui si è ottenuta la coltura pura. Se il campione viene prelevato in fermentazione è utile conoscere alcuni dati del mosto-vino come la gradazione alcolica, se si tratta di mosto appena pigiato, o in attiva fermentazione o in arresto fermentativo. Questo approccio "epidemiologico" può essere molto utile per indirizzare il lavoro nella successiva determinazione tassonomica.

1.3.1 L'analisi microscopica

È la prima tappa del percorso di identificazione. L'osservazione microscopica della coltura pura raramente permette di identificare alla specie ma può essere utile per l'identificazione di alcuni generi con caratteristiche microscopiche particolari che si discostano dall' "anonima" forma ovoidale o ellissoidale che caratterizza buona parte dei lieviti enologici. Ad esempio, il genere *Schizosaccharomyces* con la sua specie più frequente, *S. pombe*, è caratterizzato da una evidente divisione per scissione (Fig. 2a). L'osservazione di cellule apiculate, a forma di limone, porta all'identificazione del genere *Hanseniaspora* (forma sporigena di *Kloeckera*) caratterizzata da una gemmazione bipolare che produce i caratteristici umboni (Fig. 2b).

Questa peculiarità non è però unica tra le specie di interesse enologico in quanto anche *Saccharomycodes ludwigii*, unico rappresentante del suo genere, presenta le stesse caratteristiche. Questa specie, molto resistente alla SO₂, frequente nel caso di rifermentazioni di vini dolci ad elevata concentrazione di etanolo e di mosti muti, può essere distinta al microscopio grazie alle dimensioni più grandi rispetto ad *Hanseniaspora*. Anche il genere *Dekkera/Brettanomyces* può essere identificato grazie alla forma ogivale, a volte "a botte" (Fig. 1c) che può presentare soprattutto nell'osservazione di cellule provenienti da colonie cresciute su agar; questo genere tende però ad avere un notevole polimorfismo se osservato in mosti o vini e la sua identificazione deve essere confermata con ulteriori analisi.



Figura 1 Immagini al microscopio ottico delle specie di lievito.
a: *Schizosaccharomyces pombe*; b: *Hanseniaspora uvarum*; c: *Brettanomyces bruxellensis*.

Ulteriori informazioni a livello microscopico possono essere fornite anche dalla capacità di formare miceli e pseudo miceli da parte delle cellule poste in determinate condizioni, utilizzando la tecnica denominata *Dalmau plate* (Dalmau, 1929). Sopra uno striscio di colonia fresco fatto su terreno agarizzato viene posto un vetrino copri-oggetto sterile; questa operazione induce le cellule delle specie che ne sono in grado, a crescere in modo direzionale, sviluppando cellule allungate che hanno lo scopo di uscire dalla zona coperta dal vetrino. In questo modo almeno alcune cellule fuoriescono e possono trovarsi in condizioni ambientali più favorevoli (Fig. 2a, b).

Il numero di spore, la loro forma, la forma, la persistenza o l'evanescenza dell'asco, sono tutte caratteristiche specifiche che si possono osservare al microscopio inducendo la sporificazione. A questo scopo vengono utilizzati terreni specifici, di solito minimi, che inducono la cellula a riprodursi sessualmente ed a sporificare. Fra questi terreni si possono ricordare il Mc Clary acetate agar per la sporificazione di *Saccharomyces cerevisiae* e il malt agar al 5% per *Schizosaccharomyces pombe*.

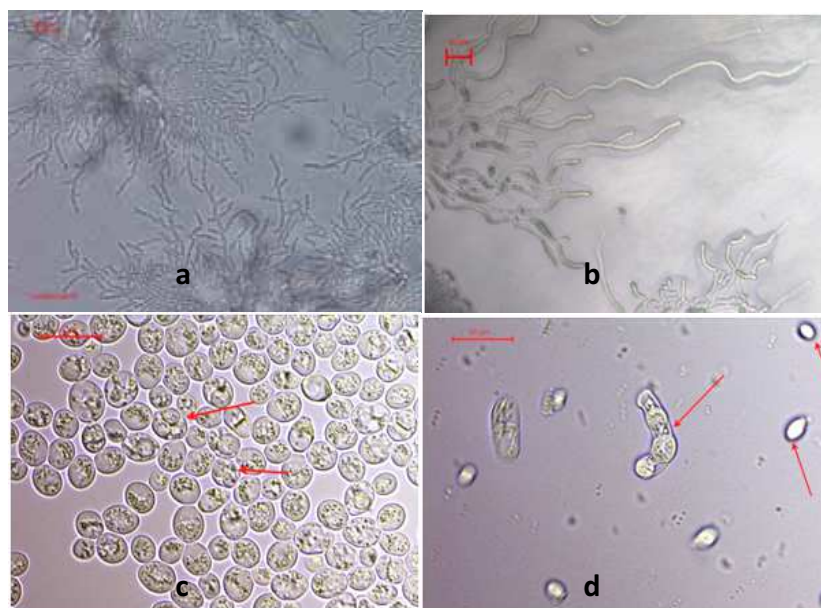


Figura 2 Formazione di micelio e sporificazione. a: pseudo-micelio di *Candida vini*; b: micelio di *Schizosaccharomyces pombe*; c: asco con spore di *Saccharomyces cerevisiae*; d: asco con spore di *Schizosaccharomyces pombe*

1.3.2 L'analisi macroscopica

L'analisi viene eseguita per inoculo della coltura pura su terreno liquido YPG in provetta e per disseminazione su terreno solido WL (Wallerstein Laboratory) (Green e Gray, 1950). Mentre la semina in terreno liquido, anche se molto semplice, presenta tempi di osservazione lunghi ed è

poco discriminante (se si eccettua l'identificazione del genere *Pichia* che forma una vistosa membrana superficiale), la semina su piastra WL può dare indicazioni interessanti per le differenze riscontrabili nel colore (dovute alla presenza di un colorante indicatore verde di bromo cresolo che viene o meno assimilato e metabolizzato dalle cellule durante la crescita), dimensioni, margini ed elevazione delle colonie (Fig. 3), (Tabella1).

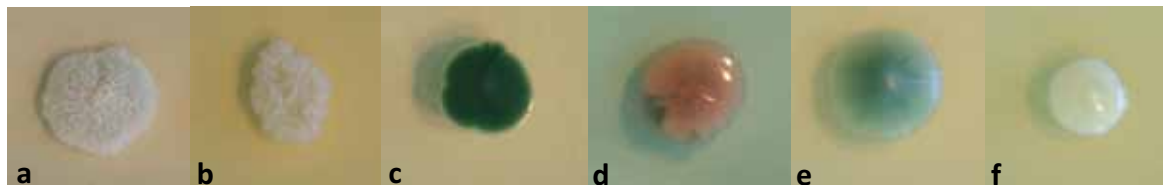


Figura 3 Crescita di colonie di diverse specie su terreno WL (Wallerstein Laboratory).
a: *Pichia membranaefaciens*; b: *Zygosaccharomyces bailii*; c: *Hanseniaspora uvarum*;
d: *Rhodotorula mucillaginosa*; e: *Saccharomyces cerevisiae*; f: *Brettanomyces bruxellensis*.

Tabella 1 Principali caratteristiche fenotipiche di alcuni generi di lieviti enologici.

Genere	Morfologia delle cellule	Sviluppo in terreno liquido (YEPG) 3/5 gg a 25° e dopo 1 mese a 20°	Sviluppo in terreno solido (WL)	Sviluppo in agar lisina	Formazione di micelio (Dalmu-plate)	Spore/aschi	Riproduzione asessuale
Saccharomyces	globosa, ellittica o cilindrica	sedimento, a volte anello <i>sedimento, a volte anello e film</i>	da crema al verde, umbonata, liscia opaca, cremosa	-	pseudooife	rotonde o ellittiche, 1-4 spore per asco (persistente)	gemmazione multilaterale
Schizosaccharomyces	globose o cilindriche	sedimento <i>sedimento, a volte anello sottile</i>	puntiformi, verde intenso, liscia opaca, burrosa	+	ife vere	globose, ellittiche o reniformi, 1-4 spore per asco (deiscete)	scissione
Torulasporea	sferiche, ellittiche	sedimento <i>sedimento e anello</i>	crema, sfuma ture verdi al centro, umbonata liscia, cremosa	+	pseudooife	sferiche, 1-4 per asco (persistente)	gemmazione multilaterale
Candida	globose, ellittiche, cilindriche, allungate	sedimento <i>sedimento</i>	crema, liscia lucida, burrosa	+	pseudooife	asporigena	gemmazione multilaterale
Hanseniaspora/ Kloeckera (sporigena/ asporigena)	apiculate, ovali o allungate	sedimento <i>sedimento, a volte anello sottile</i>	verde intenso piatta, liscia, opaca, burrosa	+	pseudooife rudimentali o assenti	cappello, elmetto o sferiche, 1-4 spore per asco (persistente o deiscete)	gemmazione bipolare
Dekkera/ Brettanomyces (sporigena/ asporigena)	globose, ellittiche, ogivali, allungate	sedimento a volte anello o film <i>sedimento denso a volte anello o film</i>	crescita lenta, piccole crema, a cupola liscia, cremosa	+	pseudooife	cappello o sferiche, 1-4 spore per asco (deiscete)	gemmazione multilaterale
Pichia	sferiche, ellittiche o allungate	film <i>film</i>	crema grigio, azzurro, convessa, rugosa, farinosa	+	pseudooife o ife vere	cappello, semisferiche, 1-4 per asco (deiscete)	gemmazione multilaterale
Zygosaccharomyces	sferiche, ellittiche o allungate a volte in paia o gruppi	a volte anello, sedimento <i>anello, e sedimento</i>	crema a cupola, cremosa, a volte rugosa con margini sinuosi	+	pseudooife	sferiche, ellittiche, 1-4 per asco (persistente)	gemmazione multilaterale
Rhodotorula	ovali, globose o allungate	anello parziale o totale, sedimento <i>anello</i>	rosa intenso lievemente umbonata, burrosa	+	assente	asporigena	gemmazione multilaterale

1.3.3 L'analisi fisiologica

L'analisi fisiologica rappresenta una tappa fondamentale del processo di identificazione con metodologie classiche. La capacità di fermentare diversi zuccheri, assimilare determinate fonti di carbonio e di crescere in assenza di lisina, vitamine od a temperature elevate sono tutte caratteristiche determinate geneticamente dalla specie. Negli ultimi anni l'introduzione dei test di assimilazione standardizzati monouso quali le gallerie ID 32 Biomerieux ha permesso di velocizzare i tempi di analisi ottenendo risultati attendibili. E' da ricordare che l'affidabilità delle analisi fisiologiche è legata alla rigosità delle operazioni da compiere a partire dall'utilizzo di materiale cellulare fresco cresciuto in condizioni ottimali.

Nella tabella 1 sono descritte alcune caratteristiche fenotipiche di alcuni generi riscontrabili in ambiente enologico.

1.3.4 Le analisi molecolari

Sebbene la caratterizzazione fenotipica, basata sulle proprietà morfologiche e fisiologiche dei lieviti sia ancora la base per l'identificazione dei microrganismi, è noto che essa può essere fortemente influenzata dalle condizioni fisiologiche del ceppo. Questa variabilità ha indotto i microbiologi a rivolgersi a tecniche di discriminazione a livello molecolare dapprima con l'analisi di enzimi, metaboliti secondari o molecole strutturali quali quelle che compongono la parete cellulare senza tuttavia risolvere i problemi legati all'affidabilità e al potere discriminante legati alle condizioni fisiologiche dei microrganismi. Successivamente, a partire dagli anni '80, l'introduzione delle tecniche basate sull'analisi del DNA ha fatto compiere all'analisi tassonomica un enorme avanzamento in termini di attendibilità e discriminazione. L'introduzione di queste metodologie ha, inoltre, reso possibile, almeno per alcune specie, la discriminazione a livello intraspecifico, rendendo cioè distinguibili diversi ceppi appartenenti ad una stessa specie.

Il DNA, infatti, è caratteristico non solo per ogni specie, ma è polimorfico anche in ambito intraspecifico, non varia con il modificarsi delle condizioni metaboliche della cellula, è facilmente estraibile e conservabile. Le prime metodologie genetiche, in parte ancora utilizzate oggi, si basavano sull'analisi del DNA nucleare e mitocondriale nella loro interezza come, ad esempio, l'analisi di restrizione, cioè la digestione del DNA da parte di enzimi che genera un profilo caratteristico (Querol *et al.* 1992, Lopez *et al.* 2000), oppure la percentuale di riassociazione DNA-DNA (Vaughan-Martini and Kurtzman, 1985) per la differenziazione delle specie nell'ambito del genere *Saccharomyces*, o ancora, la cariotipizzazione cioè l'analisi elettroforetica dell'intero set di cromosomi (Carle and Olson, 1985). L'invenzione della reazione a catena della Polimerasi (PCR: Polimerase Chain Reaction) da parte di Kary B. Mullis nei primi anni '80, ha ulteriormente ampliato le tecniche a disposizione del tassonomista molecolare andando oltre l'analisi del DNA totale. Con questa tecnica è possibile amplificare selettivamente una regione di DNA altamente informativa dal punto di vista discriminativo, per poi analizzarla nella sua dimensione, tagliarla con enzimi di restrizione ed osservarne il profilo elettroforetico, o, ancora, analizzarne la sequenza base per base.

Tra le diverse tecniche molecolari a disposizione, possono essere distinte le metodiche utilizzate per l'identificazione cioè la discriminazione a livello di specie, e quelle applicate alla caratterizzazione, cioè la distinzione a livello di ceppo.

Per il primo tipo di analisi l'esperienza presso il Centro ha dimostrato la buona affidabilità delle metodologie basate sulla restrizione dopo amplificazione delle sequenze 5,8S-ITS (Internal transcribed Spacers) (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) del DNA ribosomiale, che hanno mostrato avere sequenze caratteristiche per ogni specie di lievito (Fig. 4).

Il profilo ottenuto dopo l'amplificazione e la digestione con diversi enzimi, viene confrontato con i profili ottenuti dai type strains di riferimento. La robustezza di questa tecnica è testimoniata dal fatto che essa è applicabile direttamente alle colonie cresciute su piastra, eliminando la necessità di estrarre e purificare il DNA. Altri metodi testati presso i nostri laboratori, come ad esempio la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) hanno mostrato l'inconveniente di essere fortemente dipendenti dal grado di purezza e dalla quantità di DNA utilizzato.

I casi dubbi possono essere risolti attraverso una analisi genetica più approfondita che consiste nel sequenziamento, cioè nella lettura completa base per base, della sequenza dei domini D1/D2 della sub-unità 26S del DNA ribosomiale, anche questa molto discriminativa dal punto di vista della specie (Kurtzman and Robnett, 1998) (Fig. 5).

Per quanto riguarda l'analisi di caratterizzazione intraspecifica, questa viene eseguita sui ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, la più importante dal punto di vista enologico e la cui distinzione riveste maggiore interesse. La metodologia messa a punto presso il Centro si basa sul polimorfismo dei loci microsatellitari (Fig. 6) (Vaudano and Garcia-Moruno, 2008). Con questa tecnica, specie-specifica, poco costosa, veloce ed applicabile direttamente su colonia, non solo è possibile la distinzione affidabile a scopi scientifici, ma presenta interessanti risvolti applicativi. Tra questi basti ricordare la possibilità di verificare la dominanza in fermentazione del ceppo inoculato attraverso un semplice campionamento delle fecce a fine fermentazione.

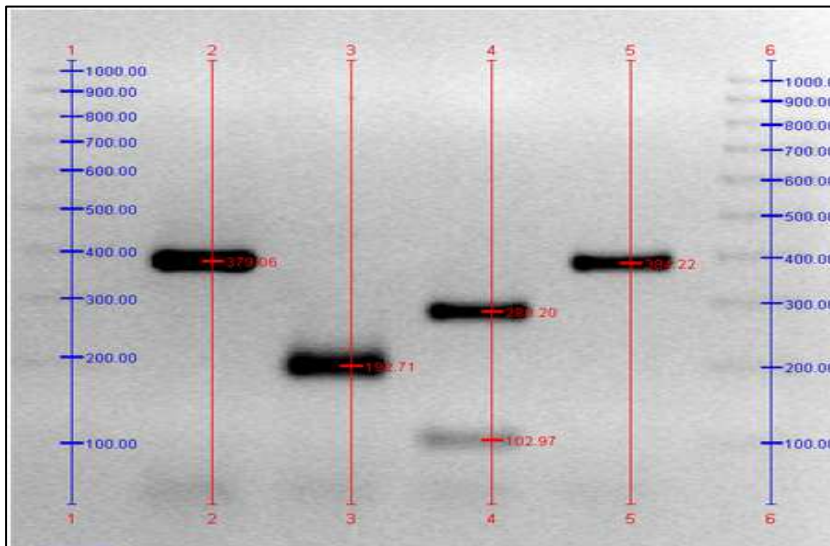


Figura 4 Profilo elettroforetico di una specie di lievito, ottenuto dopo amplificazione della regione 5.8-ITS del DNA ribosomiale e successiva restrizione secondo la tecnica: linee 1 e 6: marker a peso molecolare noto; linea 2: amplificato di 380 paia di basi; linea 3: restrizione con enzima *Hinf I* (due frammenti di 190 pb circa); linea 4: restrizione con enzima *Hae III* (due frammenti di 280 e 100 pb circa); linea 5: restrizione con enzima *Cfo I* (l'amplificato non viene tagliato).

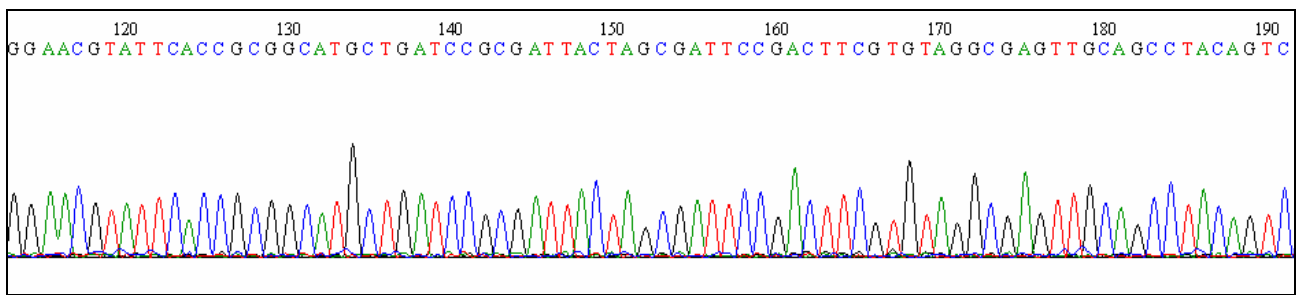


Figura 5 Elettroferogramma parziale derivante dall'analisi di sequenziamento dei domini D1/D2 del DNA ribosomiale codificante per la sub unità 26S.

Utilizzando queste tecniche molecolari, è attualmente in atto una revisione tassonomica di tutti i ceppi della collezione. Questa impresa, finanziata dal progetto nazionale COLMIA, prevede una prima estrazione del DNA dei ceppi in coltura pura, la purificazione e la sua conservazione a -80°C , allo scopo di preservarne l'integrità. Considerando l'abbondanza dei ceppi classificati come *S. cerevisiae* attraverso le analisi fenotipiche, viene effettuata innanzitutto l'analisi dei loci microsatellitari che permette di avere 2 informazioni: in primo luogo, essendo specie-specifica permette la sicura assegnazione alla specie *S. cerevisiae* in quanto solo i ceppi appartenenti a questa specie amplificano e generano un profilo elettroforetico; in seconda battuta l'analisi discrimina a livello intraspecifico i diversi ceppi della collezione (Fig. 6). I ceppi che in questa prima determinazione risultano negativi, vengono analizzati con le tecniche di discriminazione specifica RFLP delle sequenze 5,8S-ITS attraverso l'amplificazione con i primer ITS1 e ITS4 e la successiva digestione dell'amplificato ottenuto con gli enzimi *HaeIII*, *HinfI* e *CfoI*. Successivamente, se l'RFLP non è sufficiente per l'identificazione, si passa al sequenziamento del DNA ribosomiale come descritto sopra. Questa metodologia di lavoro "inversa", che prevede prima la caratterizzazione del ceppo e poi l'identificazione della specie, permette di razionalizzare tempi e costi del progetto.

Attraverso le analisi genetiche sarà possibile verificare, oltre l'identificazione fenotipica degli isolati presenti in collezione a livello di specie, anche la ridondanza dei ceppi di *S. cerevisiae* (cioè della frequenza dei ceppi identici) presenti, causata dalla scarsa efficacia dei metodi di analisi fenotipica nella distinzione intraspecifica. Dalle analisi svolte fino ad ora, il numero di queste "ripetizioni" appare comunque limitato.

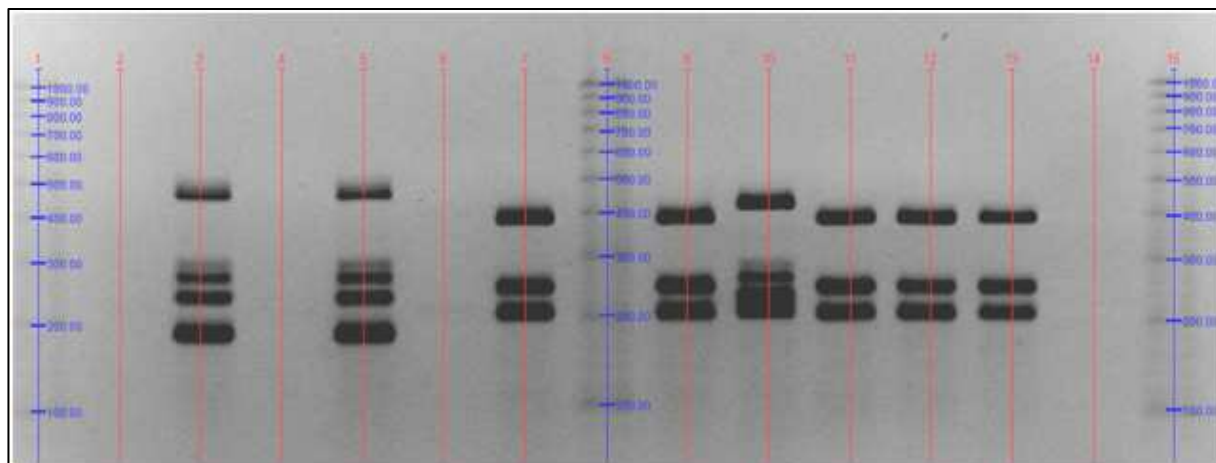


Figura 6 Profilo elettroforetico ottenuto dopo amplificazione PCR dei microsatelliti effettuata sul DNA di diversi ceppi di lievito. Linee 1, 8 e 15: marker a peso molecolare noto; linea 14 controllo negativo; linee 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13 : ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*; linee 2, 4, 6: ceppi che non hanno amplificato e che quindi non appartengono alla specie *S. cerevisiae*.

1.4 La caratterizzazione tecnologica dei ceppi di *S.cerevisiae*

Una collezione che non si ponga come unico obiettivo la raccolta e l'identificazione tassonomica degli isolati ma che possa essere fonte applicazioni in ambito agro-industriale, ha la necessità di verificare le attitudini tecnologiche dei suoi ceppi. Considerando che il numero di analisi di tipo tecnologico è virtualmente illimitato ed è dipendente dalle diverse necessità applicative, i principali test utilizzati sui ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono i seguenti:

- attività fermentativa (andamento fermentativo, vigore fermentativo e potere alcoligeno);
- fattore killer cioè la capacità di produrre sostanze che inibiscono la crescita di altri ceppi Fig.7;
- resistenza alla anidride solforosa;
- produzione di produzione di acido solfidrico;
- produzione di acidità volatile;
- produzione di glicerolo.

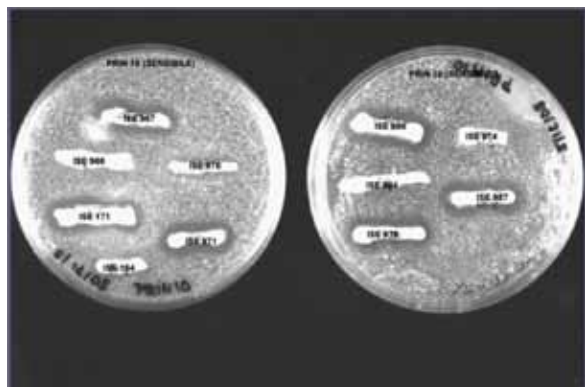


Figura 7 Test su piastra per la determinazione del carattere killer di *S. cerevisiae*.

Esistono, inoltre, tutta una serie di altre analisi atte a osservare determinate caratteristiche e che dipendono dalle esigenze tecnologiche richieste al ceppo, quali ad esempio: attività enzimatiche specifiche (ad es. l'attività glicosidasi o la capacità di riduzione di geraniolo a citronellolo nella produzione di vini aromatici);

- produzione di determinati composti ad impatto organolettico quali esteri ed alcoli superiori;
- trasformazione di precursori presenti nell'uva quali i composti tiolici nella vinificazione di uve Sauvignon Blanc;
- capacità flocculante per le applicazioni nella produzione di spumanti.

1.5 Identificazione dei batteri di interesse enologico

Anche per quanto riguarda i batteri lattici, una volta ottenuta la cultura pura degli isolati batterici, come precedentemente descritto, vengono eseguite tutta una serie di analisi allo

scopo di giungere alla classificazione tassonomica. Il testo di riferimento è in questo caso il Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.3 che riserva alcune sezioni ai cocci e bastoncelli presente nelle fermentazioni lattiche. Nel caso dei batteri l'osservazione al microscopio risulta poco discriminante, riuscendo a distinguere solamente la forma bastoncellare da quella sferica-ovoidale dei cocci. L'analisi tassonomica si basa quindi sulle proprietà fisiologiche e sulle caratteristiche genetiche della coltura pura.

1.5.1 Analisi fisiologiche

Il sistema API 50 (Biomerieux), rappresenta un metodo di identificazione biochimica dei batteri. Questo sistema è formato da 50 microtubi seriali contenenti vari composti organici e un indicatore di pH, e permette di saggiare la capacità di un ceppo batterico di usare come unica fonte di energia uno o più composti organici. Se il batterio è in grado di utilizzare la fonte saggiata per la crescita, si avrà una variazione del pH e di conseguenza, un cambiamento del colore del mezzo da viola a giallo. La Fig. 8 mostra un esempio di identificazione di un *Lactobacillus* realizzata con le gallerie API 50.



Figura 8 Test su Gallerie API 50 a: viraggio dopo 24 ore; b: viraggio dopo 48 ore.

1.5.2 Tecniche di identificazione molecolare per il riconoscimento della specie

I DNA dei batteri presenti in collezione sono stati tutti estratti. Per la caratterizzazione a livello di specie le tecniche disponibili sono diverse, quelle più utilizzate sono la PCR specie-specifica per *O. oeni* e la RAPD-PCR.

1.5.2.1 PCR specie-specifica

La tecnica risultata più adatta per l'identificazione di batteri appartenenti alla specie *Oenococcus oeni*, è la PCR specie-specifica.

La PCR specie-specifica è una tecnica che si prefigge di verificare la presenza di una regione di DNA caratteristica di una particolare specie di microorganismo, mediante l'utilizzo di primer specifici che si legano proprio alle estremità della regione da indagare. L'amplificazione porta alla formazione di un unico frammento di DNA individuabile, sotto forma di un'unica banda della lunghezza attesa, mediante elettroforesi in gel di agarosio. Uno studio condotto nel 1998 da Zapparoli *et al.* ha avuto come scopo l'identificazione di *Oenococcus oeni* isolati da mosto e vino tramite applicazione della PCR specie-specifica. In questo lavoro sono stati disegnati due primer specifici sul gene dell'enzima malolattico in grado di amplificare una regione della lunghezza di circa 1025 bp: solo isolati appartenenti alla specie *O. oeni* sono in grado di

amplificare tale frammento. In figura 9 è mostrato il risultato di una PCR specie specifica di alcuni isolati da vino.

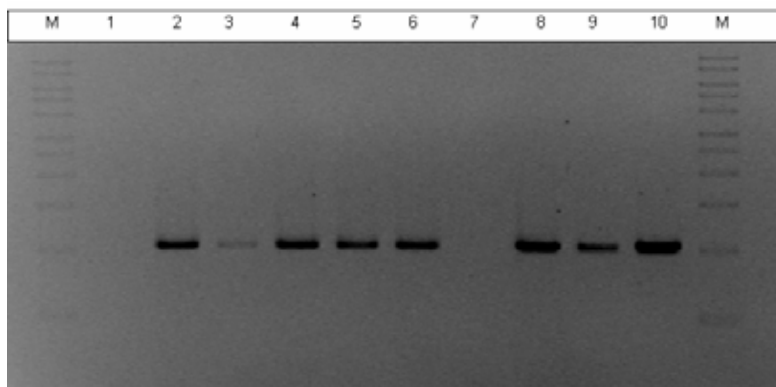


Figura 9 Immagine di un gel elettroforetico relativo all'appartenenza e non, di alcuni campioni di isolati batterici, alla specie *O. oeni*. M = marker di riferimento; 1-9 = campioni di batteri testati. 10: controllo positivo *O. oeni*.

1.5.3 RAPD-PCR

Le altre specie della collezione vengono caratterizzate attraverso la tecnica RAPD come descritto da Rossetti e Giraffa nel 2005, utilizzando il primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'). Tra le tecniche molecolari basate sulla PCR, la RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) è una tecnica rapida per la caratterizzazione inter- e intra- specifica di molte specie batteriche. Ci sono diversi studi in cui questa tecnica è stata applicata con successo per differenziare diversi LAB (Giraffa and Neviani, 2000; Aznar and Chenoll 2006; Pelicoli Riboldi *et al.*, 2008). La RAPD-PCR prevede l'amplificazione del DNA genomico utilizzando un unico primer che si appaia casualmente al DNA ogni qualvolta trova una sequenza complementare. Il profilo di amplificazione che si ottiene è composto da più bande e rappresenta una sorta di impronta digitale (fingerprint) che caratterizza in modo specifico il ceppo. La RAPD-PCR viene largamente impiegata nello studio dei batteri lattici sia per tipizzare gli isolati che per assegnare loro una possibile collocazione tassonomica. Dato che profili di amplificazione simili indicano la presenza di genomi simili, confrontando mediante appositi software i profili di amplificazione ottenuti per gli isolati oggetto di studio con quelli di ceppi tipo o di riferimento, è possibile giungere ad una loro identificazione.

1.5.3.1 Sequenziamento del 16S rDNA

Questa è la tecnica più sicura ai fini dell'identificazione batterica a livello di specie; consiste nell'amplificazione del 16S rDNA e successivo sequenziamento dell'amplicone ottenuto. La sequenza risultante viene analizzata mediante i database on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) per verificare a quali sequenze presenti in banca dati risulti omologa, ciò permette di assegnare una precisa identificazione al microrganismo in esame. I primers utilizzati a questo scopo sono dei primers universali descritti da Marchesi *et al.*, 1998.

1.5.4 Tipizzazione a livello di ceppo

1.5.4.1 Multiplex RAPD

I batteri appartenenti alla specie *Oenococcus oeni*, possono essere discriminati a livello di ceppo mediante multiplex RAPD-PCR, per il riconoscimento intraspecifico. In questo modo, si è potuto individuare il polimorfismo presente tra differenti isolati batterici, appartenenti alla medesima specie.

Il profilo di amplificazione (Fig.10) che si ottiene per ciascun campione, è composto da più bande e rappresenta una sorta di impronta digitale (fingerprint) che caratterizza in modo specifico il ceppo.

Il metodo multiplex, descritto da Reguant *et al.*, (2003) si è rivelato abbastanza discriminante, rapido e riproducibile.

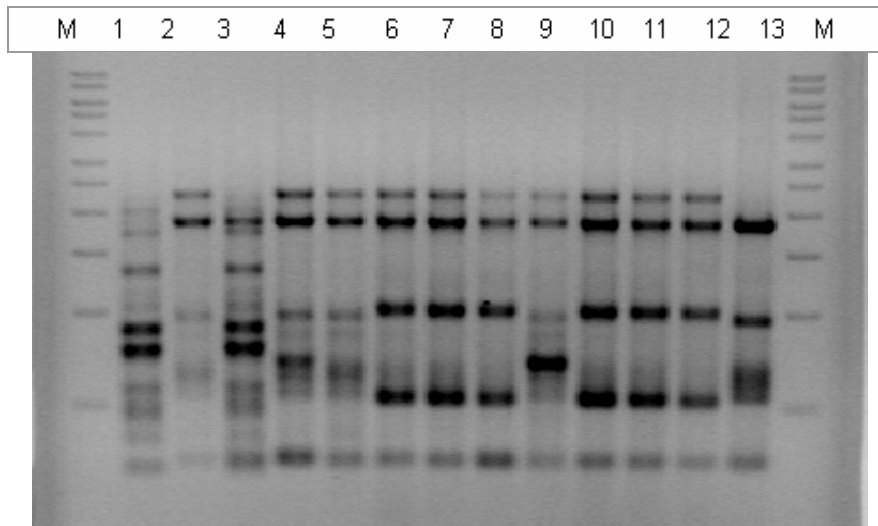


Figura 10 Immagine di un gel elettroforetico RAPD-PCR. I profili 1-13 sono quelli appartenenti ad alcuni dei campioni analizzati; M: marker DNA Ladder 1 Kb.

1.5.4.2 PFGE

La PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) è una tecnica che permette di separare frammenti di DNA di grandi dimensioni, che con un normale gel di agarosio non potrebbero essere separati. Il principio della tecnica è quello di far migrare le molecole di DNA all'interno del gel applicando un campo elettrico avente una direzione variabile, in modo che anche molecole molto lunghe possano passare tra le maglie della matrice e migrare più o meno velocemente secondo la loro lunghezza. Si possono così separare frammenti di DNA lunghi da 50Kb a qualche Mb. Il DNA viene previamente digerito con un enzima di restrizione, dopo la corsa, come in tutti i fingerprinting, si ottiene un profilo specifico per ogni ceppo. I pattern di bande ottenuti vengono poi confrontati con il software Bionumerics per valutare la similarità/identità tra i ceppi.

1.5.4.3 Multilocus sequence type

Questa tecnica permette di identificare i ceppi analizzando le sequenze di particolari geni altamente conservati. Per *O. oeni* le sequenze che si comparano sono quelle relative ai geni *gyrB*, *pgm*, *ddl* e *rec* secondo quanto descritto da De Las Rivas *et al.*, (2004); anche solo la differenza di una base caratterizza un ceppo. La MLST presenta una notevole capacità di discriminazione, ma necessitando di un sequenziatore, risulta costoso applicarla nella normale routine; si ricorre pertanto a questo metodo solo quando le tecniche precedentemente descritte non sono sufficienti a discriminare i ceppi.

1.6 La caratterizzazione tecnologica dei ceppi di *O. oeni*.

La fermentazione malo lattica (FML) ha progressivamente perduto importanza come pura e semplice reazione disacidificante per assumere un significato enologicamente più complesso. In effetti, alla FML è oggi attribuita un'azione decisiva nel conferire al vino una maggiore complessità di gusto e di aroma attraverso diverse modificazioni. Le variazioni organolettiche attribuibili alla FML sono a carico del colore, dell'aroma e del gusto e possono assumere connotati positivi o negativi a seconda della loro intensità e combinazione. Tuttavia, è

opportuno sottolineare che tali modificazioni dipendono strettamente dalle capacità metaboliche dei singoli ceppi batterici responsabili della FML, e quindi soprattutto dalle proprietà ceppo-specifiche di *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente associata a tale processo (Hernández-Orte *et al.*, 2009; Bonello *et al.*, 2011).

Un'altra importante caratteristica nella selezione dei batteri lattici riguarda la capacità o meno di produrre ammine biogene, in particolare l'istamina, l'ammina biogena potenzialmente più pericolosa per la salute. I ceppi della collezione CRA-ENO sono stati testati per la produzione di ammine biogene mediante tecniche chimiche (TLC, HPLC) e molecolari (Costantini *et al.*, 2006). Infine, anche la maggiore o minore capacità di assorbire molecole tossiche, come l'Ocratossina A, è una caratteristica ceppo-specifica, interessante dal punto di vista sanitario (Del Prete *et al.*, 2007).

1.7 La gestione dei dati

La necessità di raccogliere tutte le informazioni relative a migliaia di ceppi presenti nella collezione, dai dati di raccolta dei campioni ai risultati delle analisi fenotipiche e genetiche, presuppone l'utilizzo di software specifici di gestione di questi grandi "database". Il software di elaborazione utilizzato presso il Centro (Bionumerics™)(Fig. 11) permette non solo la raccolta delle informazioni di diverso tipo, dai profili elettroforetici, alle sequenze di DNA ai dati fenotipici, ma anche il confronto tra isolati con diverse tecniche di comparazione (Fig. 12). Queste possono essere fatte utilizzando i dati di una sola tecnica analitica oppure attraverso la combinazione dei dati provenienti da diverse analisi anche molto diverse tra loro.

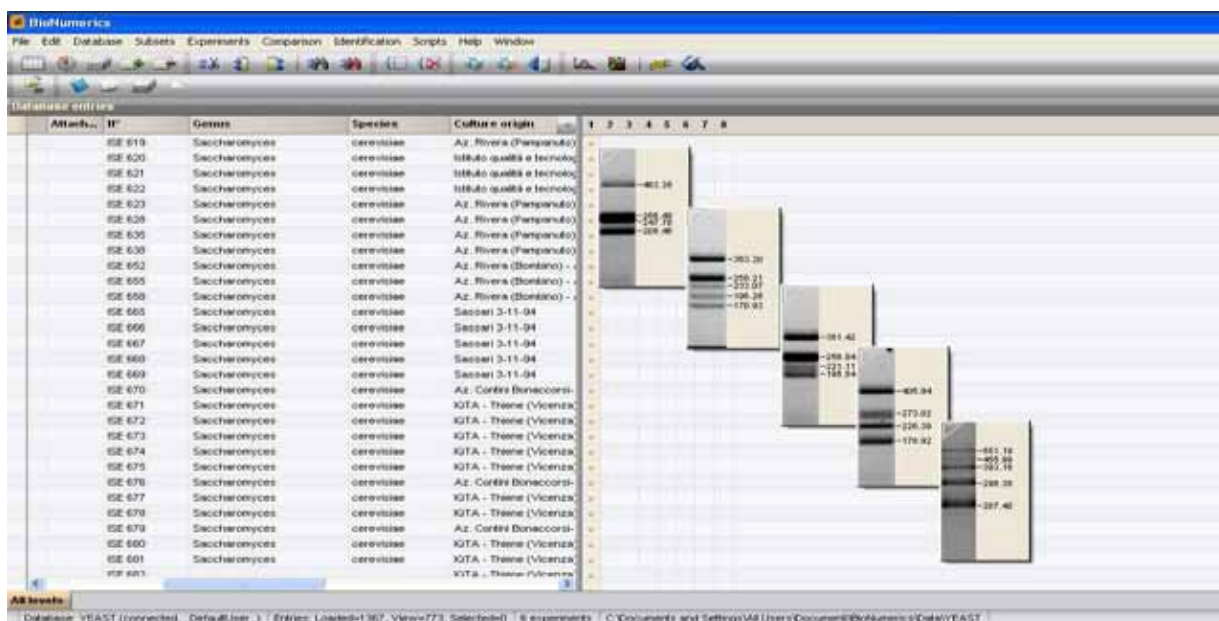


Figura 11 Il software Bionumerics™ permette di raccogliere le informazioni relative alle analisi effettuate su migliaia di ceppi.

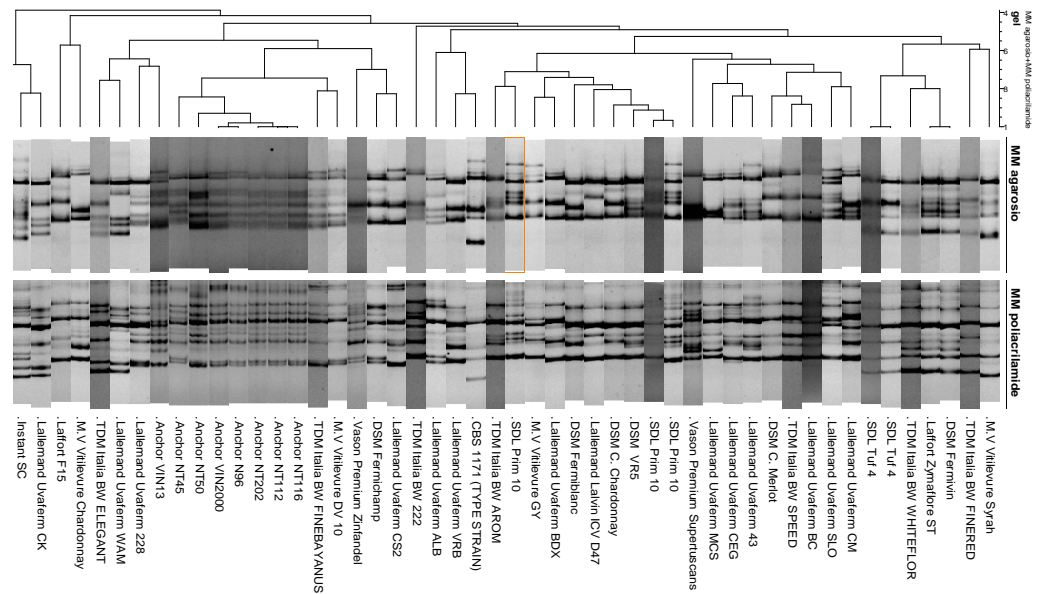


Figura 12 Cluster analysis di ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae* effettuata con Bionumerics™ utilizzando 2 analisi di caratterizzazione genetica.

1.8 Conclusioni

Il mantenimento della collezione e il suo arricchimento con nuovi isolati, lungi da essere una semplice curiosità scientifica, si deve porre alcuni importanti obiettivi.

Il primo è quello di raccogliere e conservare la biodiversità microbica in ambito enologico. Anche questa, come quella degli organismi superiori, subisce un lento deterioramento, causato, in certi ambienti, dall'uso di antiparassitari ed, in cantina, dall'utilizzo degli starter commerciali che sono fortemente competitivi nei riguardi della flora autoctona. Altro scopo fondamentale è quello di essere fonte di materiale vitale, identificato e caratterizzato geneticamente, su cui intraprendere studi di tipo applicativo oltre che di ricerca pura, quali l'identificazione di nuove metodologie di analisi o la ricerca di ceppi specifici adatti a determinate fermentazioni ed a specifici vitigni.

Inoltre, il mantenimento di svariate specie in condizione di coltura pura e geneticamente caratterizzata, si rivela molto utile nella rapida identificazione di microorganismi contaminanti, che determinano intorbidamenti, precipitazioni ed alterazioni organolettiche dei vini durante l'intero ciclo di produzione, dalla fermentazione fino all'imbottigliamento.

1.10 Bibliografia

- Aznar R., Chenoll E., 2006. Intraspecific diversity of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, and *Leuconostoc mesenteroides* associated with vacuum-packed meat product spoilage analyzed by randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Journal of Food Protection* 69:2403-10.
- Barba, M., Belisario, A., Luongo, L., 2011. Collezioni di Microorganismi di interesse agrario, industriale e ambientale- COLMIA: Manuale d'uso. *Petria*, 21 1-164.
- Bonello F., Costantini A., Vaudano E., Cravero M. C., Garcia-Moruno E. (2011). Influence of selected autochthonous *Oenococcus oeni* on the evolution of wine sensory profile after malolactic fermentation. "Ceno 2011" 9ème édition du Symposium International d'Enologie 15, 16 et 17 giugno 2011.
- Carle, G. e Olson, M., 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proceeding of National Academy of Science of the USA* 82: 3756-3760.
- Costantini A., Cersosimo M, Delprete V., Garcia-Moruno E. 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, TLC and HPLC of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection* 69: 391-396.

- Dalmau, L.M., 1929. Remarques sur le technique mycologique (1). *Annales de parasitologie humaine et comparee* 7: 536--545.
- De las Rivas B., Marcobal A., Munoz R., 2004. Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7210-7219.
- Del Prete V., Rodriguez H., Carrascosa A.V., De las Rivas B., Garcia-Moruno E., Muñoz R., 2007. In vitro removal of Ochratoxin A by Wine Lactic Acid Bacteria. *Journal of food protection* 70, (9): 2155-2160.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C. Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-337.
- Giraffa G., Neviani, E. 2000. Molecular identification and characterization of food-associated lactobacilli. *Italian Journal of Food Science* 12: 403- 423.
- Green, S.R., e Gray, P.P., 1950. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. *Wallerstein Laboratory Communications* 13: 357-366.
- Hernández-Orte P., Cersosimo M., Loscos N., Cacho J., Garcia-Moruno E., Ferreira V., 2009. Aroma development from non-floral grapes precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Research International* 42: 773-781.
- Kurtzman, C.P, Fell, C.P Boekhout, T., 2011. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5th Ed. Elsevier, New York, USA.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification on phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S., 2000. Yeasts and its importance to wine aroma - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21: 97-129.
- Marchesi J., R., Sato T., Weghtman A. J., Martin T. A., Fry J. C., Hion S. J., Wade W. G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64:795-799.
- Pelicioli Riboldi G., Preusser de Mattos E., Guedes Frazzon A.P., Alves d'Azevedo P, Frazzon J., 2008. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. *Journal of Basic Microbiology* 48:31-7.
- Querol, A., Barrio, E., Ramòn, D., 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 19: 439-446.
- Reguant C., Bordons A., 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 95:344-353.
- Rossetti L., Giraffa G., 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods* 63, 135-144.
- Vaudano E., Garcia-Moruno E., 2008. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology* 25: 56-64.
- Vaughan Martini, A., Kurtzman C.P., 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35: 508-511.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., 2009, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.3. The Firmicutes. 2th Ed. Springer, New York, USA.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Zapparoli G., Torriani S., Pesente P., Dellaglio F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology* 27:243-246.

COLLEZIONE DI LINEE CELLULARI MONOCLONALI*

Responsabili Scientifici: Dr. Claudio Cerato¹, Dr. Gianpaolo Grassi²

¹CRA-CIN Centro di ricerca per le colture industriali

Via di Corticella, 133 – 40128 Bologna

²CRA-CIN sede distaccata di Rovigo

Viale G. Amendola, 82 – 45100 Rovigo

Riassunto

Si riporta la descrizione di una collezione di linee cellulari animali conservata in parte presso il CRA-CIN a Bologna e in parte nella sede distaccata di Rovigo. Sono mantenuti in azoto liquido: a Bologna 543 ibridomi secernenti anticorpi monoclonali specifici per i seguenti virus vegetali: AMV, BCMV, BMV, BNYVV, CMV, PLRV, PPV, PVS, PVX, PVY, TMV; a Rovigo: circa 100 tra ibridomi e monoclonali che identificano proteine virali, proteine animali, ormoni vegetali, tossina del *Bacillus thuringiensis*, molecole di principi attivi farmaceutici, sostanze psicotrope e antigeni di cellule umane. Sono conservate anche tre linee cellulari tumorali di topo ed una di ratto, utilizzate nella preparazione degli ibridomi e una serie di sospensioni di cellule di milza di topi immunizzati con antigeni virali.

L'origine della collezione risale al 1985 ed il suo ampliamento si è protratto sino al 2000. Le cellule sono state costantemente mantenute in azoto liquido distribuite in 6 contenitori criogenici dotati di sistema d'allarme. Nel 2011 è stata verificata la vitalità delle cellule secernenti un anticorpo monoclonale diretto verso l'ormone vegetale, l'acido abscissico e il risultato è stato positivo.

Con il supporto del programma Biodati si intende aggiornare la collezione e portarla all'attenzione degli operatori del settore diagnostico, per mettere a frutto l'ingente patrimonio collezionato.

Summary

A collection of animal cell lines is cryopreserved at the CRA-CIN in Bologna and at the branch of Rovigo. They consist of 543 hybridomas secreting monoclonal antibodies specific for the following plant viruses: AMV, BCMV, BMV, BNYVV, CMV, PLRV, PPV, PVS, PVX, PVY, TMV; in Rovigo about 100 hybridomas and monoclonal that recognize viral proteins, plant hormones, toxin of *Bacillus thuringiensis*, molecules of active pharmaceutical drugs, psychotropic substances and antigens of human cells. Three mouse tumor cell lines and one from rat, that have been used in the preparation of hybridomas and a series of cell suspensions of spleens from mice immunized with viral antigens are also stored.

The origin of the collection dates back to 1985 and expansion lasted until 2000. The cells were constantly kept in liquid nitrogen stored into 6 cryogenic tanks provided of alarm system. In 2011 the viability of cells secreting a monoclonal antibody directed to the plant hormone, Abscisic acid was verified and the result was positive.

With the support of the Biodati program we plan to upgrade the collection and present it to the diagnostic industry operators to exploit the enormous wealth pooled.

Parole chiave

Anticorpo monoclonale, virus vegetale, ormone vegetale, benzodiazepina, THC

Keywords

Monoclonal antibody, plant virus, plant hormone, benzodiazepine, THC

1.1 Origine e impiego degli anticorpi monoclonali

Un anticorpo monoclonale è il prodotto di una linea cellulare derivata da un unico linfocita immunocompetente ibridizzato (fuso) con una seconda cellula di tipo tumorale che gli conferisce la caratteristica di riprodursi indefinitamente (Köhler e Milstein 1975).

* doi:10.4458/0986-62

Quando un antigene, di solito costituito da una proteina, viene iniettato in un animale a sangue caldo si attiva il suo sistema immunitario e le cellule preposte a questa funzione iniziano a secernere anticorpi diretti verso l'antigene (immunogeno). L'insieme di questa risposta immunitaria viene condensata nel siero e nel così detto anticorpo policlonale. In questo caso l'attività è rappresentata da tutte le immunoglobuline secrete dall'insieme delle cellule del sistema immunitario e che interagiscono con affinità e specificità variabile nei riguardi dell'antigene. In questo tipo di antisiero ci possono essere anche immunoglobuline (IgG) dirette verso molteplici antigeni che nel corso della vita dell'animale hanno, a loro volta, stimolato il suo sistema immunitario. Mediante la tecnica della fusione cellulare tra i linfociti immunocompetenti, prelevati normalmente dalla milza ed una linea tumorale di tipo mieloma, ottenuta dalla stessa specie animale, si ottiene una popolazione rappresentativa di tutta la risposta immunitaria sviluppata dall'animale. In una prima fase, queste cellule rese immortali (ibridomi) e secernenti immunoglobuline formano una popolazione indifferenziata e producono ancora un insieme di IgG che costituiscono l'antisiero policlonale. Si deve quindi procedere all'isolamento di un adeguato numero di singole cellule (figura 1), le quali verranno allevate individualmente (monoclonale) ed il loro prodotto (anticorpo monoclonale), verrà testato quanto prima per accertare il tipo di interazione con l'antigene in studio. L'operazione dell'isolamento (clonazione) e della valutazione dell'attività dell'anticorpo monoclonale è quella più delicata e critica. Il metodo perfezionato e ottimizzato da Fazekas de st. Groth. e Scheidegger. (1980) è stato da noi adottato nel corso degli anni. Il saggio che consente di valutare l'attività dell'anticorpo deve essere rapido e molto sensibile per riuscire ad individuare e separare perfettamente le linee cellulari monoclonali che sono in grado di produrre l'anticorpo con l'attività più adatta al test immunologico che si intende sviluppare. Ci sono anticorpi selezionati per test immunoenzimatici come l'ELISA, per test di immunofluorescenza, per l'immunoprecipitazione o per immunoaффinità etc. In pratica ogni anticorpo monoclonale sarà selezionato con il metodo con cui verrà impiegato e proprio per il fatto che è monoclonale risulterà monospecifico, privo delle possibili variazioni che si possono avere quando si usa un antisiero policlonale.

Una linea monoclonale può essere conservata per un tempo indefinito. Questo consente di avere sempre a disposizione anticorpi in quantità e con caratteristiche costanti nel tempo garantendo perciò la massima standardizzazione del saggio diagnostico.

La conservazione della linea cellulare monoclonale avviene mediante l'impiego dell'azoto liquido che garantisce la vitalità della cellula per un tempo illimitato. L'attenzione che va posta è quella di predisporre un numero adeguato di aliquote di cellule di riserva garantendo l'assoluta sanità e protezione da infezioni batteriche, fungine e da micoplasmi che possono causare la morte e la perdita definitiva della linea cellulare.

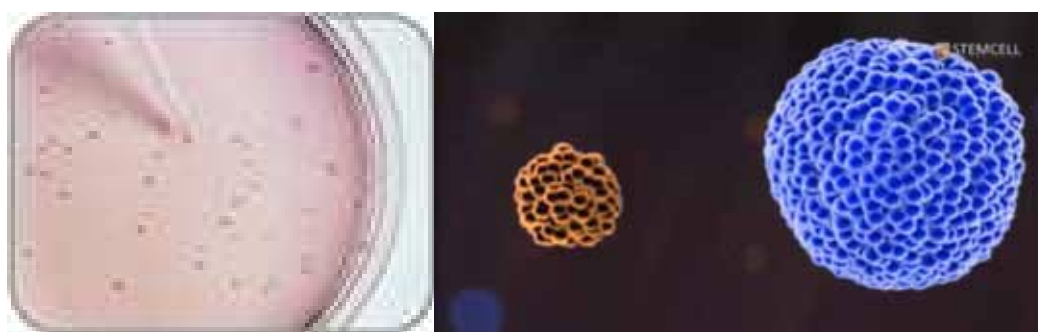


Figura 1 Piastra di coltura con singoli aggregati di cellule monoclonali e a destra, particolare di due cloni isolati allevati su mezzo di coltura semi-solido.

1.2. Materiali in mantenimento

Presso le due sedi del CRA-CIN sono mantenuti in azoto liquido ibridomi secernenti anticorpi monoclonali (Mab), linee cellulari tumorali di topo (ceppo Balb/c), funzionali alla preparazione degli ibridomi e sospensioni cellulari di milza di topo sottoposti a cicli di immunizzazioni con antigeni virali di interesse. Essi derivano da attività svolte tra il 1985 e il 2000, nell'ambito dei progetti finalizzati di ricerca Patata da seme, Bieticoltura, Orticoltura, Leguminose da granella,

Tecnologie avanzate, Benzodiazepine e Canapa, finanziati dall'allora Ministero per le Politiche Agricole. I programmi hanno consentito di produrre anticorpi per la diagnosi sierologica delle malattie da virus della patata, pomodoro, fagiolo, barbabietola, per decine di migliaia di campioni controllati dall'Unità Operativa fitopatologia dell'ex Sezione di Biologia e difesa del CRA-CIN nell'ambito dei citati progetti. Nello stesso periodo è stata avviata una collaborazione con la Clinica di Ematologia dell'Ospedale S. Orsola-Malpighi di Bologna per la produzione di anticorpi monoclonali diretti verso antigeni di cellule di Mieloma multiplo umano. Negli ultimi anni di attività, si è passati alla produzione di Mab destinati a rilevare molecole più piccole di quelle virali, come l'ormone vegetale acido abscissico, diverse benzodiazepine ed il principio attivo psicotropo della canapa (THC).

I test immunologici riescono a coniugare efficacemente elevata sensibilità con la rapidità, semplicità e il basso costo. Una volta prodotto l'anticorpo monoclonale specifico, la realizzazione del test immunologico risulta praticamente immortalato come il suo anticorpo. Gli anticorpi monoclonali, opportunamente preparati, sono stati ampiamente utilizzati nella diagnostica e nella terapia degli antigeni indicati in tabella 1. Nella tabella 2 sono elencate le linee di mieloma di topo utilizzati per le fusioni cellulari. La tabella 3 elenca le sospensioni di linfociti recuperati da milze di animali immunizzati con i diversi antigeni studiati da cui si potrebbero ricavare altri ibridomi secernenti anticorpi monoclonali. Nella tabella 4 sono elencate le linee cellulari, gli ibridomi e i monoclonali conservati a Rovigo. La conservazione in due luoghi ha anche lo scopo di evitare che un eventuale incidente in una sede, possa causare la perdita totale del patrimonio di linee cellulari prodotte.

Tabella 1 Ibridomi conservati a Bologna, secernenti anticorpi verso antigeni di virus vegetali e principali piante coltivate che risultano suscettibili a infezioni dei corrispondenti virus.

Quantità	Specificità verso antigeni virali di:	Principali specie agrarie suscettibili
12	AMV – Alfalfa mosaic virus	Patata, Pomodoro, Peperone, Fagiolo, Tabacco, Lattuga, Erba medica
38	BCMV – Bean common mosaic virus	Fagiolo
73	BMV – Beet mild yellowing virus	Barbabietola da zucchero
30	BNYVV – Beet necrotic yellow vein virus	Barbabietola da zucchero
18	CMV – Cucumber mosaic virus	Pomodoro, Peperone, Fagiolo, Spinacio, Cucurbitacee e oltre 1200 specie
19	CMV (TFN) – Cucumber mosaic virus	Pomodoro, Peperone, Fagiolo, Spinacio, Cucurbitacee e oltre 1200 specie
45	PLRV – Potato leaf roll virus	Patata
11	PPV – Plum pox virus	Pesco, Albicocco, Susino, Ciliegio
11	PVS – Potato virus S	Patata
55	PVX – Potato virus X	Patata, Pomodoro
83	PVY⁰ – Potato virus Y (type strain)	Patata, Pomodoro, Peperone, Tabacco
5	PVY^N – Potato virus Y (necrotic)	Patata, Pomodoro, Peperone, Tabacco
103	TMV (PM1) – Tobacco mosaic virus	Pomodoro, Tabacco, Peperone, Cetriolo
26	TMV (PM34) – Tobacco mosaic virus	Pomodoro, Tabacco, Peperone, Cetriolo
2	TMV (NL0) – Tobacco mosaic virus	Pomodoro, Tabacco, Peperone, Cetriolo
12	TMV (NL1) – Tobacco mosaic virus	Pomodoro, Tabacco, Peperone, Cetriolo

Tabella 2 Linee cellulari tumorali di topo.

Quantità	Tipo:	Caratteristica
1	X63 Ag8	Mieloma di topo
1	PAI	Mieloma di topo
1	Sp2/OAg-14	Mieloma di topo

Tabella 3 Sospensioni cellulari di milza di topi Balb/c sottoposti a cicli di immunizzazioni con antigeni specifici (virus purificati), conservati a Bologna.

Quantità	Antigeni utilizzati nell'immunizzazione:	Caratteristica
1	AMV – Alfalfa mosaic virus	Cellule di milza
1	BNYVV – Beet necrotic yellow vein virus	Cellule di milza
1	PLRV – Potato leaf roll virus	Cellule di milza
1	PVA – Potato virus A	Cellule di milza
1	PVM – Potato virus M	Cellule di milza
1	PVS – Potato virus S	Cellule di milza
2	PVX – Potato virus X	Cellule di milza
1	PVY^N – Potato virus Y (necrotic)	Cellule di milza
1	TMV – Tobacco mosaic virus (misto ceppi)	Cellule di milza

1.3 Esempi di applicazione degli anticorpi monoclonali

I primi anticorpi sviluppati sono scaturiti da una fattiva collaborazione tra il CRA-CIN e l'Istituto di Ematologia, M. e L. Seragnoli dell'Ospedale S. Orsola-Malpighi di Bologna che aveva acquisito la tecnica in Inghilterra, direttamente nel laboratorio di Milstein. Questa occasione ci ha permesso di avviare questa attività. Il primo argomento di studio è stato la patologia umana denominata mieloma multiplo e gli anticorpi prodotti reagivano verso antigeni specifici di cellule tumorali che causavano questa patologia (Tazzari et al. 1987). I Mab ottenuti sono stati clinicamente utilizzati per identificare ed eliminare le cellule di mieloma multiplo dal sangue di numerosi pazienti affetti da questa patologia (Lemoli et al. 1989).

In seguito, si è iniziato ad applicare la tecnica alla produzione di Mab specifici verso antigeni virali ed in particolare per diagnosticare il virus del mosaico del tabacco (TMV) e il virus della rizomania della barbabietola da zucchero (BNYVV). In quest'ultimo caso gli anticorpi hanno consentito di riconoscere antigeni del virus che sino allora non erano stati rilevati (Koenig et al. 1990; Commandeur et al. 1992) e di realizzare un test DAS-ELISA altamente specifico e riproducibile. Il test ha permesso di valutare livelli molto bassi di virus e di assistere il miglioramento genetico per la resistenza alla malattia, in modo più preciso ed affidabile rispetto al metodo basato sull'impiego degli anticorpi policlonali (Grassi et al. 1988).

Nell'ambito del progetto patata ci si è concentrati sui principali virus che infettano questa pianta, come PVX, PLRV, PVY, PVS, e sull'acido abscissico, un ormone legato al fenomeno dello stress da siccità. In questo caso, l'anticorpo monoclonale diretto verso una molecola molto piccola, non potendo essere impiegato in un test immunologico di tipo diretto, è stato utilizzato per realizzare un sensibile test indiretto di tipo immunofluorimetrico (Baccigalupo et al 1988) oltre al test ELISA indiretto (Moschella e Grassi. 1997).

Due dannosi virus vegetali, CMV e PVY che infettano il pomodoro da industria sono stati studiati mediante un gruppo di Mab (Grassi et al. 1995). Entrambi i virus sono presenti nelle coltivazioni con numerosi ceppi che possono produrre sintomi e causare danni di intensità molto variabile, come nel caso del ceppo necrotico di PVY. L'elevata specificità degli anticorpi monoclonali ottenuti ha consentito di svolgere indagini epidemiologiche che non si sarebbero potute realizzare con anticorpi policlonali (Grassi et al. 1987). Con l'avvio del progetto riguardante la presenza delle benzodiazepine nella patata sono stati prodotti diversi Mab diretti verso tre molecole di questa famiglia: Oxazepam, Temazepam e Nitrazepam. Queste molecole, avendo un peso molecolare che non induce una sufficiente risposta immunitaria, devono essere coniugate con una proteina "supporto" (albumina bovina). In questo modo il sistema immunitario, oltre all'albumina, riconosce anche la molecola di interesse e si possono ottenere anticorpi da utilizzare in ELISA indiretta (Grassi et al. 1997a; 1997b; 1998) Il livello di sensibilità raggiungibile con questo test è molto elevata e soprattutto il costo dell'analisi è decisamente più contenuto rispetto a quello dei metodi alternativi commercialmente disponibili.

1.4 Problematiche attuali per la produzione e la gestione dei monoclonali

A distanza di circa un decennio dal momento in cui l'attività di produzione degli anticorpi monoclonali si è interrotta, l'interesse e la richiesta di anticorpi monoclonali è ancora presente e sono aumentate le aziende che utilizzano Mab in kit diagnostici di vario tipo. Nel contempo sono diminuite le risorse per programmi di ricerca su queste tematiche. Inoltre, il processo di produzione degli anticorpi monoclonali oggi presenta ulteriori complessità per quanto riguarda la gestione degli stabulari dove sono allevati gli animali da esperimento. Anche la moltiplicazione delle cellule e la produzione di consistente quantità di siero monoclonale in vivo, mediante la moltiplicazione all'interno del peritoneo dell'animale, non è più consentito e perciò le cellule devono essere moltiplicate in mezzi di coltura artificiali, con costi di produzione sensibilmente più elevati. L'attuale situazione finanziaria dei centri di ricerca non consente assolutamente di portare avanti un'attività di colture cellulari per la produzione di anticorpi monoclonali senza specifici e costanti programmi di ricerca adeguatamente finanziati. In definitiva, essendo aumentati i costi, solo aziende specializzate e dedicate alla produzione di test diagnostici, potrebbero riprendere le linee di monoclonali, completarne la caratterizzazione per la produzione di test diagnostici commerciali, valorizzando un importante patrimonio accumulato dal CRA-CIN.

Tabella 4 Collezione di linee cellulari e ibridomi conservati presso il CRA-CIN di Rovigo

N° prog.	Determinate antigenico	Anno conser.	Specie di ibridoma	Name	Posizione Contenitore	Origine	Ibridomi	Mab	Fiale Disponibili
1	c-MYC (Human)	1993	Topo	ATCC CRL-1729	1-Ro	Commerciale			4
2	Mouse IgG K-ch	1993	Ratto	ATCC HB-58	1-Ro	Commerciale			8
3	Mouse IgG2	1993	Ratto	ATCC HB-92	1-Ro	Commerciale			8
4	Mieloma	1994	Topo	X-63-Ag8-653	1-Ro	Commerciale			>10
5	Mieloma	1996	Ratto	MYR	1-Ro	Commerciale			4
6	Linea cellulare	1997	Uomo	Vero cell	1-Ro	Commerciale			5
7	Oxazepam	1994	Topo	Oxaz-9-BDZ	1-Ro	CRA-CIN	>10	>10	40
8	Bovin serum alb.	1994	Topo	BSA-Mab mix	1-Ro	CRA-CIN	2		4
9	Oxazepam	1994	Topo	Oxaz-Mab	1-Ro	CRA-CIN	>10	>10	40
10	CMV	1994	Topo	CMV-Mab	1-Ro	CRA-CIN	>10	6	30
11	BNYVV	1994	Topo	BNYVV	1-Ro	CRA-CIN	>10	3	6
12	<i>Bacillus thuring.</i>	1994	Topo	Tossina BT-26	1-Ro	CRA-CIN	>10	>10	60
13	Acido Abscissico	1996	Topo	ABA-Mab	2-Ro	CRA-CIN	>10	8	20
14	Temazepam	1996	Topo	Temaz-Mab	2-Ro	CRA-CIN	>10		30
15	Nitrazepam	1996	Topo	Nitraz_Mab	2-Ro	CRA-CIN	>10		30
16	Tetraidrocannabin.	1996	Topo	THC-Mab	2-Ro	CRA-CIN	>10	1	16
17	Tiroglobulina	1996	Topo	Tyro-Mab	2-Ro	CRA-CIN	6		12
18	Proteina 3a CMV	1998	Topo	3a prot-CMV-Mab	2-Ro	CRA-CIN		4	8
19	Hum-Myelom_M	1998	Topo	Hum-Myel-Multiple	2-Ro	CRA-CIN		3	12

1.5 Bibliografia

- Baccigalupo M.A., A. Ius, G. Meroni, G. Grassi & A. Moschella. 1998. Time resolved fluoroimmunoassay of abscisic acid in potato leaves. *Analyst*, 123, 731-733.
- Commandeur U., R. Koenig, D.E. Lesemann, L. Torrance, W. Burgermeister, Y. Liu, A. Schots, M. Alric & G. Grassi. 1992. Epitope mapping on fragments of beet necrotic yellow vein virus coat protein. *Journal of General Virology*. 73, 695-700.
- Fazekas de st. Groth, S. & D. Scheidegger. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35, 1-21.
- Grassi G., Cerato C., P. Benso & S. Suppini. Serological differentiation of PVY strains by means of monoclonal antibodies. 1987. Atti: EAPR- Virology Section Meeting, 5-9 June Budrio, (Relazione orale), p. 14.
- Grassi G., C. Cerato, P. Benso & S. Borgatti. 1988. Monoclonal and conventional antibodies for the detection of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in sugar beet. *Phytopathologia mediterranea*. 27, 125-132.
- Grassi G., A. Moschella, L. Roncuzzi, I. Giordano, P. Roggero e E. Ramasso. 1995. Applicazione degli anticorpi monoclonali nell'epidemiologia del CMV e del PVY su pomodoro da industria del Mezzogiorno. Atti del Convegno: Moderni indirizzi nella protezione del pomodoro dalle malattie, Roma, settembre 11 - 13. *Petria*, (supplemento) 1, 46-47.
- Grassi G. e A. Moschella. 1997a. Metodo immunoenzimatico per l'individuazione di sostanze benzodiazepino- simili in estratti di patata. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*. 26, 2, 13-17.
- Grassi G., R. Magnani & L. Roncuzzi. 1997b. Evaluation of the content of benzodiazepine-like molecules in some foods. *Italian Journal of Food Sciences*. 1, (9), 71-74.
- Grassi G., G. Giraudi, A. Moschella, C. Giovannoli & C. Baggiani. 1998. Production of antibodies against benzodiazepine-like for competitive enzyme immunoassay detection in plant extracts. *Italian Journal of Food Sciences*. 1, (10), 5 -16.
- Koenig R., U. Commandeur, D.E. Lesemann, W. Burgermeister, L. Torrance, G. Grassi, M. Alric, J. Kallerhoff & A. Schots. 1990. Antigenic analysis of the coat protein of beet necrotic yellow vein virus by means of monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*. 71, 2229-2232.
- Köhler G. e C. Milstein 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature* 256 (5517): 495-7.
- Lemoli R.M., Gobbi M., Tazzari P.L., Tassi C., Dinota A., Visani G., Grassi G.P., Mazza P., Cavo M., Tura S. Bone marrow purging for multiple myeloma by avidin-biotin immunoadsorption. *Transplantation* 47: 385-387, 1989.
- Moschella A. & G. Grassi. 1997. Evaluation and production of monoclonal antibody against Abscisic acid for water stress in potato plant. Atti del: Joint conference of EAPR and Eucarpia. Viterbo (IT) 10-12 March.
- Tazzari P.L., M. Gobbi, A. Dinota, A. Bontadini, G. Grassi, C. Cerato, M. Cavo, S. Pileri, F. Calligaris-Cappio & S. Tura. 1987. Normal and neoplastic plasma cell membrane phenotype studies with new monoclonal antibodies. *Clinical Experimental Immunology*, 70, 192-200.

COLLEZIONE DI LIEVITI VINARI: QUALITÀ METABOLICHE DEI CEPPI PER UNA MIGLIORE CARATTERIZZAZIONE DELLE PRODUZIONI DEL TERRITORIO*

Responsabili Scientifici: Dr. Gaetano Ciolfi, Dr.ssa Simonetta Moretti, Dr.ssa Francesca Cecchini, Dr. Paolo Pietromarchi, Dr. Domenico Tiberi, Dr. Massimo Morassut, Dr. Stefano Favale, Alberto Cedroni, Carmine Santucci

CRA-ENC Unità di ricerca per le produzioni enologiche dell'Italia centrale
Via Cantina Sperimentale, 1 – 00049 Velletri (RM)

Riassunto

L'Unità di ricerca per le produzioni enologiche dell'Italia centrale, da sempre, ha operato nel settore della ricerca microbiologica finalizzata all'isolamento di stipiti di lievito e alla raccolta di dati utili per una migliore comprensione del metabolismo del lievito per un ottimale impiego in vinificazioni. Un nostro ceppo S6u è stato oggetto di una licenza di produzione "Lallemand" e la sua diffusione, allo stato secco, copre tutti i Paesi enologici.

Infatti, il miglioramento delle caratteristiche qualitative del vino è un problema sempre attuale e di grande importanza per l'industria enologica.

La qualità delle uve e l'utilizzo di nuove tecnologie impiegate nel processo di fermentazione, hanno permesso di ottenere dei vini dalle pregevoli caratteristiche organolettiche. L'identificazione di ceppi di lievito con caratteristiche enologiche particolari, ha consentito un ulteriore perfezionamento del processo fermentativo.

In prospettiva, anche il miglioramento genetico di ceppi già esistenti può rivelarsi un versatile strumento per potenziare proprietà industrialmente rilevanti.

Lo scopo di questa trattazione è quello di informare sui principali caratteri enologici di una serie di lieviti vinari e la loro tipizzazione molecolare attraverso un sistema di riconoscimento, sufficientemente sensibile, basato sull'impiego della tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction). Tale sistema permette di seguire la percentuale di impianto di un ceppo durante la fermentazione su mosto filtrato in alternativa al metodo classico di identificazione metabolica. Questa metodologia può consentire di seguire l'andamento della flora lievitifforme durante la fermentazione e quindi di poter intervenire nel caso in cui i ceppi inoculati non riuscissero a prevalere sulla microflora indigena del mosto.

Summary

Our Research Unit has always worked in the field of microbiological research aimed to the isolation of strains of yeast and the collection of data useful for better understanding of the metabolism of the yeast for optimal use in winemaking. One of our S6U strain has been the subject of a production license "Lallemand" and its spread in the dry state covers all the wine-producing countries.

In fact, the improvement of quality of wine is an ever present problem of great importance for the wine industry.

The quality of the grapes and the use of new technologies in the fermentation process, have led to wines with exquisite characteristics. The identification of wine yeast strains with particular characteristics, allowed a further refinement of the fermentation process.

In perspective, the genetic improvement of existing strains can be a versatile tool to enhance industrially relevant properties.

The purpose of this paper is to inform about the main characters in a series of wine yeast strains and their molecular typing through a recognition system, sensitive enough, based on the use of PCR technique (Polymerase Chain Reaction). This method allows to follow the rate of implantation of a strain during fermentation of filtered must as an alternative to the classical method of metabolic identification. This analytical technique may allow to track the performance of microflora during the fermentation and then to intervene in the case the inoculated strains fail to prevail on the indigenous microflora of the must.

* doi:10.4458/0986-63

Parole chiave

Lieviti, vino, fermentazione, metabolismo

Keywords

Yeast, wine, fermentation, metabolism

1. Metodi per la caratterizzazione dei lieviti vinari

Normalmente i lieviti vengono isolati nel corso di fermentazioni spontanee o nel corso della conservazione dei vini in cantina. Dopo una prima valutazione delle caratteristiche enologiche soprattutto per ciò che attiene alla produzione di alcol, acidità volatile, solfiti e schiuma, viene condotto uno studio metabolico particolareggiato volto alla individuazione dei campi di applicazione pratica in cantina.

Gli stipiti appartengono al genere *Saccharomyces*, specie *cerevisiae*, razza fisiologica (r.f.) *uvarum* (S1u, S2u, S4u, S6u), r.f. *bayanus* (S1b, S4b, S9b, S16b, SbC2), r.f. *cerevisiae* (S1c, S5c, S7c, S11c, S20c, S25c, AT1, VT12), r.f. *italicus* (S2i), r.f. *prostoserdovii* (Prosto), *Schizosaccharomyces japonicus* (Schiz.3).

(Sistematica secondo: Kreger-van Rij N.J.W. (1984) The Yeast – a taxonomic study, Elsevier).
In *Saccharomyces cerevisiae*, i caratteri enologici possono essere suddivisi in due grandi categorie:

- **caratteri tecnologici.** Sono quelli che consentono di guidare la fermentazione nelle varie fasi in modo ottimale e programmato (Tab.1);
- **caratteri di qualità.** Sono quelli che provocano un miglioramento di qualità dei vini per effetto della formazione (o non formazione) di taluni composti o per azione su alcuni componenti dei vini (Tab.2).

Tabella 1 Caratteri tecnologici che influenzano il processo di vinificazione

-
- vigore fermentativo
 - alcol tolleranza
 - resistenza all'anidride solforosa
 - tipo di crescita cellulare: disperso o flocculento
 - formazione di schiuma
 - formazione di velo
 - capacità di sedimentare rapidamente
 - fattore "killer"
 - sviluppo a basse temperature (lieviti criotolleranti)
-

Tabella 2 Caratteri qualitativi che influenzano la qualità del vino

-
- basse produzioni di acidità volatile
 - bassa produzione di idrogeno solforato
 - produzione di solfiti
 - degradazione dell'acido malico
 - bassa produzione di accettori di SO₂
 - produzione di prodotti secondari della fermentazione
 - produzione di glicerina
 - capacità di autolisare a basse temperature
 - potere stabilizzante del colore.
-

Tabella 3 Caratteristiche dei ceppi isolati e impiegati nelle prove metaboliche su 100 litri di mosto termocondizionato a 20°C (data di inoculo:08/01/02)

Ceppo	Fenotipo	H₂S	Aroma	Schiuma
S1u	K	+	comp.solforati	-
S2u	K	-	ac.grassi	-
S4u	K	+	comp.solforati	-
S6u	S	-	Acetati (-)	-
S1b	S	+	isoam.acetato	++
S4b	K	+	comp.solforati	+
S9b	S	+	fruttato (affumicato)	+++
S16b	K	++	fruttato	+++
SbC2	S	-	fruttato (lievito)	+
S1c	S	-	fruttato	+++
S5c	K	+	florale	+
S7c	S	+	neutro (floccula)	+
S11c	S	+	Fruttato (-)	++
S20c	S	+	florale	+++
S25c	K	+	Fruttato (-)	++
AT1	K	+	fruttato	+
VT12	K	+	Fruttato (-)	+
S2i	N	-	fruttato	++
Prosto	N	-	crosta di pane	+
Schiz3	N	-	smalto	+++

Legenda schiuma:

- piccoli grumi sparsi con più del 90% di superficie libera
- + superficie libera da schiuma inferiore al 50%
- ++ tutta la superficie coperta da schiuma con spessore massimo 1 cm
- +++ tutta la superficie coperta da schiuma con spessore maggiore di 1 cm

Legenda idrogeno solforato (H₂S)

- bassi produttori di idrogeno solforato
- + medi produttori di idrogeno solforato
- ++ alti produttori di idrogeno solforato

Le caratteristiche iniziali del mosto utilizzato, sono riportate in Tabella 4, tenendo conto solo dei parametri significativi ai fini enologici.

Tabella 4 Composizione chimico-fisica del mosto utilizzato.

Acidità totale	6,00 g/L
SO₂ totale	3,2 mg/L
pH	3,20
Zuccheri	20,44%
Glicerina	0,9 g/L
Acetaldeide	21 mg/L
Acido malico	3,41 g/L

Inoltre il mosto presentava una flora microbica naturale riportata qui di seguito:

- *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum*: 8%
- *Kloekera apiculata*: 8%
- *Candida sp.*: 62%
- *Pichia membranaefacies*: 18%
- *Rhodotorula sp.*: 4%

Inoculo 10⁶ cellule/mL di ciascuno stipite.

1.2 Analisi dei parametri finali del prodotto di fermentazione e loro relazione metabolica

Il metabolismo del lievito rappresenta l'espressione della composizione nutrizionale dei mosti, quindi delle uve nonché l'interazione tra il territorio e la cultivar viticola.

È evidente come la migliore risposta metabolica che consenta di caratterizzare un vino del territorio sia legata anche alla ricerca del ceppo di lievito che meglio identifica una tipologia di prodotto.

Di seguito vengono riportate le considerazioni finali circa i parametri metabolici più significativi.

1.2.1 Anidride solforosa

Nel mosto sterile utilizzato per l'inizio delle nostre fermentazioni, i solfiti dosati come anidride solforosa (SO₂), sono risultati 3,2 mg/L. Il lievito che ha evidenziato una minore tendenza a produrre solfiti è *Saccharomyces prostoserdovii* (Tab.5); tale lievito possiede un metabolismo piuttosto lento dal momento che, normalmente, ha bisogno di una buona presenza di ossigeno. Nella moderna tecnologia enologica assume un rilevante interesse per ciò che attiene all'elaborazione di vini speciali affinati sotto velo, lavorazioni tipiche di alcune vernacce. *Saccharomyces prostoserdovii*, infatti, sviluppa un velo sulla superficie dei vini producendo acetaldeide e formando glicerina in concomitanza di altri prodotti aromaticamente importanti.

Alcuni lieviti esaminati, hanno la tendenza a produrre elevate quantità di SO₂ e di conseguenza sono generalmente propensi a produrre anche elevate quantità di idrogeno solforato, questo perché, in via prioritaria, i composti dello zolfo costituiscono via elitaria nell'attività ossidoriduttiva cellulare comportandosi come accettori di elettroni. E' evidente che, in questi casi, sia la natura del mosto, che la composizione micronutritiva dello stesso, assumono ruoli determinanti e nello stesso tempo condizionano il metabolismo del lievito. Per tal motivo, una maggiore disponibilità di ossigeno o di accettori di elettroni a livello cellulare possono indirizzare l'attività metabolica nella direzione di una minore produzione di composti solforati, composti estremamente indesiderati dal momento che l'anidride solforosa è un forte accettore di acetaldeide. Infatti, la SO₂ si combina in parte con l'aldeide acetica impedendone la riduzione ad etanolo, provocandone l'accumulo e deviando la fermentazione a favore della glicerina. Tutto ciò va a compromettere la possibilità di aggiunte finali di anidride solforosa.

Inoltre la sintesi di idrogeno solforato, anche in tracce, rappresenta un elemento di forte disturbo all'aroma sia in quanto tale che sottoforma di mercaptani.

Come si può osservare in tabella 5, il maggiore produttore di anidride solforosa (SO₂) risulta essere *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* (S1b) con un valore di 60,8 mg/L, seguono *Saccharomyces cerevisiae*, r.f. *cerevisiae* (S20c) ed infine *Saccharomyces cerevisiae*, r.f. *bayanus* (S16b) rispettivamente con 49,6 e 43,2 mg/L.

Questi valori riscontrati al termine del processo fermentativo sono stati considerati assolutamente non in linea con una corretta fermentazione; infatti, produzioni al di sopra di 20 mg/L sono indesiderabili. È da precisare, altresì, che questi lieviti, produttori tenori così elevati di solfiti, non devono essere considerati del tutto negativi. Gli stessi devono essere utilizzati conoscendo quali sono i limiti di un loro impiego, predisponendo il mosto in fermentazione con opportuni interventi volti a riequilibrare la composizione nutrizionale con incremento di ossigeno, di calcio pantotenato e solidi sospesi, cercando di evitare un eccessivo contatto con le fecce e valutando l'opportunità di impiego su mosti provenienti da uve troppo ammuffite o sottoposte a macerazione prolungata.

1.2.2 Acidità volatile

Per gli stipiti citati sopra, in particolare S16b e S9b, entrambi della razza fisiologica *bayanus*, oltre ad una elevata produzione di SO₂ e di idrogeno solforato, si nota anche una elevata produzione di acidità volatile, ovvero di acido acetico. Un'analisi dettagliata dei parametri finali di tabella 5 ha focalizzato l'attenzione su altri due stipiti: genere *Schizosaccharomyces*, specie *japonicus*, e genere *Saccharomyces*, specie *prostoserdovii*. Il primo, ha rilevato di possedere una notevole attività esterasica e pertanto nel corso della fermentazione alcolica produce elevate dosi di acetato di etile con conseguente valore basso di acido acetico; questo carattere

è di tipo genetico. Il secondo, essendo un lievito che ha un metabolismo maggiormente aerobico, produce tendenzialmente limitate quantità di acido acetico.

Anche le razze fisiologiche *uvarum* (S1u, S2u, S4u, S6u) sono inclini a produrre acido acetico in quantità limitate; questo fatto può essere spiegato in quanto questi lieviti hanno una maggiore capacità a produrre acidi grassi e a riversare nella loro via biosintetica acetili da acetilCoA. Produrre più acidi grassi vuole anche significare una maggiore esigenza nutrizionale soprattutto nella fase finale della fermentazione, poiché un accumulo degli stessi, all'interno della cellula può essere un fattore dannoso per la cellula stessa e contribuire anche alla sua morte. Pertanto le razze fisiologiche *uvarum* sono caratterizzate da dipendenza assoluta dall'inositolo, un polialcole costituente fondamentale delle membrane cellulari, considerato un fattore determinante durante la divisione cellulare. Questo composto è sempre presente e copioso nei mosti naturali. A conferma di quanto abbiamo fin qui esposto possiamo addurre una osservazione di tipo ecologico: nel corso di una ipotetica fermentazione spontanea, si assisterebbe ad un avvicendamento di lieviti, caratterizzato all'inizio del processo da ceppi fortemente aerobici come *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus*.

Tutti gli altri valori, per quel che riguarda l'anidride solforosa e l'acidità volatile, sono da considerarsi nella norma per una corretta fermentazione alcolica.

1.2.3 Etanolo

Non è detto che un lievito maggiormente resistente all'alcol possieda anche una velocità di fermentazione più elevata, dal momento che la velocità di fermentazione dipende dall'efficienza dell'enzima "alcoldeidrogenasi", mentre la resistenza "alcol", dipende dalla composizione delle membrane e dall'attività metabolica cellulare. Le due attività interagiscono in relazione alla composizione del mosto e quindi con i trattamenti che gli stessi subiscono prima dell'avvio della fermentazione. Da non trascurare le condizioni ambientali, infatti, a pari condizioni nutrizionali, un abbassamento della temperatura se da un lato fa diminuire la produzione unitaria di alcol, dall'altro ne aumenta la resistenza allo stesso. Questo è tanto più vero quanto il lievito risulta essere "grasso" ovvero maggiormente incline alla produzione di acidi grassi. Questo è il caso della razza fisiologica *uvarum*. Se consideriamo lo stipite S6u è possibile fare alcune osservazioni particolari: è un lievito che viene ampiamente impiegato nelle fermentazioni industriali; fenotipicamente esprime i caratteri fondamentali propri della r.f. *uvarum* (elevata produzione di feniletanolo, glicerina e acidi grassi, pronunciata criofilia, totale fermentazione del raffinoso), genotipicamente è un ibrido (*cerevisiae*) x (*uvarum*).

1.2.4 Glicerina

Nelle fermentazioni effettuate sui nostri campioni, si sono evidenziate alcune caratteristiche molto più inclini verso la razza *cerevisiae*; una di queste è la produzione di acidità volatile pari a 0,61 g/L. Questo risultato è chiaramente attribuito ad una carenza di micronutrienti come vitamine (Ca-pantotenato) e/o magnesio e zinco.

Queste situazioni possono verificarsi in quanto i mosti in un contesto industriale vengono demetallizzati e spesso trattati con prodotti chiarificanti come bentoniti e gelatine. È evidente, comunque, che qualsiasi processo fisico che comporta un abbattimento di proteine causa anche un impoverimento costituzionale del mosto; in particolare, la frazione proteica metabolicamente più attiva, viene fortemente ridotta.

In tali condizioni si verifica uno squilibrio tra acetaldeide disponibile e alcol unitario prodotto; l'eccesso di acetaldeide viene convertito in acido acetico dal momento che la produzione di nuova sostanza organica ha raggiunto l'equilibrio fisiologico. Un legame a tali anomalie è la bassa produzione di glicerina. La spiegazione di quanto sopra asserito, è determinato dal fatto che: qualora si riduce la produzione unitaria di alcol, simultaneamente aumenta invece la concentrazione intracellulare di acetaldeide e di acido acetico.

Tale condizione incide in maniera rilevante sulla fermentazione gliceropiruvica. Infatti dagli zuccheri si forma gliceraldeide-3-fosfato da cui origina acido piruvico e NADH₂; quest'ultimo va a scaricarsi sulla reazione che dal diossiacetonfosfato origina glicerina. Di seguito è riportato lo schema della fermentazione glicero-piruvica.

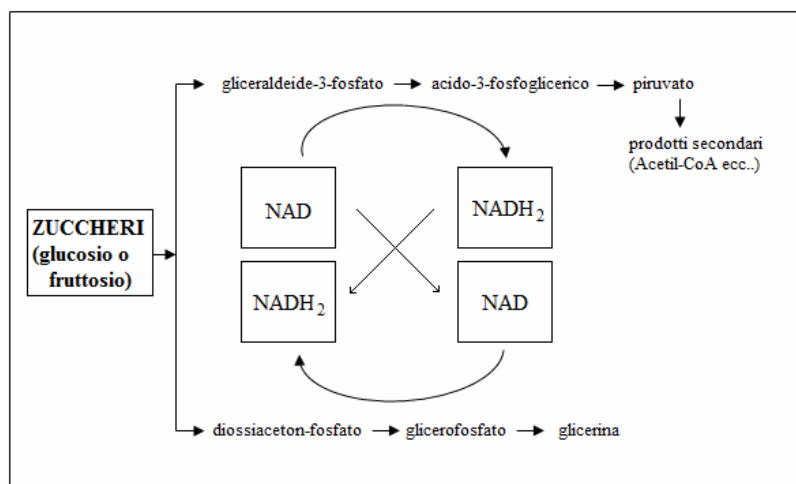


Figura 1 Schema della fermentazione glicero-piruvica.

È da tenere presente che la produzione di glicerina è fortemente influenzata dalla temperatura di fermentazione, nel senso che, temperature elevate comportano un aumento della sua produzione. Lo stipite che ha evidenziato una maggiore produzione di glicerina tra i 20 esaminati, è risultato essere *Schizosaccharomyces japonicus* (Schi 3) con un valore pari a 11,4 g/L, ovvero un grammo di glicerina ogni grado alcolico prodotto. Inoltre, buoni produttori risultano essere gli stipiti S9b, S16b, SbC2; si tratta di ceppi della razza fisiologica *bayanus* e non *uvarum* come ci si sarebbe aspettato.

Questo risultato trova spiegazione nella povertà del mosto in esame nel nostro lavoro, come più volte rimarcato.

1.2.5 Acetaldeide

Per quanto riguarda la produzione di acetaldeide occorre premettere che la sua elaborazione, come pure quasi tutti i composti secondari della fermentazione, avviene nella fase di crescita cellulare e cioè quando, anche se in quantità minime, l'ossigeno è ancora presente e inoltre il ciclo dell'acido citrico è in piena attività. Bisogna comunque sottolineare che a fine fermentazione il tenore di acetaldeide deve essere il più basso possibile tale da non superare i 20 mg/L. Questo perché tale composto si combina irreversibilmente con la SO₂ neutralizzandone gli effetti. In più, dosi elevate di acetaldeide sono indice di sofferenza cellulare e difficoltà fermentativa. Dosi elevate di acetaldeide evidenziano, altresì difficoltà di riassorbimento del composto, dal momento che durante la fase di crescita il suo valore può variare dai 100 mg/L fino a 400-500 mg/L a seconda dello stipite di lievito fermentante. Valori intorno ai 100 mg/L sono tipiche delle razze *cerevisiae* e *bayanus* mentre per *uvarum* si raggiungono dosi molto più elevate.

1.2.6 Acido malico

Nella tabella 5 è stato inserito il valore finale, per tutti i lieviti esaminati, di uno degli acidi organici più significativi dal punto di vista enologico: l'acido malico. Il metabolismo di questo acido, all'interno della cellula e cioè a livello del ciclo dell'acido citrico, è in equilibrio con ossalacetato. Può subire una degradazione via acido piruvico, quindi dare alcol etilico e acetilCoA, oppure essere sintetizzato dalla condensazione del glicossilato e acetilCoA nel ciclo del metabolismo degli aminoacidi.

Fatta questa breve derivazione metabolica, l'acido malico può essere in parte metabolizzato dal lievito (percentuale che varia da 0 a 20-30%), ed in parte sintetizzato a condizione che ci sia un metabolismo di base molto forte, una produzione di acetaldeide rilevante, e una produzione di acetil CoA elevata soprattutto nella fase di crescita cellulare. Sono queste tutte condizioni

che si possono verificare nel corso del metabolismo della razza fisiologica *uvarum* in condizioni nutrizionali ottimali, mentre per le razze fisiologiche *cerevisiae* e *bayanus* avremo una condizione di demolizione più o meno intensa.

Per il genere *Schizosaccharomyces*, invece, l'acido malico viene metabolizzato dall'85 al 99%; nella specie *japonicus* questa caratteristica è rilevante tale da risultare metabolizzato tutto l'acido malico (dalle prove effettuate: inizio fermentazione mosto base: 3,41 g/L; fine fermentazione: 0,05 g/L). Questo dato così rilevante è facilmente spiegabile perché il lievito *Schizosaccharomyces japonicus* opera una vera e propria fermentazione denominata malo-alcolica, rappresentata nello schema seguente:

Considerato che, da un punto di vista energetico, la fermentazione malo-alcolica non si presenta affatto utile all'attività metabolica della cellula, il motivo per cui essa avviene è legata alla notevole disponibilità, da parte del lievito, di enzima malico. Questa caratteristica è legata al fatto che *Schizosaccharomyces* è un forte produttore sia di acetato di etile (quindi maggiore utilizzo di acetaldeide verso acido acetico), che di acetoino (dalla condensazione di due molecole di piruvato).

Il maggiore utilizzo di acido piruvico e acetaldeide, deve essere in parte compensato da uno "shunt" produttivo, ovvero attraverso la via acido malico-acido piruvico-alcol etilico. Per contro una maggiore concentrazione endocellulare di acetaldeide induce un rallentamento del consumo degli zuccheri e una accresciuta capacità di sintesi di glicerina secondo il ben noto sistema di controllo biochimico detto a "feedback".

Tabella 5 Parametri finali relativi ai principali caratteri enologici dei lieviti esaminati

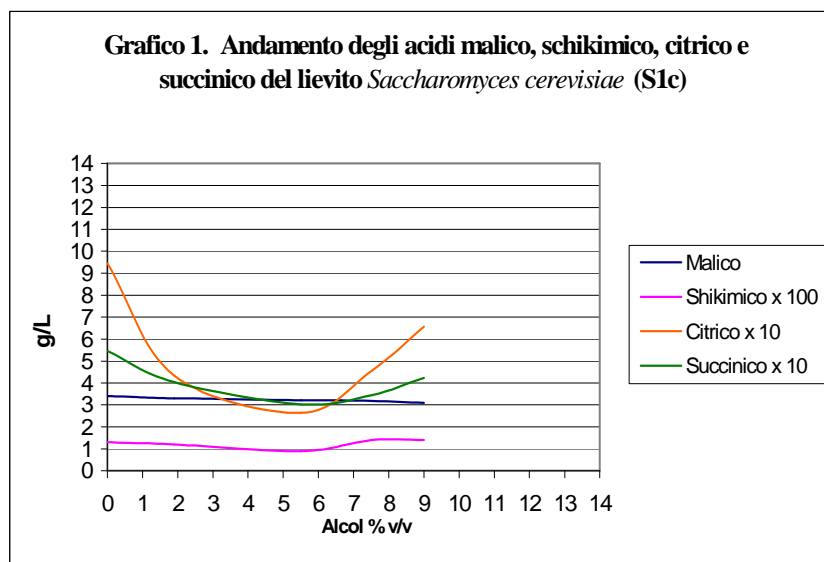
Campione	SO₂ tot. mg/L	Ac. Vol. g/L	Alcol svolto % Vol	Zuccheri Residui % w/v	Glicerina a g/L	Acetaldei de mg/L	Malico g/L
S1u	14,4	0,38	10,45	3,96	5,6	38	2,55
S2u	17,6	0,33	8,38	7,39	4,4	37	2,73
S4u	4,8	0,23	7,26	9,20	3,5	46	2,81
S6u	12,8	0,61	12,68	0,78	5,9	17	2,69
S1b	60,8	0,60	13,11	----	5,7	57	2,56
S4b	20,8	0,64	10,24	4,80	4,8	43	2,75
S9b	27,84	1,05	12,97	0,21	7,2	76	2,71
S16b	43,2	1,30	12,59	0,49	7,9	26	2,64
SbC2	22,4	0,96	12,34	1,43	7,2	33	2,61
S1c	34,8	0,87	9,00	6,72	4,7	42	3,09
S5c	19,2	0,72	12,29	1,43	5,3	30	2,84
S7c	11,84	0,51	12,28	1,37	5,0	26	3,21
S11c	17,6	0,76	11,58	2,24	6,1	29	2,71
S20c	49,6	0,58	12,82	0,42	5,6	48	2,34
S25c	8,0	0,60	13,01	----	5,4	22	2,69
AT1	8,0	0,41	12,95	----	4,5	21	2,98
VT12	4,8	0,72	13,01	----	5,6	21	2,55
S2i	14,4	0,54	12,22	1,49	5,2	21	2,87
Prosto	3,2	0,28	2,73	16,89	2,7	19	2,94
Schiz.3	5,44	0,12	11,38	1,66	11,4	8	0,05
Mosto base	3,2				0,9	21	3,41

1.2.7 Analisi degli acidi organici

Per la determinazione degli acidi organici è stata utilizzata la tecnica di cromatografia liquida ad alta prestazione (H.P.L.C.) secondo il metodo Cane P. (1990). Sono stati eseguiti durante le fermentazioni, in media, sei prelievi per rilevare l'andamento degli acidi in funzione dell'alcol prodotto.

In Tabella 6 vengono riportati i valori espressi in g/L degli acidi esaminati nel corso della fermentazione alcolica del mosto sterile in beuta da litro. Tali valori sono stati utilizzati per la costruzione dei grafici in Allegato.

Come si può notare, l'andamento di ciascun parametro varia nel corso del processo fermentativo in relazione sia al ciclo vitale dello stipite di lievito sia per le condizioni del mosto. Nella Tabella 6 vengono riportate le variazioni percentuali dell'acido malico, citrico, succinico rispetto ai valori presenti ad inizio fermentazione. Normalmente l'acido malico viene metabolizzato in ragione variabile compresa tra il 5,87 e il 25,22 % in linea con quanto confermato dai numerosi studi fatti. Da notare, il comportamento degli stipiti S1c e S7c caratterizzati da una scarsa attitudine alla demolizione dell'acido malico. Si riporta come



esempio il grafico 1 del lievito S1c; per quanto riguarda il malico, la linea di tendenza, mette in risalto quanto già precisato sopra.

Per contro lo *Schizosaccharomyces japonicus*, come ampiamente descritto nella analisi dei parametri finali, metabolizza l'acido malico in regime del 98,53%.

Dal grafico 2 si evince la netta tendenza in pochi giorni da parte del lievito Schi 3 a consumare tutto l'acido malico.

Grafico 1 Andamento degli acidi malico, lattico, citrico e succinico del lievito *Saccharomyces cesrevisiae* (S1c).

Grafico 2. Andamento degli acidi Malico, Lattico, Citrico, Succinico del lievito *Schizosaccharomyces japonicus* (Schi3)

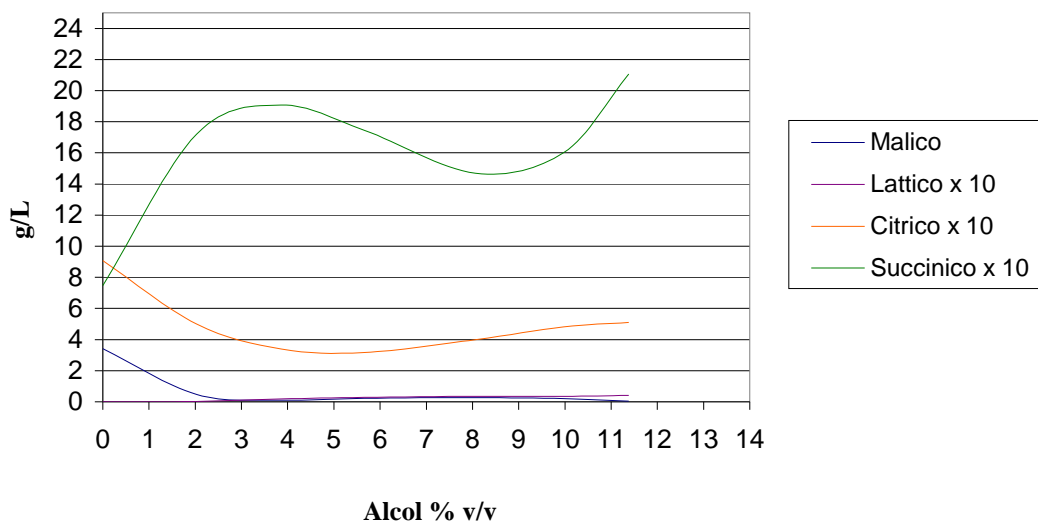


Grafico 2 Andamenti degli acidi malico, lattico, citrico e succinico del lievito *Schizosaccharomyces japonicus* (**Schi3**).

Per quanto riguarda l'acido citrico, nel corso della fermentazione, può essere parzialmente utilizzato dal lievito e solo in alcuni casi si assiste ad una sintesi.

Grafico 3. Andamento degli acidi citrico e succinico del lievito *Saccharomyces prostoserdovii* (prosto)

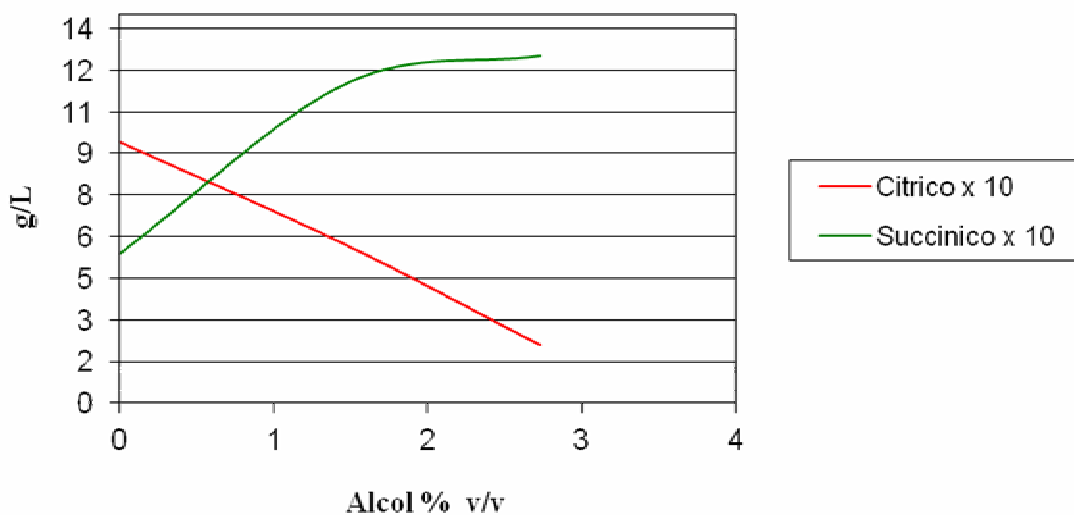


Grafico 3. Andamenti degli acidi citrico e succinico del lievito *Saccharomyces prostoserdovii* (**prosto**).

Il dato eclatante appare essere il comportamento di *Saccharomyces prostoserdovii* che evidenzia una chiara tendenza a consumare acido citrico con una variazione percentuale del 77,66% (vedi grafico 3).

I due stipiti, *Schizosaccharomyces japonicus* e *Saccharomyces prostoserdovii* sono risultati anche alti produttori di acido succinico.

Questo risultato assume un ruolo importante in relazione al possibile impiego dei due lieviti: il primo come agente demolente e il secondo come agente della maturazione dei vini sotto velo. In ambedue i casi un contenuto superiore contribuisce a rafforzare il potere tampone dei vini così ottenuti.

Tabella 6 Valore degli acidi organici esaminati nel corso della fermentazione alcolica di ciascun stipite espressi in g/L

Ceppo S6u						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
17/02/02	1,87	3,42	0,014	0	0,76	0,50
20/02/02	3,87	2,79	0,012	0	0,76	0,44
25/02/02	6,06	3,00	0,015	0	0,80	0,43
03/03/02	8,07	2,96	0,014	0	0,86	0,35
11/03/02	9,96	2,84	0,014	0	0,93	0,32
08/04/02	12,68	2,69	0,014	0	0,99	0,46
Ceppo AT1						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
16/02/02	1,11	3,00	0,012	0	0,76	0,37
20/02/02	3,91	3,11	0,013	0	0,77	0,45
24/02/02	6,36	3,17	0,013	0	0,76	0,40
28/02/02	8,14	3,22	0,012	0	0,63	0,32
06/03/02	9,97	3,19	0,013	0	0,67	0,39
19/03/03	12,95	2,98	0,013	0	0,78	0,40
Ceppo S2i						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
17/02/02	1,68	3,15	0,013	0	0,68	0,44
22/02/02	3,90	3,06	0,013	0	0,81	0,46
28/02/02	5,88	3,03	0,013	0	0,74	0,45
09/03/02	8,20	3,10	0,015	0	0,87	0,57
22/03/02	10,20	2,97	0,016	0	0,88	0,72
15/04/02	12,22	2,87	0,015	0	0,95	0,71
Ceppo S4b						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
18/02/02	1,58	2,97	0,013	0	0,64	0,58
25/02/02	3,53	2,97	0,012	0	0,63	0,57
01/03/02	4,48	2,93	0,012	0	0,70	0,57
18/03/02	7,79	2,94	0,015	0	1,02	0,63
09/04/02	10,24	2,75	0,014	0	1,12	0,62
Ceppo S1b						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
18/02/02	1,90	3,11	0,014	0	0,53	0,60
20/02/02	3,90	3,05	0,012	0	0,76	0,46

*Collezione di lieviti vinari: qualità metaboliche dei ceppi
per una migliore caratterizzazione delle produzioni del territorio*

24/02/02	6,83	2,93	0,013	0	0,58	0,31
27/02/02	8,85	2,84	0,013	0,05	0,64	0,30
02/03/02	10,48	2,84	0,012	0,09	0,55	0,25
13/03/02	13,11	2,56	0,010	0,13	0,67	0,27

Ceppo S16b

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
17/02/02	1,67	3,17	0,014	0	0,79	0,53
20/02/02	3,78	3,10	0,014	0	0,86	0,53
24/02/02	5,88	3,05	0,013	0	0,81	0,49
01/03/02	8,08	3,00	0,013	0	0,76	0,49
07/03/02	10,02	2,91	0,014	0	0,82	0,48
25/03/02	12,59	2,64	0,013	0	0,93	0,51

Ceppo S9b

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
21/02/02	1,77	3,09	0,012	0	0,87	0,69
26/02/02	3,79	3,12	0,013	0	0,82	0,52
04/03/02	5,95	3,02	0,013	0	0,87	0,61
11/03/02	8,26	2,96	0,014	0	0,99	0,58
22/03/02	10,26	2,86	0,013	0	1,05	0,50
15/04/02	12,97	2,71	0,014	0	1,38	0,54

Ceppo Sbc2

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
20/02/02	1,92	3,05	0,013	0	0,88	0,63
24/02/02	3,92	2,97	0,015	0	0,50	0,36
01/03/02	5,85	2,87	0,015	0	0,37	0,33
08/03/02	8,20	2,84	0,015	0	0,47	0,30
17/03/02	10,28	2,69	0,015	0	0,53	0,23
28/03/02	12,34	2,61	0,014	0	0,51	0,27

Ceppo S1c

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
24/02/02	1,90	3,30	0,012	0	0,45	0,42
07/03/02	5,51	3,22	0,009	0	0,23	0,27
22/03/02	7,51	3,18	0,014	0	0,49	0,38
11/04/02	9,00	3,09	0,014	0	0,64	0,41

Ceppo S5c

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
20/02/02	2,15	3,12	0,013	0	0,38	0,50
25/02/02	3,81	3,04	0,012	0	0,33	0,50
04/03/02	5,71	3,06	0,013	0	0,34	0,47
12/03/02	7,81	3,01	0,013	0	0,39	0,56
25/03/02	10,30	2,96	0,014	0	0,51	0,68
15/04/02	12,29	2,84	0,013	0	0,90	0,76

Ceppo S7c

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54

18/02/02	1,90	3,14	0,011	0	0,87	0,50
24/02/02	4,67	3,27	0,011	0	0,78	0,50
04/03/02	7,03	3,36	0,011	0	0,86	0,41
11/03/02	8,73	3,25	0,013	0,24	0,75	0,53
22/02/02	10,50	3,33	0,012	0,17	0,88	0,55
12/04/02	12,28	3,21	0,01	0,18	0,99	0,58

Ceppo S11c

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
19/02/02	1,89	3,15	0,011	0	0,81	0,51
24/02/02	3,94	3,01	0,012	0	0,90	0,54
02/03/02	6,13	3,01	0,012	0	0,83	0,50
08/03/02	8,02	2,89	0,014	0	0,99	0,55
22/03/02	10,27	2,84	0,014	0	1,02	0,63
04/04/02	11,58	2,74	0,011	0	1,01	0,56

Ceppo S20c

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
17/02/02	1,85	3,28	0,012	0	0,73	0,61
20/02/02	3,96	3,14	0,013	0	0,84	0,43
24/02/02	5,97	3,16	0,013	0	0,79	0,35
01/03/02	8,05	3,09	0,013	0,09	0,80	0,41
07/03/02	9,97	2,97	0,014	0,10	0,92	0,46
25/03/02	12,82	2,84	0,014	0,12	0,93	0,61

Ceppo S25c

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
19/02/02	1,71	3,03	0,013	0	0,82	0,58
24/02/02	4,35	2,99	0,013	0	0,93	0,48
01/03/02	6,20	3,00	0,014	0	0,89	0,43
07/03/02	8,10	2,88	0,012	0	0,45	0,25
13/02/02	10,03	2,82	0,013	0	0,52	0,35
02/04/02	13,01	2,69	0,013	0	0,57	0,41

Ceppo S1u

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
19/02/02	2,02	3,08	0,012	0	0,52	0,56
24/02/02	5,12	2,88	0,013	0	0,46	0,48
28/02/02	6,81	2,68	0,016	0	0,48	0,40
04/03/02	8,16	2,63	0,016	0	0,53	0,44
19/03/02	9,76	2,59	0,017	0	0,55	0,47
20/03/02	10,45	2,55	0,018	0	0,56	0,46

Ceppo S2u

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
20/02/02	2,07	3,06	0,012	0	0,52	0,43
25/02/02	3,75	2,99	0,017	0	0,45	0,45
05/03/02	5,90	2,90	0,021	0	0,53	0,48
21/03/02	8,38	2,73	0,022	0	0,59	0,48

Ceppo S4u

Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
------	--------	--------	-----------	---------	---------	-----------

*Collezione di lieviti vinari: qualità metaboliche dei ceppi
per una migliore caratterizzazione delle produzioni del territorio*

12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
22/02/02	2,13	3,05	0,014	0	0,53	0,50
28/02/02	3,96	3,00	0,027	0	0,47	0,49
18/03/02	5,95	2,97	0,045	0	0,50	0,59
02/04/02	7,26	2,81	0,046	0	0,53	0,69
Ceppo VT12						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
19/02/02	1,88	3,15	0,011	0	0,45	0,50
24/02/02	5,00	3,06	0,011	0	0,82	0,43
28/02/02	6,83	3,08	0,013	0	0,84	0,43
01/03/02	7,15	2,99	0,013	0	0,82	0,40
09/03/02	9,91	2,69	0,013	0,19	0,93	0,42
26/03/02	13,01	2,55	0,013	0,25	0,96	0,44
Ceppo Schi3						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
18/02/02	2,03	0,47	0,014	0,03	0,41	2,27
20/02/02	3,86	0,11	0,014	0,19	0,39	1,73
26/02/02	5,66	0,22	0,013	0,28	0,32	1,37
09/03/02	8,06	0,27	0,013	0,34	0,48	1,49
25/03/02	9,97	0,20	0,013	0,35	0,34	2,05
12/04/02	11,38	0,05	0,010	0,42	0,58	1,85
Ceppo Prosto						
Data	Alcool	Malico	Shikimico	Lattico	Citrico	Succinico
12/02/02	0	3,41	0,013	0	0,94	0,54
04/03/02	1,47	3,11	0,010	0	0,57	1,15
25/03/02	2,73	2,94	0,011	0	0,21	1,25

Tabella 7 Metabolismo degli acidi malico, citrico e succinico, variazione percentuale (%) nel vino rispetto al valore riscontrato nel mosto ad inizio fermentazione.

Campione	Malico %	Citrico %	Succinico %
S6u	-21,11	+5,32	-14,81
AT1	-12,61	-17,02	-25,93
S2i	-15,84	+1,06	+31,48
S4b	-19,35	+19,15	+14,81
S1b	-24,93	-28,72	-50
S16b	-22,58	-1,06	-5,56
S9b	-20,53	+46,81	0
Sbc2	-23,46	-45,74	-50
S1c	-9,38	-31,91	-24,07
S5c	-16,72	-4,26	+40,74
S7c	-5,87	+5,32	+7,41
S11c	-19,65	+7,45	+3,70
S20c	-16,72	-1,06	+12,96
S25c	-21,11	-39,36	-24,07
S1u	-25,22	-40,43	-14,81
S2u	-19,94	-37,23	-11,11
S4u	-17,60	-43,62	+27,78
VT12	-25,22	+2,13	-18,52
Schi3	-98,53	-38,30	+242,59
Prosto	-13,78	-77,66	+131,48

Tabella 8 Ceppi di lievito analizzati

CODICE CEPPI ANALIZZATI	GENERE E SPECIE DI APPARTENENZA
1	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
40	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
41	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
43	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
170	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
196	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus</i>
228	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
270	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum</i>
320	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>
325	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>
673	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
678	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
695	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
866	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
868	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
993	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum</i>
1002	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
1085	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
1086	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
1111	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
ALB	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
AT1	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
AT18	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
h	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f., heterogenicus</i>
Prosto	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. prostoserdovii</i>
SbC2	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus</i>
Schi3	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>
SvCe	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
URB	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
UVA	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum</i>
VT12	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S2b	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus</i>
S1c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S1b	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus</i>
S1ch	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. chevaieri</i>
S1u	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum</i>
S2i	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. italicus</i>
S2u	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum</i>
S4b	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus</i>
S4u	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum</i>
S5c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S6u	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum</i>
S7c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S9b	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus</i>
S10c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S11c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S12c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S16b	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus</i>
S20c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
S25c	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>
W15	<i>Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae</i>

1.3 Identificazione molecolare di lieviti vinari

Il riconoscimento dei ceppi di lievito costituisce un aspetto importante nel settore della vinificazione. Infatti l'identificazione di stipti diversi, ottenuta con tecniche il più possibile attendibili, consente di costruire una banca di ceppi ben individuabili a ciascuno dei quali possono venire associate le peculiari caratteristiche enologiche e le proprietà fermentative. Tale banca può costituire uno strumento di grande utilità per la scelta dei ceppi da utilizzare nelle vinificazioni in base al prodotto che si vuole ottenere e alle condizioni operative richieste. Inoltre, l'identificazione dei ceppi consente di controllare in tempi brevi l'andamento della flora dei lieviti durante la fermentazione e quindi di poter intervenire nel caso in cui uno specifico ceppo inoculato non riuscisse a prevalere sulla microflora indigena del mosto.

1.3.1 Estrazione di DNA totale da lievito

I ceppi sono stati inoculati in terreno liquido e fatti crescere fino ad una densità di 10^8 cellule/ml alla temperatura di 28°C sotto agitazione. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione, lavate con TE (TrisHCl 10mM pH 7,5; EDTA 1mM), e trattate con tampone di estrazione (Triton X-100, SDS 1%, NaCl 100mM, TE pH 8).

La sospensione è stata trattata con PCI (fenolo, /CHCl₃/alcol isoamilico in rapporto 25:24:1 rispettivamente) e le cellule sono state sottoposte a rottura meccanica con palline di vetro su vortex per 4 minuti. Dopo aggiunta di 0,2 ml di TE e dopo centrifugazione è stata recuperata la fase acquosa ed il DNA è stato precipitato con l'aggiunta di tre volumi di etanolo 95°. Dopo centrifugazione e rimozione dell'etanolo, il DNA veniva risospeso in TE+RNAasi per eliminare la contaminazione dovuta allo RNA.

1.3.2 Amplificazione del DNA tramite PCR

La reazione a catena della Taq polimerasi (isolata dal batterio *Thermus aquaticus*) consiste nell'amplificazione di specifiche regioni di DNA. Il punto di inizio della sintesi del DNA può essere specificato fornendo come innesco un oligonucleotide, detto primer, che si appaia allo stampo in un punto stabilito. La prima peculiarità della PCR è che la Taq polimerasi può essere indirizzata a sintetizzare una regione specifica di DNA; la seconda è che da come risultato finale, l'amplificazione di una specifica reazione di DNA attraverso dei cicli di denaturazione, ibridazione e allungamento del DNA in esame.

Nel nostro lavoro di identificazione molecolare dei ceppi vinari in esame, l'amplificazione è stata eseguita utilizzando il kit della TaKaRa SHUZO CO., LTD.

Ad una quantità di DNA inferiore a 1µg, sono stati aggiunti i seguenti componenti standard:

- Enzima Taq polimerasi (2,5 unità)
- Tampone per la polimerasi (diluito 10 volte)
- MgCl₂ alla concentrazione finale di 8mM
- mix di nucleotidi alla concentrazione finale di 0,8mM.

Il primer specifico per questa PCR è stato aggiunto alla concentrazione finale di 1pmole/µL.

La reazione è stata effettuata in un volume finale di 25µL con l'aggiunta di acqua distillata.

Le condizioni di tempo e temperatura delle reazioni erano le seguenti:

Reazione con l'oligonucleotide random (GTG)₅

- ❖ DENATURAZIONE 5 minuti 94°C
- ❖ 40 CICLI
 - Denaturazione 15 secondi a 94°C
 - Ibridazione 45 secondi a 55°C
 - Allungamento 1 minuto e 30 secondi a 72°C
- ❖ TERMINE ALLUNGAMENTO 4 minuti a 72°C

Reazione con gli oligonucleotidi per l'amplificazione del DNA ribosomale (rDNA)

ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT CGC G-3')

NL2 (5'-CTC TCT TTT CAA AGT GCT TTT CAT CT-3')

❖ DENATURAZIONE 5 minuti 94°C

❖ 30 CICLI

➤ Denaturazione 30 secondi a 94°C

➤ Ibridazione 30 secondi a 55°C

➤ Allungamento 1 minuto a 72°C

❖ TERMINE ALLUNGAMENTO 2 minuti a 72°C

I prodotti di amplificazione sono stati controllati su gel d'agarosio alla concentrazione dell'1,2%. Il DNA è stato messo in evidenza mediante l'aggiunta al gel d'agarosio di bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0,5mg/mL e mediante illuminazione con raggi UV.

1.3.3 PCR da colonia

Questa tecnica ha consentito di effettuare le reazioni di PCR direttamente sulla colonia senza ricorrere all'estrazione del DNA dalla cellula.

Il protocollo utilizzato è una modifica di quello proposto dalla Amberg Lab della Upstate Medical University. Colonie delle dimensioni di qualche millimetro sono state stemperate in 5µL di acqua distillata sterile. La sospensione è stata trattata a 95°C per 10 minuti. 2µL della sospensione sono stati utilizzati per l'amplificazione del DNA dopo l'aggiunta degli altri componenti citati nel precedente protocollo.

1.3.4 Digestione di molecole di DNA con endonucleasi di restrizione e loro analisi

Per il taglio di molecole di DNA è stata usata 1 unità di enzima per µg di DNA. La reazione di taglio è stata effettuata in una opportuna soluzione tampone (specificata per ogni enzima) alla temperatura di 65°C (enzimi usati: Tru91, Taq1 e Mse1 e Hpa1).

L'esito della digestione è stato controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio alla concentrazione finale dell'1,2%.

La corsa elettroforetica è stata effettuata ad un voltaggio costante tra 50 e 150 Volts nel tampone TBE (Tris Base 89mM, acido borico 89mM, EDTA pH 8,3 2mM).

Il DNA è stato messo in evidenza mediante l'aggiunta all'agarosio di bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0,5mg/mL.

1.3.5 Caratterizzazione molecolare dei ceppi

La vinificazione è un processo di trasformazione del mosto molto complesso nel quale i lieviti intervengono in modo essenziale per determinare le caratteristiche organolettiche del prodotto finale. Dato che la popolazione di lieviti differenti che si sviluppa durante le fermentazioni può variare da un processo all'altro ed interferire con la qualità del prodotto finale, è importante sviluppare delle metodologie adatte a monitorarne la composizione, a prescindere dall'uso di starter spontanei e autoctoni o di starter selezionati per la vinificazione.

Il primo passo è stato quello di analizzare il polimorfismo della regione dell'rDNA mediante amplificazione di suddetta regione tramite PCR e successiva digestione per mezzo di enzimi di restrizione. Questo metodo non è risultato abbastanza sensibile da permettere una distinzione dei diversi ceppi di lievito appartenenti al genere *Saccharomyces*. Infatti 16 ceppi scelti a caso su 50 selezionati e analizzati con questo metodo hanno mostrato tutti lo stesso profilo di restrizione della regione rDNA del genoma. Per un'analisi più approfondita, sono stati eseguiti successivamente esperimenti di amplificazione per PCR utilizzando un unico oligonucleotide con sequenza casuale (GTG)₅ allo scopo di mettere in evidenza eventuali diversità di sequenza del genoma dei ceppi analizzati. Sono stati considerati

appartenere a gruppi differenti quei ceppi che mostravano la presenza di frammenti di DNA di diversa dimensione e/o intensità.

Sulla base dei frammenti comuni ottenuti con l'amplificazione, i 50 ceppi sono stati raggruppati in 6 gruppi indicati con le lettere da **A** ad **F**. (Tabella 9).

Tabella 9 Raggruppamento dei ceppi analizzati per gruppi.

GRUPPO	SPECIE
A	993, 270 S2u, S4u (<i>S. uvarum</i>)
B	40, 41, 868, W15, 1111, S11c (<i>S. cerevisiae</i>)
C	Sbc2 (<i>S. bayanus</i>) 1002, 866, S5c, ALB, S1c (<i>S. cerevisiae</i>) S6u, UVA, (<i>S. uvarum</i>) S2i, (<i>S. italicus</i>)
D	228, 1, SvCe, 170, AT18, S10c, S7c (<i>S. cerevisiae</i>) S16b, S9b, S1b, S4b, 196 (<i>S. bayanus</i>) h (<i>S. heterogenicus</i>)
E	S20c, VT12, AT1, 678, URB, S25, 695, 1085, 1086, 673 (<i>S. cerevisiae</i>)
F	Schi3, 320, 325 (<i>Schizosaccaromyces japonicus</i>) Prosto (<i>S. prostoserdovii</i>) 43, S12c (<i>S. cerevisiae</i>) S1u (<i>S. uvarum</i>) S1ch (<i>S. chevalieri</i>)

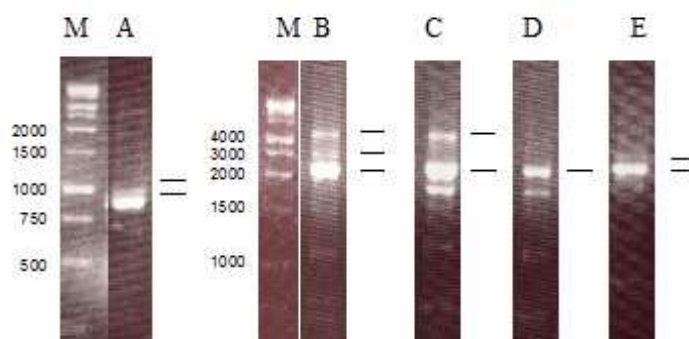
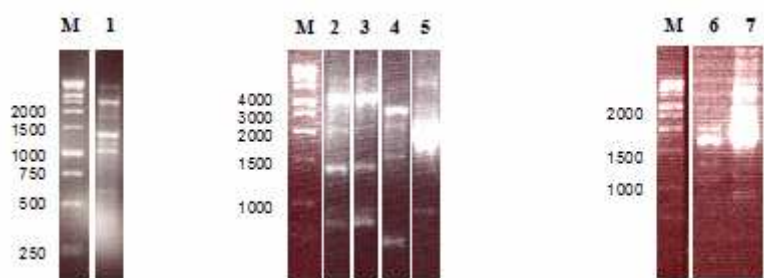


Figura 2 Profili di amplificazione del DNA dei lieviti per gruppi (legenda Tab. 9).

Nella Figura 2 sono riportati i profili di amplificazione di 5 ceppi, ognuno rappresentativo di un gruppo. A destra di ogni profilo (da A ad E) sono indicati frammenti di DNA comuni a ciascun gruppo. I profili M rappresentano il marcatore molecolare, cioè un insieme di frammenti di DNA di dimensioni note.



Leggenda: 1 = S12c; 2 = 43; 3 = S1u; 4 = S1ch; 5 = 325; 6 = Prosto; 7 = schi3; M = Marcatore molecolare

Figura 3 Amplificazione del DNA dei ceppi analizzati

Nella Figura 3 è riportato il profilo di amplificazione del DNA di ceppi, riuniti in un gruppo indicato con F, i cui profili di amplificazione si discostano significativamente da quelli dei gruppi precedenti. Due di questi stipiti, il 43 e lo S1u, mostrano profili identici e potrebbe quindi trattarsi dello stesso lievito isolato in due fermentazioni diverse.

1.4 Discussione

Dalle prove eseguite possiamo avere un quadro realistico sull'andamento metabolico del lievito. Tale quadro, più che offrirci una indicazione in termini assoluti, ci consente di estrapolare una "tendenza metabolica" degli stipiti; inoltre dai risultati ottenuti possiamo trarre indicazioni sulle condizioni nutrizionali del mezzo. In sostanza ci viene consentito di fare una analisi a posteriori; ovviamente la domanda fondamentale è: siamo capaci a condizionare il metabolismo del lievito ed entro quali limiti?

Conoscendo la tendenza metabolica di uno stipite, allo stato attuale, siamo in grado di predisporre il mezzo in condizioni semi-ottimali. Nella pratica di cantina non disponiamo ancora di mezzi tecnologici idonei ad impostare una fermentazione in condizioni di pieno dominio, sia nella composizione del mezzo, sia nel condizionare il metabolismo del lievito nel corso dello sviluppo fermentativo, ragion per cui ancora sussiste un certo margine di casualità che il tecnico di cantina deve tendere a minimizzare. Questo margine è legato sostanzialmente al grado di conoscenza teorica del tecnico e alla esperienza che lo stesso ha acquisito nel corso della professione.

Il traguardo ultimo della microbiologia enologica consiste nel fatto di poter determinare i processi fermentativi senza incertezze e riducendo al minimo la casualità degli eventi.

Gli acidi organici in un mosto e in un vino hanno un ruolo importantissimo in quanto costituiscono l'ossatura, la struttura di un prodotto; questi, infatti, contribuiscono a determinare il potere tampone del vino. Il potere tampone esprime, in termini pratici, la capacità del vino a resistere a variazioni di pH unitarie; questa capacità determina la persistenza del prodotto "in bocca" e quindi la corposità del vino medesimo, pertanto il potere tampone costituisce un aspetto non trascurabile ai fini tecnologici.

Nei mosti provenienti da uve in climi caldi nel corso della maturazione, l'acidità malica tende ad essere metabolizzata nel corso della maturazione dell'uva, ragion per cui l'acido malico va preservato il più possibile mentre per i mosti provenienti dalle aree fredde e per i vini rossi da invecchiamento, l'eccesso di acidità malica costituisce motivo di ruvidezza e pertanto tale acidità va abbassata drasticamente o attraverso la fermentazione malolattica, oppure attraverso la fermentazione malolattica ad opera dei batteri lattici. L'acido malico nei mosti può variare da zero a otto grammi per litro.

L'acido succinico e l'acido citrico sono presenti in concentrazioni basse; la loro presenza è determinante nel condizionare la complessità acidica e per conseguenza, il potere tampone del vino medesimo.

In linea di principio, il metabolismo secondario del lievito, si esplica nella sua massima espressione durante il ciclo di crescita cellulare in cui nel mezzo è presente ancora dell'ossigeno. In questa fase si ha produzione di sostanza organica e nella fase successiva, di totale anaerobiosi, il lievito svolge unicamente attività fermentativa iniziando la fase di mortalità cellulare. Durante questa fase di fermentazione "pura", i metaboliti secondari possono seguire differenti destini a seconda delle esigenze nutrizionali del ceppo. A fine fermentazione le cellule rimaste vive variano in relazione alle capacità nutritive del mezzo ed alla resistenza dello stipite all'alcol.

Appare quindi evidente, che l'entità del metabolismo secondario è legata alla presenza di ossigeno, di azoto prontamente assimilabile, dato che questa disponibilità condiziona la velocità di assorbimento degli zuccheri, dalla disponibilità di vitamine, soprattutto nella fase di fermentazione pura al termine della crescita, dalla temperatura e dalla concentrazione di microelementi assimilabili quali manganese, zinco, rame e magnesio.

Gli acidi del ciclo dell'acido citrico, in particolare citrato, 2-ossiglutarato, succinato, ossalacetato, fumarato, mantengono una concentrazione intracellulare molto stabile e un loro eccesso (superiore alla concentrazione data dagli equilibri biochimici) viene espulso all'esterno della cellula. Il citrato potrebbe essere consumato qualora esistono difficoltà di trasferimento di acetil-CoA su ossalacetato, per esempio in carenza di pantotenato o inositolo. È evidente che in fase di crescita, qualora sia scarsa la disponibilità di ossigeno, gli acidi del ciclo possono essere riassorbiti dall'esterno e metabolizzati in relazione alle necessità di crescita cellulare oppure per particolari inclinazioni genetiche dello stipite. Il malato, per contro può essere metabolizzato a livello del citosol attraverso il ciclo malato-ossalacetato-piruvato, in proporzione inversa alla capacità cellulare a smaltire acetato come Acetil-CoA. Infatti, generalmente il lievito tende a degradare malato in percentuale differente da stipite a stipite e in relazione alle capacità nutrizionali del mezzo. Per esempio, nel caso della razza fisiologica *uvarum*, possiamo riscontrare sia una demolizione, sia una sintesi, a seconda delle condizioni nutrizionali del mezzo: nelle condizioni ottimali abbiamo una sintesi, nelle condizioni limitative una demolizione.

Il metabolismo di acido shikimico è legato principalmente al metabolismo degli aminoacidi aromatici; in particolare, questo metabolismo può essere condizionato dalla capacità idrolitica dei peptidi del mezzo da parte del lievito.

Il metabolismo di succinato è legato alla sintesi delle porfirine e dei citocromi.

Le variazioni più importanti della concentrazione di acidi organici si verificano a carico di *Schizosaccharomyces* e *Saccharomyces prostoserdovii*. La caratteristica del primo è quella di operare la fermentazione malo-alcolica in via prioritaria, in competizione con quella alcolica dagli zuccheri. Questo fatto comporta un convergente accumulo di acetil-CoA che viene scaricato nella produzione di acetoino, acetato di etile e piruvato dagli zuccheri. Contestualmente si assiste ad un concomitante aumento di produzione di glicerina. Inoltre, considerato che l'assorbimento attivo di malato dall'esterno da parte di *Schizosaccharomyces* comporta un aumento di concentrazione intracellulare, assistiamo ad una parallela produzione di succinato e ad una consistente demolizione di citrato (%). Tutto ciò sta a significare una certa difficoltà di trasferimento di acetile su ossalacetato. In sostanza *Schizosaccharomyces* si presenta come un lievito "particolare" che vivrebbe molto meglio in una aerobiosi più spinta; a riprova di ciò vi è il fatto che la sporificazione del lievito è violenta già alla concentrazione alcolica del 4%. *Saccharomyces Prostoserdovii* ha una tendenza a produrre succinato e a demolire citrato con maggiore vigore rispetto a *Schizosaccharomyces*; infatti questo lievito è filmogeno con forti necessità di ossigeno a dimostrazione evidente di ciò, lo stipite manifesta forte tendenza a produrre acetoino ed acido acetico, composti poco apprezzabili in fermentazioni alcoliche.

Alla luce delle considerazioni metaboliche dei lieviti oggetto di osservazione, è possibile esprimere un giudizio finale anche sulle caratteristiche nutritive del mezzo utilizzato per le fermentazioni. Il mosto si caratterizza per una carenza di ossigeno; infatti, essendo stato filtrato microbicamente, l'eccessiva limpidezza costituisce anche nelle fermentazioni di cantina un elemento anomalo. In tali casi occorrerebbe ripristinare un'adeguata torbidità per esempio con l'impiego di cellulosa o di altro materiale amorfo come farina fossile, oppure insufflando ossigeno attraverso candela microporosa; esso evidenzia, inoltre, una

carezza in azoto assimilabile, contenuto vitaminico non sufficiente per un corretto metabolismo.

Per quanto riguarda l'identificazione molecolare dei diversi stipiti esaminati è stato utilizzato un oligonucleotide di sequenza (GTG)₅ casuale che ha messo in evidenza la diversità dei loro genomi.

La possibilità di identificare a livello molecolare il singolo ceppo ha permesso di seguire la sua presenza durante la fermentazione alcolica. In questo modo abbiamo potuto osservare che durante fermentazioni su mosto non sterile, si ha un certo grado di inquinamento ad opera di altri lieviti indigeni e che comunque la percentuale di impianto del ceppo inoculato, dopo 10 giorni di fermentazione nelle nostre condizioni sperimentali, si attesta su un valore del 50%. Questi dati suggeriscono che la tecnica adoperata può essere utilizzata in cantina per il controllo routinario della percentuale d'impianto di uno stipite.

1.5 Bibliografia

- Alexandre H., Charpentier C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 20-27.
- Cabanis J. C., Flanzly C., 1998. Acides organiques, substances minérales, vitamines, lipides. *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques*. Ed. Lavoisier, Partie I, Chap. 1: 4-39.
- Cane P., 1990. Il controllo della qualità dei vini mediante HPLC: determinazione degli acidi organici. *Riv. L'Enotecnico*, 1-2: 69-72.
- Cartwright, C.P., A.H. Rose, J. Calderbank and M.H.J. Keenan., 1989. Solute transport. In: A.H. Rose & J.S. Harrison (Ed.). *The Yeasts 2nd ed. Vol 3: Metabolism and Physiology of Yeasts*. Academic Press, London. pp 5-56
- Castino M., 1998. Una composizione acida anormale dei mosti: conseguenze e prevenzione. *Riv. L'Enotecnico*, 12: 75-81.
- Ciolfi G., 1994. Selezione di uno stipite di lievito *Saccharomyces* della razza fisiologica *uvarum* e suo impiego enologico allo stato secco (S6u). *L'enotecnico*, 11: 71-75.
- Ciolfi G., Garofalo A., Morassut M., Tonet A.L., 1990. Fattori condizionanti il metabolismo del lievito. *Vini d'Italia*, 2: 9-25.
- Ciolfi G., Garofano A., Lo Scalzo R., Cedroni A., 1995 Controllo del metabolismo del lievito quale fattore di qualità del vino. *L'enotecnico* 11: 55-59.
- Ciolfi G., Garofolo A., Lo Scalzo R., Cedroni A., 1995. Analysis of the yeast metabolism in order to prevent sluggish or interrupted fermentation as in relation to the quality of wine: ph. r. *uvarum* (S6u), ph. r. *cerevisiae* (S1c). *Atti Lallemand-Research Meeting 13-16/05/1995, Geisenheim (Germany)*
- Ciolfi G., Garofolo A., Moretti S., Spera G., Morassut M., Cecchini F., 1992. Variazioni metaboliche del lievito in funzione delle differenti condizioni nutrizionali. *Biologia Oggi*, VI (1-2): 127-144.
- Delfini C., 1995. *Scienza e tecnica di microbiologia enologica*. Edizioni "Il lievito"
- Delfini C., & Costa A., 1993. Effects of grape must lees and insoluble materials on the alcoholic fermentation rate and the production of acetic acid, pyruvic acid and acetaldehyde. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 102-107.
- Delfini C., F. Cernetti., 1992. Study on metabolic and technological factors causing production of large amounts of acetic acid by yeasts during alcoholic fermentation. *Biologia Oggi*, 1-2: 217-234.
- Garofalo A., Ciolfi G., Lo Scalzo R., 1995. Il controllo del metabolismo secondario del lievito. *Biologia oggi*, 1: 3-22.
- Giudici P., Altieri C., Gambini G., 1993. Influenza del ceppo di lievito sui prodotti minoritari della fermentazione alcolica. *Industrie delle Bevande*, 22: 303-306.
- Giudici P., Zambonelli C., 1992. Biometric and Genetic study on acetic production for breeding of wine yeast. *Am.J.Enol.Vitic.* 43: 370-374.
- Guillamon J.M., Beltran G., Mas A., Novo M., Poblet M., Rozes N., Torija M.J., 2003. Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: Study of their buffering capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, 4: 916-922.

- Kreger-van Rij, N.J.W. 1989. The Yeasts. Vol I "Biology of Yeast" Second edition. Ed. A.H. Rose and J.S. Harrison, Academic Press Inc. pp.5-61
- Kurtzman C.P. & Fell J.W., 1998. The Yeasts: A taxonomic study. Elsevier, Amsterdam.
- Lema C., Garcia-Jares C., Orriols I., & Angulo L., 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* population to the production of some components wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 206-216.
- Lo Scalzo R., Moretti S., Garofano A., Ciolfi G., Serra G., 1995. Analisi del comportamento metabolico di due stipiti di lievito in relazione al diverso mezzo fermentativo. *Biologia Oggi*, IX: 67-72.
- Lovino R., 1992. L'acido malico e il significato chimico-fisico e organolettico delle sue trasformazioni in relazione alla stabilità biologica dei vini. *L'Enotecnico*, 10: 73-78.
- Moretti S., Garofano A., Ciolfi G., Lo Scalzo R., 1995. Confronto metabolico tra stipiti diversi di lieviti. *Biologia Oggi*, 1: 59-66
- Mortimer R., Polsinelli M., 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.*,150: 199-204.
- Radler F., 1993. Yeasts-metabolism of organic acids. In Fleet G.H. (ed). *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland., pp.165-182.
- Ranieri S., Zambonelli C., Hallsworth J.E., Pulvirenti A., Giudici P., 1999. *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters* 177: 177-185.
- Rapp A., 1998. Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* 42: 351-363.
- Ribèreau-Gayon P., Glories Y., Maugean A. & Dubourdieu D., 1998. Tome 2, Chimie du vin, stabilisation et traitements. Dunod, Paris.
- Stryer L., 1994. *Biochimica*. Ed. N. Zanichelli S.p.A., Bologna: pp 404-430
- Taillandier P., Strehaiano P., 1992. Aspects metaboliques et cinétiques de la dégradation de l'acide malique par *Schizosaccharomyces pombe*. *Biologia Oggi*, 4, 1-2: 53-59.
- Tamborra P., 1992. L'acidità e gli equilibri di salificazione. *L'Enotecnico*, 11: 81-85.
- Usseglio-Tomasset L., 1995. *Chimica enologica*, 4^a edizione. AEB Brescia.
- Vaughan-Martini A., Martini A., 1993. A Taxonomic Key for the Genus *Saccharomyces*. *System Appl. Microbiol.* 16: 113-119.
- Walker G.M., 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Zambonelli C., 1998. *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole, Bologna
- Jiranek V. Langridge P., Henschke P.A., 1995. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine producing *Saccharomyces* strains by assimilable nitrogen. *Appl. Environ Microbiol.*, 61.
- Bely M. Salmon J.M., Barre P., 1994. Assimilable nitrogen addition and hexose transport activity during enological fermentations. *J.Inst.Brew.*, 100: 279-282.
- Sablayrolles J.M. Salmon J.M., Barre P., 1996. Carences nutritionnelles des mousts. Efficacité des ajouts combinés d'oxygène et d'azote ammoniacal. *Rev.Fr.Oenol.* 159: 25-32.
- Margarida Baleiras Couto M., Eijmsa Bob, Hofstras Harmen, Huis in't Veld Jos H.J. And van der Vossen Jos M.B.M., 1996. Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan, pp. 41-46.
- Baleiras Couto M.M., W Vogels J., Thoftstr H., Huis in't Veld J., M. van der Vossen J.M.B.M., (1995): Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J.Appl:Bacteriol.*,79: 525-535.

Capitolo 5
Collezioni Zoologiche Zootecniche

LE COLLEZIONI ZOOLOGICHE DEL CENTRO DI RICERCA PER L'AGROBIOLOGIA E LA PEDOLOGIA, FIRENZE*

Responsabili Scientifici: Bruno Bagnoli, Tiziana Irdani, Roberto Nannelli, Fabrizio Pennacchio, Pio Federico Roversi, Pietro Rumine, Sauro Simoni

CRA-ABP Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia
Via Lanciola, 12/a – 50125 Firenze

Riassunto

Le collezioni zoologiche del CRA-ABP riguardano sostanzialmente specie di insetti, acari e nematodi di primario interesse agrario, forestale e igienico-sanitario. Le stesse si articolano in tre principali categorie: le collezioni storiche, quelle moderne e quelle di materiale vivente, comprensive anche di microrganismi entomopatogeni. Fra le raccolte storiche, il Centro conserva la più importante collezione di acari del mondo, costituita da tutto il materiale studiato da Antonio Berlese. A questa si affiancano l'Acarotheca italica e la Collezione Lombardini.

In ambito entomologico, le raccolte storiche sono costituite da quella classica, risalente all'epoca della costituzione della Regia Stazione di Entomologia agraria (1875), la Chermotheca italica (cocciniglie conservate su un frammento della pianta ospite) e la Cecidotheca italica (galle vegetali allestite e conservate in un erbario ad hoc). Le raccolte moderne sono rappresentate da esemplari di specie di acari, insetti e nematodi, preparati su vetrino o conservati in alcol o altro liquido, studiati dai ricercatori del Centro o da altri studiosi italiani e stranieri. Rivestono infine grande importanza gli allevamenti di popolazioni di insetti, acari e nematodi e le colture di microrganismi entomopatogeni, allestiti e mantenuti per l'approfondimento delle conoscenze bio-etologiche in ordine alla gestione eco-compatibile degli organismi dannosi, in particolare attraverso metodi di controllo biologico. In questo ambito il Centro vanta la costituzione di una piattaforma tecnologica di crioconservazione volta alla messa a punto di tecniche specifiche per incrementare la flessibilità e l'economicità degli allevamenti e per disporre costantemente di stock standardizzati di organismi utili, e di loro ospiti, per programmi di controllo biologico e ricerche applicate in materia di ecofisiologia e genetica.

Zoological collections of the Agrobiology and Pedology Research Centre, Florence

Summary

The zoological collections of the CRA-ABP mainly concern species of insects, mites and nematodes of primary interest in agriculture, forestry and human health. These collections are divided into three categories: historical, modern and living material, including entomopathogenic microorganisms.

Among the historical collections, the Centre maintains the most important collection of mites in the world, consisting of all the material studied by Antonio Berlese; to this, *Acarotheca Italica* and the Lombardini collection are to be added.

In the field of entomology, the historical collections are represented by the classic, dating to the establishment of the Regia Stazione di Entomologia Agraria (1875), the *Chermotheca Italica* (scales maintained on a fragment of the host plant) and the *Cecidotheca Italica* (plant galls prepared in a herbarium ad hoc).

The modern collections are represented by specimens of mites, insects and nematodes, mounted on slide or stored in alcohol or other preserving liquid, studied by researchers of the Centre or by other Italian and foreign scientists. Breeding of insects, mites and nematodes populations and cultures of entomopathogenic agents also have a great significance in relation to eco-compatible management of pests, in particular by means of biological control methods. In this context, the Centre has set up a technology platform of cryopreservation aimed to increase the flexibility and cost-safe of breeding and to provide consistently standardized stocks of beneficial organisms, and their hosts, for biological control programs and applied research in the field of eco-physiology and genetics.

* doi:10.4458/0986-11

Parole chiave

Insetti, acari, nematodi, microrganismi entomopatogeni, raccolte, allevamenti

Keywords

Insects, acari, nematods, entomopathogenic agents, collections, breedings

1 Introduzione

Il CRA-ABP, come precisato nei suoi compiti istituzionali, possiede specifiche e peculiari competenze in campo acarologico, entomologico e nematologico. Per lo sviluppo di queste competenze è di fondamentale importanza sia il mantenimento e l'incremento delle collezioni di materiale zoologico vivente e non vivente sia l'aggiornamento in continuo delle relative banche dati.

Le collezioni da studio sono rappresentate da "collezioni storiche" avviate e acquisite con la fondazione della Regia Stazione di Entomologia Agraria nel 1875 e da "collezioni moderne" costituite da materiale via via studiato, determinato e depositato dai ricercatori dell'ex Istituto Sperimentale per la Zoologia e successivamente del Centro.

1.2 Collezioni storiche

1.2.1 Collezioni acarologiche

1.2.1.1 Acaroteca Berlese

Il Centro conserva la più importante collezione di acari del mondo, costituita da tutto il materiale studiato da Antonio Berlese (1863-1927), uno dei padri dell'acarologia moderna. La collezione comprende 11.195 vetrini microscopici e 2.348 flaconi con materiale in alcool, sia gli uni che gli altri, ancora conservati nei contenitori originali e custoditi in armadi disegnati dallo stesso Berlese nei primi anni del secolo scorso.

I vetrini sono alloggiati in scatole da 50 posti, numerate da 1 a 227, alle quali si aggiungono 9 scatole contenenti preparati di acari associati a formiche e termiti. I campioni in alcool sono conservati in flaconi chiusi a fuoco, numerati da 1 a 2.348, e raccolti in appositi stipetti da 50 unità.

Nella collezione sono depositati un totale di 2.529 taxa appartenenti a quasi tutte le più importanti famiglie di acari ad oggi conosciute, raccolti nei più disparati habitat di ogni parte del mondo. Di detti taxa, la collezione dispone di ben 1.380 "tipi", ovvero di esemplari "tipici" che l'Autore ha utilizzato per la descrizione delle specie e che, secondo il Codice di Nomenclatura Zoologica, devono necessariamente essere depositati, conservati e mantenuti fruibili per chiunque abbia necessità di tornare a studiarli (Foto 1).

L'acaroteca di Antonio Berlese è descritta sia nei quattro volumi del catalogo originale redatto e illustrato a mano dallo stesso Autore (di inestimabile valore storico, scientifico e artistico), sia in un catalogo "moderno" e aggiornato, realizzato da Castagnoli e Pegazzano nel 1985 (Foto 2).

Secondo quest'ultimo catalogo nella collezione sono conservate 1.523 specie descritte da Berlese, di cui ben 1.248 hanno la denominazione di tipo o ecotipo. A queste si aggiungono 158 entità "in pectore", cioè taxa che Berlese ha identificato con il nome di genere e di specie, senza però pubblicarne la descrizione. Fanno infine parte della collezione anche 848 specie, con 132 tipi, descritte e spedite a Berlese da altri Autori suoi contemporanei.



Foto 1 - Armadi contenenti i preparati della collezione acarologica Berlese.

La provenienza del materiale riflette i contatti di Berlese con i naturalisti di ogni parte del mondo. Circa il 42% dell'acarofauna studiata proviene dall'Italia, il 20% da altri paesi europei, il 9% dall'Africa, un'identica percentuale dall'Asia e dal Sud America, l'8% dal Nord America e il restante 3% da Australia, Isole del Pacifico, Regioni Artiche e Antartiche. La maggior parte delle specie sono entità terrestri, mentre gli acari acquatici ammontano a solo il 3%. Il suolo, comprese le lettiere forestali, costituisce l'habitat più studiato, con il 45% di specie presenti. Seguono il muschio (15%), gli insetti, in quanto agenti forestici, vittime di parassitismo e predazione, o commensali (14%) e i vertebrati (13%, di cui l'8% relativo agli uccelli). Le piante rappresentano solo il 5%, mentre tutti gli altri habitat, compresi i prodotti alimentari immagazzinati, l'ambiente umano e gli altri artropodi coprono il rimanente 8% delle specie studiate.

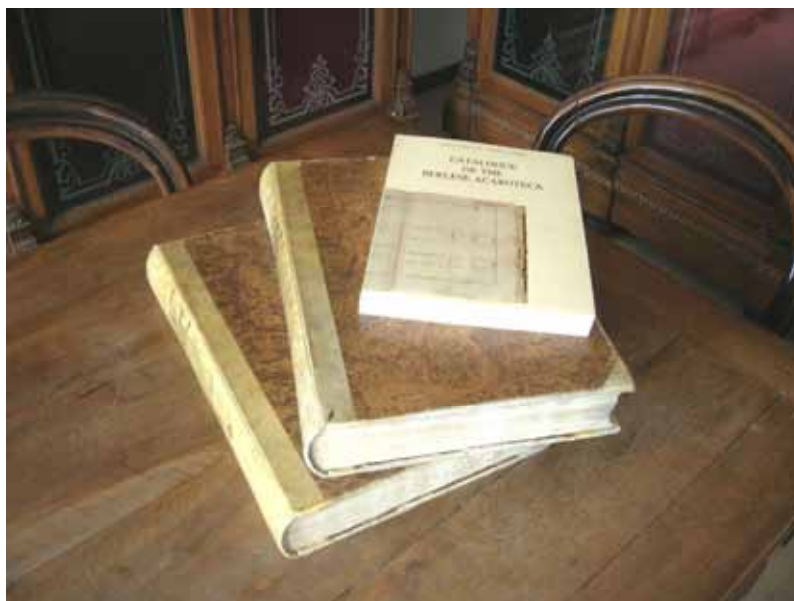


Foto 2 - Cataloghi manoscritti della Collezione Berlese e recente catalogo cartaceo.

Poiché Berlese inseriva i preparati nella sua collezione secondo l'ordine cronologico con cui studiava il materiale che man mano gli arrivava, i vetrini di una stessa specie possono trovarsi dislocati anche in scatole differenti della collezione

Non di rado i dati riportati sui cartellini dei vetrini e dei flaconi forniscono informazioni aggiuntive rispetto a quelle contenute nella descrizione pubblicata della specie. I cataloghi originali, impreziositi dall'Autore con disegni ad acquarello di straordinaria bellezza (Zocchi, 1972) (Foto 4), non sono corredati da un'elencazione del tutto completa delle specie considerate.

Per tale ragione, allo scopo di censire la reale consistenza della collezione, anche al netto di eventuali perdite intercorse dopo la morte di Berlese (1927), nell'ambito del Progetto COLDA è stato strutturato un catalogo informatizzato su foglio elettronico che, una volta completato, potrà essere reso accessibile in internet attraverso la sua collocazione sul sito istituzionale dell'Ente.

Lo stato di conservazione del materiale in collezione è piuttosto buono, tuttavia sono periodicamente e sistematicamente necessari interventi di restauro o addirittura di ripristino del materiale andato soggetto a deterioramento.

Gli acarologi del Centro hanno fino ad ora curato l'accoglienza e l'assistenza dei circa 150 studiosi che negli ultimi 30 anni sono venuti a consultare la collezione. Gli stessi, nei limiti delle proprie competenze, hanno provveduto e continuano a fornire agli studiosi impossibilitati a venire ad esaminare di persona il materiale, informazioni, chiarimenti e conferme sulla morfologia e tassonomia di specie di loro interesse.



Foto 3 - Scatola portavetrini della Collezione Berlese.

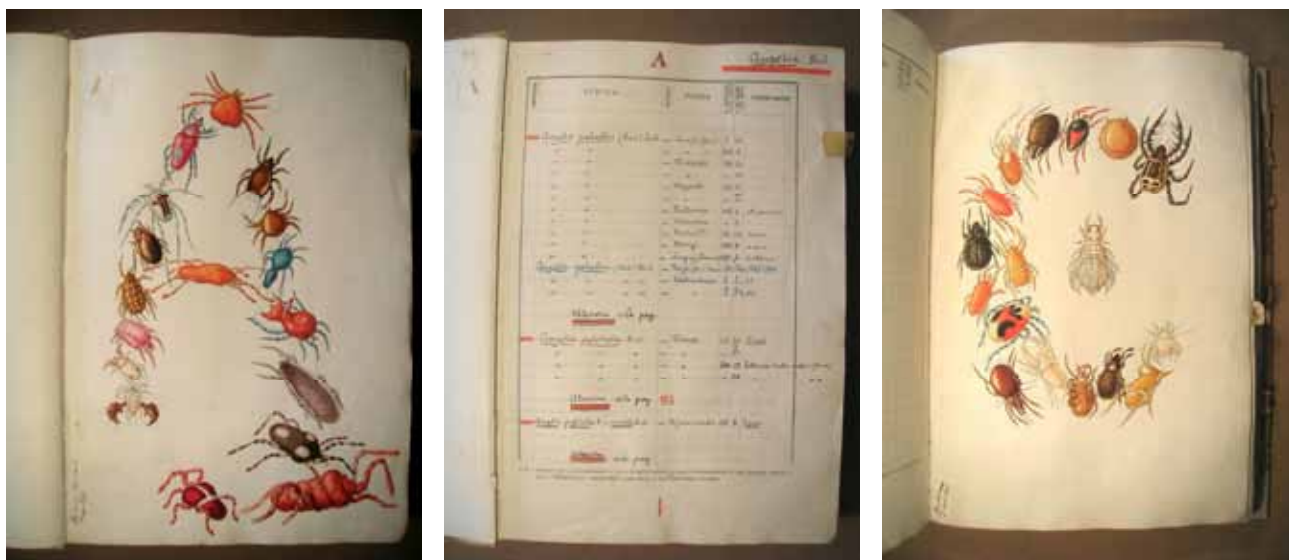


Foto 4 - Lettere disegnate e dipinte a mano da Berlese e pagina manoscritta del catalogo.

1.2.1.2 Acarotheca italica

L'Acarotheca italica è una piccola collezione di acari realizzata da Antonio Berlese intorno al 1910. In origine la raccolta era sicuramente composta da 100 preparati microscopici allestiti dall'Autore, custoditi in due scatole portavetrini da 50 posti ciascuna. Le due scatole sono corredate da un volumetto a stampa, in due fascicoli, pubblicato nel 1913 (Berlese, 1913).

La collezione annovera le specie di acari più comuni presenti in Italia all'inizio del 1900. Nel volumetto allegato, per ogni specie sono riportati, in latino, i caratteri principali del genere di appartenenza e le relative referenze bibliografiche, cui segue una breve descrizione della specie, sempre in latino, con i riferimenti bibliografici, l'habitat di ritrovamento e un accurato disegno rappresentativo.

Per quanto ne sappiamo la collezione era allestita in diverse copie e veniva offerta in vendita ai principali musei e istituti universitari di zoologia del tempo. Quasi sicuramente la copia conservata presso la nostra Istituzione era quella personale dell'Autore.

Rispetto al materiale originale risultano mancanti tre preparati e precisamente dalla scatola n. 1, il preparato n. 21, *Liacarus coracinus* (K.), e il preparato n. 39, *Ixodes reduvius* (L.) e dalla scatola n. 2, il preparato n. 11, *Hoplotoderma pulcherrimum* (Berl.). La perdita potrebbe verosimilmente essere dovuta alle notevoli dimensioni degli esemplari adulti di queste specie che possono aver reso difficoltosa il mantenimento nel tempo della sigillatura del vetrino coprioggetto. Purtroppo nelle scatole originali non sono state trovate tracce neppure dei vetrini portaoggetto.

Nel complesso i preparati esistenti risultano in buon stato di mantenimento. La collezione organizzata secondo i criteri sistematici del tempo ha perduto parte del valore scientifico ma non certo il suo valore storico che merita, invece, di essere valorizzato.

1.2.1.3 Collezione Lombardini

Questa collezione, realizzata da Giocondo Lombardini, professore di scuola media ma appassionato zoologo e cultore di acarologia, fu donata, alla sua morte, dalla famiglia Lombardini all'allora Stazione di Entomologia agraria di Firenze poi Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria.

Il Prof. Lombardini era un assiduo frequentatore della Regia Stazione di Entomologia e dopo la morte di Antonio Berlese avendo a disposizione numeroso materiale di confronto, si interessò di acari e pubblicò alcuni lavori. Con il materiale studiato realizzò così una sua collezione. A lui si deve il primo riordino della collezione acarologica Berlese dopo la seconda guerra mondiale (Lombardini, 1935 e 1945-46).

La collezione Lombardini consta di circa 700 vetrini mantenuti in 7 scatole di legno. Contiene 333 entità specifiche appartenenti a 195 generi. Il materiale tipico è rappresentato da 35 specie da lui descritte.

1.2.2 Collezioni Entomologiche

1.2.2.1 Collezioni entomologiche classiche

Nate intorno al 1875, anno della fondazione della "Regia Stazione di Entomologia Agraria" grazie a "doppioni" dei magazzini di entomologia del Regio Museo di Fisica e Storia Naturale di Firenze, "contro corrispettivo di cambio", così come precisava Targioni Tozzetti (1899).

Alcune collezioni furono donate alla Stazione dal Marchese Bargagli e dall'allora Direttore del Museo Sig. Piccioli. Furono successivamente effettuati acquisti, in particolare di macrolepidotteri (dal Sig. Roule di Zurigo) (Foto 5), microlepidotteri piralidini (dal Sig. Staudinger di Dresda), coleotteri (parte della collezione Reitter di specie europee ed esotiche appartenenti alle famiglie Scarabaeidae, Lucanidae, Cerambycidae, Buprestidae, Curculionidae).

Alcune collezioni minori furono acquistate dal Prof. Stefanelli e da vari privati; molti insetti furono poi inviati dal Regio Istituto Forestale di Vallombrosa, da Ispettori forestali, da "agenzie delle coltivazioni dei tabacchi" e da privati (Targioni Tozzetti, 1899; Melis, 1950; Zocchi, 1975). La consistenza attuale della collezione è di 40.433 esemplari conservati a secco appartenenti a 13.974 specie di 269 famiglie. Inoltre sono



Foto 5 - Scatola con macrolepidotteri della collezione Roule.

presenti esemplari preparati su vetrino fra cui i più importanti sono i proturi descritti da Antonio Berlese e rivisti da S.L. Tuxen nel 1955. Anche per questa collezione, nell'ambito del Progetto COLDA è stato realizzato un catalogo informatizzato su foglio elettronico.

Oltre al materiale preparato e conservato a secco in scatole entomologiche, è presente presso il Centro una collezione di campioni entomologici in alcol, derivanti principalmente dalle raccolte effettuate da Targioni Tozzetti e dai suoi collaboratori, con campioni ancora ben conservati, risalenti agli anni immediatamente successivi all'istituzione della Regia Stazione di Entomologia Agraria. Parte del materiale è stata inoltre raccolta da Antonio Berlese e dai suoi allievi nei primi anni del secolo scorso. La collezione è composta di oltre 800 contenitori in vetro con tappo smerigliato, contenenti campioni concernenti i più importanti gruppi di insetti dannosi alle piante agrarie e forestali.

Fanno infine parte di questa categoria 40 preparati della collezione storica fillosserica del "Regio Osservatorio Antifillosserico" di Milano, a suo tempo forniti a questa Istituzione a scopo di studio e di verifica tassonomica.

1.2.2.2 Chermotheca italica e Cecidotheca italica

La Chermotheca italica è una raccolta di Cocciniglie italiane essiccate, fissate e determinate specificamente da Antonio Berlese e Gustavo Leonardi, iniziata a Portici (Napoli) nel 1895.

La collezione presente è composta di 5 fascicoli (cartelle) preparati fra il 1895 e il 1909 (Berlese e Leonardi, 1895-1909) (Foto 6).

Ogni fascicolo contiene la lista delle specie raccolte e le corrispondenti 25 schede numerate (fogli doppi formato protocollo), una per ciascuna specie considerata. Sulla prima facciata del foglio sono riportati a stampa: il nome scientifico della cocciniglia, le sinonimie (all'epoca), le referenze bibliografiche e la distribuzione geografica; sono inoltre riportate notizie sulla specie vegetale infestata, sui relativi danni prodotti e una serie di indicazioni sui metodi per combattere il fitomizo. In una busta di carta attaccata nella pagina successiva è conservato un campione della cocciniglia sul suo ospite vegetale, con le indicazioni relative alla data e al luogo di raccolta.

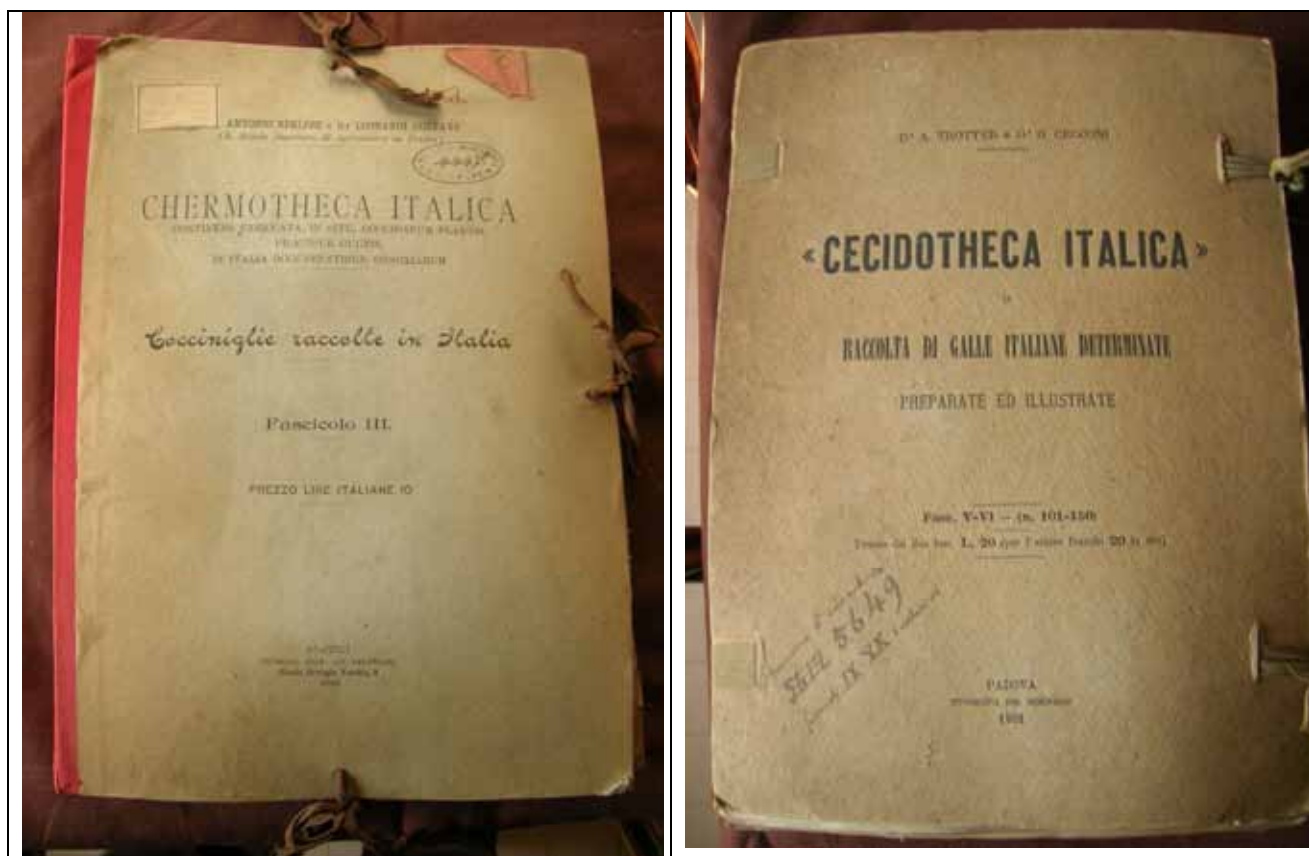


Foto 6 - Fascicolo terzo della Chermotheca italica (a sinistra) e una delle nove cartelle della Cecidotheca italica (a destra).

Dalle informazioni riportate in 4^a pagina della copertina della cartella si deduce che l'opera era stata preparata in diverse copie e proposta per la vendita agli istituti zoologici, botanici ed agrari. Le 5 cartelle risultano preparate in tempi successivi; le prime tre sono opera di Antonio Berlese e Gustavo Leonardi, mentre il IV e il V fascicolo risultano curati unicamente dal secondo Autore.

La raccolta è tuttora completa e il materiale vegetale ancora perfettamente conservato. [In 4^a di copertina](#) dei primi tre fascicoli vi sono interessanti indicazioni sulla procedura da seguire per prelevare esemplari della specie identificata ed allestire con quelli preparati microscopici di confronto.

La straordinaria evoluzione delle conoscenze sistematiche avvenuta in oltre un secolo dalla realizzazione dell'opera non ha intaccato il suo valore storico e per certi aspetti neppure quello scientifico.

La Cecidotheca italica è una delle prime collezioni di galle o cecidi, cioè malformazioni (neoplasie) indotte su organi vegetali (foglie, fiori, frutti e rami) da insetti, acari e nematodi detti appunto galligeni, ma anche dall'azione parassita di funghi, batteri e virus. La galla è il risultato di un'interazione complessa fra l'ospite vegetale e il suo parassita che da sempre ha destato grande interesse scientifico sia da parte di botanici che zoologi.

La collezione si articola in 9 cartelle, costituite da fogli d'erbario (Foto 7 e 8) portanti nel complesso ben 575 campioni vegetali, raccolti e studiati da Alessandro Trotter (1874-1967) e Giacomo Cecconi (1866-1941) fra il 1900 e il 1917 (Trotter e Cecconi, 1900-1917).

Ogni cartella contiene un numero variabile di fascicoli che in totale assommano a 23, contenente ciascuno 25 esemplari. Ciascun campione è montato su un foglio di 24x33 cm, su ogni foglio è disposta una busta contenente il frammento di pianta con la galla e una etichetta stampata sulla quale è indicato il nome della pianta, la specie, l'agente galligeno, la località e la data di raccolta. Inoltre sono riportate le referenze bibliografiche relative alla specie galligena, la descrizione della galla, della sua formazione e localizzazione sulla pianta e note sulla biologia del parassita.

La prima cartella, datata Padova 1900 comprende i fascicoli I e II con campioni 1-50; la seconda, Padova 1901, contiene i fascicoli III e IV con i numeri 51-100; la terza, Padova 1902, comprende i fascicoli V e VI e i numeri 101-150; la quarta, Padova 1902, ha i fascicoli VII e VIII con i numeri 151-200; la quinta, preparata ad Avellino nel 1904, comprende i fascicoli IX-XII con i numeri 201-300; la sesta, Avellino 1906; comprende i fascicoli XIII-XV e i numeri 301-375; la settima, Avellino 1907, i fascicoli XVI-XVIII con i numeri 376-450; l'ottava, Avellino 1909, comprende i fascicoli XIX-XX con i numeri 451-500; infine la nona cartella, allestita ad Avellino nel 1917, porta i fascicoli XXI-XXIII con i numeri 501-575. All'interno di ogni fascicolo le schede (numero) sono ordinate in ordine alfabetico per genere di pianta.

Il riordino della collezione ha evidenziato che la stessa, soprattutto nei primi decenni del secolo scorso, è stata frequentemente consultata da specialisti dei diversi gruppi sistematici di insetti e acari galligeni. Dei 575 campioni originali, risultano mancanti: nel fascicolo I i numeri 8, 11, 15; nel fascicolo II il n. 45; nel fascicolo III il n. 100; nel fascicolo V il n. 119; nel fascicolo X il n. 250 e nel fascicolo XI il n. 254, per un totale di solo 8 campioni.

La collezione appare ancora oggi in soddisfacenti condizioni di mantenimento ed è in buona misura fruibile per lo studio del materiale zoologico, con particolare riferimento agli acari eriofidi, che, potendo rimanere integri anche su materiale vegetale essiccato da molti anni, possono essere raccolti, preparati e studiati.

1.2.2.3 Collezione "cicli biologici di insetti"

È costituita da 109 scatole entomologiche dedicate al ciclo biologico, ai diversi stadi di sviluppo, ai relativi danni sui vegetali ospiti e ai nemici naturali di 73 specie di particolare importanza economica in campo agrario e forestale. La collezione, prevalentemente realizzata attorno alla metà del secolo scorso per scopi didattici, presenta ancora oggi notevole interesse in ambito didattico, divulgativo e promozionale dell'entomologia applicata ed è, al pari di altre collezioni del Centro, apprezzata e riconosciuta di rilevante utilità da parte degli studenti delle facoltà di scienze agrarie, forestali, ambientali e biologiche, come pure da quelli delle scuole medie superiori e dai frequenti visitatori della struttura.

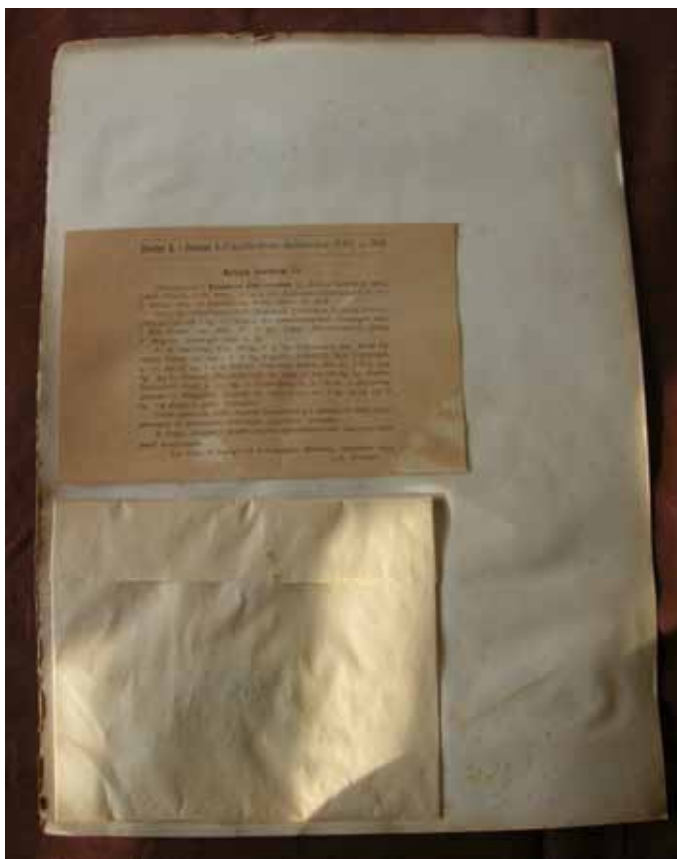


Foto 8 – Foglio d'erbario relativo alla scheda n. 308 della Cecidotheca italiana.

1.3 Collezioni moderne

Sono costituite da preparati microscopici o flaconi con liquido conservativo contenenti esemplari di specie di acari, insetti e nematodi descritte dai ricercatori del Centro o da altri studiosi italiani e stranieri. La raccolta comprende materiale tipico depositato e materiale selezionato, non tipico, rappresentativo comunque di specie di notevole interesse agrario, forestale e igienico-sanitario.

1.3.1 Collezione acarologica

La collezione acarologica, avviata in anni recenti, è costituita da preparati microscopici con materiale tipico e paratipico di specie descritte dai ricercatori del Centro (Pegazzano, Castagnoli, Nannelli) o da altri studiosi italiani e stranieri che hanno scelto la nostra Istituzione come sede di conservazione dei paratipi di specie da loro descritte. La consistenza attuale è di circa 800 preparati microscopici, compresi quelli relativi ai tipi di 81 specie, nuove per la scienza.

1.3.2 Collezioni entomologiche

La collezione di entomologia forestale è rappresentata principalmente dalla collezione di afidi costituita e curata da Andrea Binazzi; consta di 331 specie (oltre 4.000 preparati microscopici) compreso il materiale tipico di 25 specie e subspecie nuove per la scienza. Le specie, afferenti alla superfamiglia Aphidoidea e in questa alle famiglie Adelgidae, Phylloxeridae e Aphididae, provengono da raccolte effettuate in Europa, Asia, Americhe e Nord Africa su piante arboree forestali e ornamentali, principalmente di conifere. Altre collezioni, in progressivo ampliamento, raccolgono specie di coleotteri xilofagi europei ed esotici (cerambicidi e scolitidi) raccolte, studiate e determinate dagli entomologi forestali del Centro.

La collezione di insetti di preminente interesse agrario, tuttora in corso di allestimento e sviluppo, è curata dagli entomologi del Centro e consta di oltre 5.000 preparati microscopici e altrettanti esemplari a secco riguardanti nuove segnalazioni per l'Italia o collegate ad argomenti di studio per taxa afferenti a: Thysanoptera (Thripidae), Rynchota (Tingidae, Cixiidae, Cicadellidae, Psylloidea, Aleyrodidae, Coccoidea), Lepidoptera (Tortricidae, Pyralidae, Noctuidae), Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae), Hymenoptera (Ichneumonoidea, Chalcidoidea).

La cura, il restauro dei preparati e l'incremento delle collezioni con nuovo materiale nazionale ed estero sono attività importanti per i compiti istituzionali del Centro, che richiedono, da parte del personale, notevole impegno tecnico-scientifico. Anche per queste collezioni è in atto un processo di informatizzazione.

1.3.3 Collezioni di materiale vivente

Lo sfruttamento degli antagonismi naturali nell'applicazione dei metodi di controllo biologico dei fitofagi e dei fitoparassiti dannosi alle colture agrarie e alle piante forestali e ornamentali, ha sempre costituito una linea di ricerca e di attività prioritaria per l'ex ISZA. Peraltro già Antonio Berlese ai primi del '900 aveva intravisto le potenzialità applicative di queste metodiche e gettato le basi su cui articolare la definizione e la realizzazione delle successive esperienze nel campo della lotta biologica. Oltre a mettere a punto metodiche di allevamento e di screening di specie antagoniste utili, nonché la definizione dei relativi protocolli di utilizzo, recentemente l'attività del Centro si è anche indirizzata all'esplorazione di nuove possibilità di stoccaggio del materiale allevato (in particolare mediante tecniche di crioconservazione) sia per incrementare la flessibilità e l'economicità degli allevamenti, sia per disporre costantemente di stock standardizzati di organismi utili e di loro ospiti per l'impiego in programmi di controllo biologico e ricerche applicate nell'ambito dell'ecofisiologia e della genetica.

1.3.3.1 Acari

Per il tipo di competenze istituzionalmente definite, sono da anni mantenuti in allevamento ceppi selezionati di varie specie di acari fitoseidi, da utilizzarsi in progetti di lotta biologica, e di acari astigmata per studi allergologici.

Lo studio dei parametri biologici e comportamentali dei fitoseidi, noti predatori di riconosciuta efficacia nei riguardi di acari fitofagi e in particolare dei tetranichidi, nonché di insetti di piccole dimensioni, è il presupposto fondamentale per l'allevamento degli stessi e per la pianificazione delle loro introduzioni in campo (Castagnoli, 1989, Castagnoli e Liguori, 1994, Castagnoli *et al.*, 2007, Simoni *et al.*, 2007).

I secondi, comuni nelle polveri delle case e dei magazzini di stoccaggio di derrate alimentari, sono mantenuti in purezza per la preparazione di desensibilizzanti (Castagnoli *et al.*, 1989).

In entrambi i casi si tratta di allevamenti quasi unici a livello internazionale per consistenza e produttività, il cui allestimento e mantenimento in purezza ha richiesto numerosi anni di impegno, ricerca e selezione. I protocolli standardizzati di mantenimento delle colture messi a punto nell'ambito del Progetto COLDA prevedono, alla stregua di controlli di qualità, il controllo periodico della purezza e dei parametri di vitalità di ogni specie.

1.3.3.2 Insetti

Indagini partite fin dagli anni '80 hanno evidenziato il parassitoide *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) (imenottero encirtide) come un potenziale candidato da utilizzare in applicazioni pratiche per il contenimento della processionaria del pino, *Thaumetopoea pityocampa* (Denis *et Schiffermüller*). Il parassitoide isolato da ovature della processionaria è allevato presso il Centro su uova di un ospite di sostituzione, il rincote eterottero *Nezara viridula* (L.). Agli allevamenti di popolazioni di *O. pityocampae* provenienti da ambienti diversi della penisola italiana, si è aggiunto, a partire dal 2010, l'allevamento di un microimenottero proctotrupoideo ooparassitoide della cimice americana dei pinoli, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Rynchota Coreidae). Il parassitoide è stato introdotto dal Canada (British Columbia) ed oggetto di studio nell'ambito di uno specifico progetto di lotta biologica contro il coreis, finanziato dal MiPAAF. Più recentemente un altro microimenottero, il calcidoideo eupelmide *Anastatus bifasciatus* (Fonsc.), anch'esso parassitoide in natura di uova di numerosi insetti dannosi viene mantenuto in allevamento, su uova di *L. occidentalis*, nella prospettiva di una utilizzazione nel controllo biologico di questo fitomizo, risultato particolarmente dannoso nelle pinete di pino domestico destinate alla produzione di pinoli. Il mantenimento in ambiente controllato delle popolazioni di questi parassitoidi oofagi appare di non trascurabile rilevanza e giustifica l'impegno operativo, sostenuto da specifiche competenze necessarie allo svolgimento delle attività previste

1.3.3.3 Microrganismi entomopatogeni

Presso il Centro è attiva anche una collezione di microrganismi entomopatogeni (Resp. Pietro Rumine) comprendente microrganismi utili per impieghi in strategie di lotta biologica e integrata per il controllo di insetti, acari e nematodi dannosi alle coltivazioni agro-forestali e ornamentali. La collezione comprende più di 300 isolati, di cui 260 sono funghi, mentre la parte restante è costituita da isolati batterici. Parte degli isolati è oggetto di interesse nell'ambito del progetto multidisciplinare COLMIA (COLlezioni di Microrganismi di Interesse Agrario, industriale e ambientale), cui afferiscono varie strutture CRA (Barba *et al.*, Eds, 2011). Riferimenti su questa collezione sono anche riportati in altra parte di questo volume.

1.3.3.4 Nematodi

I nematodi fitoparassiti sono senza dubbio all'origine di notevoli perdite di produzione per quasi tutte le colture e soprattutto per quelle di alto reddito con danni causati in primo luogo da varie specie di nematodi cisticoli (*Globodera* e *Heterodera*) e galligeni (*Meloidogyne*) in grado di compromettere la riuscita delle coltivazioni nei più svariati agroecosistemi di molte aree geografiche del pianeta.

I nematodi cisticoli *Globodera rostochiensis* e *G. pallida*, organismi da quarantena, risultano particolarmente dannosi alla patata sebbene la cerchia delle loro piante ospiti comprenda, oltre a numerose solanacee spontanee, anche pomodoro e melanzana. *G. tabacum* attacca principalmente tabacco, melanzana, pomodoro e peperone. Anche per quanto riguarda il genere *Heterodera*, un notevole impegno è richiesto tuttora per il controllo di *H. schachtii* su barbabietola da zucchero, di *H. goettingiana* su pisello e di *H. carotae* su carota. Inoltre è stata segnalata in Italia anche *H. betae*, particolarmente dannosa per la barbabietola da zucchero.

Al genere *Meloidogyne* appartengono alcune tra le specie più diffuse e dannose dei nematodi fitoparassiti, la cui azione si esplica con particolare intensità in terreni sabbiosi e soprattutto a carico delle colture floricole. Su quest'ultime in anni recenti sono stati rilevati in misura crescente nel nostro Paese, attacchi di specie migratrici quali *Pratylenchus* spp. e *Paratylenchus* spp., cui finora era stata data scarsa attenzione.

I nematodi fogliari dei generi *Ditylenchus* (*D. dipsaci*) e *Aphelenchoides* (*A. fragariae* e *A. ritzemabosi*) causano danni a colture ortive, da foraggio e da fiore (specie bulbose). Nelle colture cerealicole le monosuccessioni prolungate favoriscono incrementi delle popolazioni dei generi *Pratylenchus* e *Pratylenchoides*. Il *Tylenchulus semipenetrans* è uno dei fitoparassiti che creano maggiori problemi all'agrumicoltura mondiale.

Problematiche assai rilevanti sono quelle connesse al nematode da quarantena *Bursaphelenchus xylophilus*, diffuso da insetti lignicoli. Su questo temibile organismo fitoparassita sono state da tempo avviate ricerche e studi anche per adempiere agli obblighi comunitari che prevedono monitoraggi annuali in tutti i Paesi dell'Unione. Durante le indagini sui nematodi del legno di conifere sono state raccolte numerose popolazioni di specie differenti appartenenti al genere *Bursaphelenchus* che sono state poi mantenute *in vitro* e mediante tecniche specifiche di crioconservazione (Irdani et al., 2006; 2007; 2011) ai fini di una loro successiva utilizzazione in ulteriori indagini e prove sperimentali.

Presso il Centro sono conservate varie collezioni nematologiche sia *in vivo* che su vetrino (esemplari di 26 specie allestiti su circa 1.100 vetrini) e in liquidi fissativi (Tab. 1), ottenute sia nel corso delle diverse campagne di studio realizzate negli ultimi 30 anni, sia mediante scambi con istituzioni scientifiche di altri Paesi europei ed extra europei.

Le popolazioni di alcune specie sono conservate *in vivo*, con allevamenti permanenti in piastre oppure mediante crioconservazione (Tab. 2).

Per quanto riguarda i nematodi conservati in liquido fissativo, reperiti su radici e terreno, il materiale è in fase di riordino e catalogazione e pertanto viene fornito di seguito solo un elenco preliminare con i Generi conservati.

Per lo studio e l'identificazione di questi nematodi sono necessari sia i metodi tassonomici tradizionali, basati sull'osservazione e la misurazione dei caratteri morfologici, che i metodi mutuati dalla biologia molecolare utilizzabili in particolare per specie di non facile identificazione con i soli esami di tipo classico. Tra le tecniche più impiegate per questo tipo di esami si ricordano quelle fondate sull'amplificazione del DNA ribosomale (rDNA) come: ITS-PCR e ITS-RFLP, risultate particolarmente utili nella discriminazione delle diverse specie di *Bursaphelenchus*, ma anche i cosiddetti marcatori *random* o RAPD (Random amplified polymorphic DNA) e SCARs (Sequenze Characterised Amplified Regions) con i quali sono possibili valutazioni più ampie della variabilità genetica intrinseca di una specie o interspecifica (Irdani et al., 1995; Irdani, 2000; 2008).



Foto 9 Radici di una pianta di pomodoro con cisti di nematodi

Tabella 1 Nematodi conservati in liquido fissativo.

Piante ospiti	Nematodi
Fiori e piante ornamentali	Criconematidae (vari generi e specie)
	<i>Aphelenchoides</i> spp.
	<i>Aphelenchus</i> spp.
	<i>Ditylenchus</i> spp.
	<i>Heterodera</i> spp.
	<i>Meloidogyne</i> spp.
	<i>Paratylenchus</i> spp.
Colture ortive	<i>Ditylenchus</i> spp.
	<i>Globodera</i> spp.
	<i>Heterodera</i> spp.
	<i>Meloidogyne</i> spp.
Vite	Criconematidae (vari generi e specie)
	<i>Helicotylenchus</i> spp.
	<i>Meloidogyne</i> spp.
	<i>Paratylenchus</i> spp.
	<i>Pratylenchus</i> spp.
	<i>Rotylenchus</i> spp.
Agrumi	<i>Xiphinema</i> spp.
	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>
Conifere e latifoglie	<i>Crossonema multisquamatum</i>
	Tylenchidae (vari generi e specie)
	Plectidae (vari generi e specie)
	<i>Acrobeles</i> spp.
	<i>Bursaphelenchus</i> spp.
	<i>Cephalobus</i> spp.
	<i>Laimaphelenchus</i> spp.
	<i>Mononchus</i> spp.
<i>Rhabditis</i> spp.	

1.4 Metodi innovativi per lo stoccaggio dei nematodi

Come già accennato, risulta di notevole utilità speculativa e applicativa la possibilità di preservare gli organismi di interesse agroforestale, ed i microrganismi simbiotici eventualmente associati, in uno stato fisiologico e genetico stabile. L'allevamento *in vitro* e *in vivo* su pianta ospite è necessario nelle fasi attive del lavoro ma il loro continuo rinnovamento nel tempo risulta dispendioso e non scevro da rischi di contaminazioni e imbreeding. Al riguardo le indagini svolte presso il laboratorio di Nematologia del CRA-ABP hanno permesso di ottenere validi risultati nel campo della crioconservazione mediante vitrificazione per molte specie di nematodi fitoparassiti e entomoparassiti. Dal 2004 presso il Centro è stato possibile definire protocolli sempre più efficaci per la crioconservazione delle specie in allevamento continuo e presenti in collezione *in vivo* e *in vitro* da diversi anni, utilizzando sia lo stoccaggio in azoto liquido che l'impiego di ultracongelatori meccanici per la conservazione a temperature comunque inferiori a -130°C, temperatura considerata come valore limite per l'interruzione di ogni tipo di processo metabolico. Lo stoccaggio delle popolazioni di nematodi con tecniche criogeniche ha dato risultati riconosciuti a livello internazionale per innovazione e semplicità tecnica e, attualmente, decine di migliaia di individui appartenenti a generi e specie diversi sono mantenuti a temperature ultrabasse e sono disponibili per studi e ricerche (Tab. 3). Tra le prospettive derivanti da tale esperienza vi è senz'altro quella di poter far crescere la costituenda "Banca Genetica Crioconservata", accogliendo molte altre specie utili per ricerche e/o applicazioni future. Il laboratorio di Criobiologia e Crioconservazione, appositamente costituito in questi ultimi anni presso il Centro, ha infatti esteso le sue indagini anche a nematodi utilizzabili per interventi di controllo microbiologico (Cosi *et al.*, 2008) e di recente sono stati ottenuti risultati di notevole rilevanza scientifica per la vitrificazione anche di artropodi e altri metazoi.

Tabella 2 - Popolazioni di *Bursaphelenchus* spp. allevate in purezza su piastre Petri con colture fungine di *Botrytis cinerea* mantenute in cella climatizzata. Esempolari estratti da legno = (w); esemplari estratti da insetti = (i).

Specie	Sigla
<i>B. mucronatus</i>	IT 4 (w)
	IT 5 (w)
	IT 7 (w)
	IT 12 (i)
	IT 13 (w)
	IT 16 (w) - Montefalcone
	Cina - Sichuan
	RU-IT 1 (larice Russia)
	F 2 (Francia)
	RU-DE 3 <i>B. mucronatus</i> + <i>B. thailandae</i>
	Austria VR 473
	UA-IT1 (w) - C9 Piemonte
IT 38 (w) - C41 Piemonte	
<i>B. xylophilus</i>	US 11-USA
<i>B. thailandae</i>	RC-A (w)
	UN - Japan
	RC-A VR 477 (più saprofiti)
	RC-A VR 448 (più saprofiti)
	RC-AT 8 (più saprofiti)
<i>B. fraudulentus</i>	IT 23 (w) - Bosco Pizzone (MI) <i>Quercus</i>
	IT 34 (w) - Bosco Pizzone (MI) <i>Carpinus</i>
	IT 43 (i) - San Rossore (PI)
<i>B. eremus</i>	IT 17 (w) - Montefalcone (PI)
	IT 18 (w) - Bosco Pizzone (MI)
	IT 19 (w) - Paganico (GR) <i>Q. cerris</i>
	IT 35 (w) - Paganico (GR) <i>Q. suber</i>
	IT 36 (i) - Roccastrada (GR) <i>Q. suber</i>
	IT 20 (w) - Bosco Grande (PV)
	IT 21 (w) - Brughiera del Dosso (VA)
	IT 22 (w) - Boscaccio (PV)
	IT 37 (w) - L28 Piemonte (NO)
	DE 39 (w) Ne 2/07
	IT 45 (i) - San Rossore (PI)
<i>B. hellenicus</i>	IT 39 (i) - Livorno
	IT 41 (i) - San Rossore (PI) <i>P. pinaster</i>
	San Rossore (PI) (i) <i>P. pinea</i>
<i>B. minutus</i>	IT 42 (w) - Abetone (PT)
	IT 47 (w) - C44/08 Piemonte
<i>B. eggersi</i>	C43/09 Piemonte (w)
<i>B. sexdentati</i>	S. Rossore (PI)

Tabella 3 - Popolazioni di nematodi fitoparassiti stoccati a -196°C.

Species	Ceppi	Cryo	genomic DNA
<i>Bursaphelenchus eremus</i>	IT18	X	X Irdani, 2000
	IT19	X Irdani et al., 2006	X
	IT21	X	X
	DE39	X	
<i>Bursaphelenchus fraudulentus</i>	IT34	X	X
	IT43	X	X
	IT23		X
<i>Bursaphelenchus hellenicus</i>	IT41	X	X
	IT39		X
<i>Bursaphelenchus minutus</i>	IT42	X	
<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>	IT12	X Irdani et al., 2006	X Irdani et al., 1995; Irdani 2000
	IT48		X
	IT13		X
	YACH		X
	F2		X
<i>Bursaphelenchus sexdentati</i>	IT40	X	X
	IT2		X Irdani 2000
	IT9		X
	GR-IT		X
<i>Bursaphelenchus thailandae</i>	China-A	X Irdani et al., 2006	X
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	US11	X Irdani et al., 2006	X Irdani et al., 1995
	J3	X	X
	Canada	X	X
<i>Heterodera schachtii</i>	IT26	X Irdani et al., 2011	X
<i>Gglobodera tabacum</i>	IT33	X Irdani et al., 2011	X
<i>Meloidogyne incognita</i>	IT30	X Irdani et al., 2011	X
	MA1	X	
<i>Meloidogyne arenaria</i>	IT-Perugia	X	X
<i>Steinernema carpocapsae</i>	ITS-MR7	X	

1.5 Data base per Arachnida Acari e Insecta Homoptera Aphidoidea

Iniziato nel 1995 per la pubblicazione dei fascicoli 24. e 43. della Checklist delle specie della fauna italiana (Bernini *et al.*, 1995; Barbagallo *et al.*, 1994) dai ricercatori dell'ex Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, su incarico del Comitato scientifico per la Fauna d'Italia, l'aggiornamento del data base prosegue a cura dei ricercatori del gruppo di acarologia e di entomologia forestale del Centro ABP.

L'aggiornamento viene eseguito con la consultazione dei repertori bibliografici internazionali e l'inserimento delle specie, di interesse agrario e forestale, nuovamente descritte o segnalate come nuove per il nostro Paese.

1.6 RINGRAZIAMENTI

Sinceri ringraziamenti vanno ai colleghi Paolo Barzanti, Beatrice Carletti, Elisabetta Gargani e Donatella Goggioli per la loro preziosa collaborazione.

1.7 BIBLIOGRAFIA

- Barba M., Belisario A., Luongo L. (Eds), 2011. Manuale d'Uso. "Collezione di Microrganismi di interesse agrario, industriale ed ambientale". Petria, Giornale di Patologia delle Piante 21 (1): 1-164.
- Barbagallo S., Binazzi A., Bolchi Serini G., Conci C., Longo S., Marotta S., Martelli M., Patti I., Pellizzari G., Rapisarda C., Russo A., Tranfaglia A., 1994. *Homoptera Sternorrhyncha*. In: A. Minelli, S. Ruffo e S. La Posta (Eds). Checklist delle specie della fauna italiana 43, Calderini, Bologna, 57 pp.
- Bernini F., Castagnoli M., Nannelli R., 1995. 24. Arachnida Acari. In: A. Minelli, S. Ruffo e S. La Posta (Eds). Checklist delle specie della fauna italiana, Calderini, Bologna, 130 pp.
- Berlese A., 1913. *Acarotheca italica*. Species exhibens repraesentantes genera in Italia magis communia, speciminibus in praeparationibus asservatis, icone et descriptione illustratas; adiecta brevis synonymia et bibliographia generum et specierum. Fasciculi I^{us} et II^{us}, Praemisso *Acarorum systemate genera omnia in suas Familias referente*. Firenze, Tipografia di M. Ricci, via S. Gallo, 31, 221 pp.
- Berlese A., Leonardi G., 1885-1909. *Chermotheca italica*, continens exsiccata, in situ, coccidarum plantis, precipue cultis, in Italia occurrentibus, obnoxiarum. *Cocciniglie raccolte in Italia*, Fascicoli I-V. Portici, Premiato Stabilimento Tipografico Vesuviano.
- Castagnoli M., 1989. Biologia e prospettive di allevamento massale di *Amblyseius cucumeris* (Oud.) (Acarina Phytoseiidae) usando *Dermatophagoides farinae* Hughes (Acarina Pyroglyphidae) come preda. *Redia* 72 (2): 389-402.
- Castagnoli M., Liguori M., 1994. Utilizzazione del polline per l'allevamento massale di *Amblyseius californicus* (Mc Gregor) e *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa (Acari Phytoseiidae). *Redia* 77: 349-359.
- Castagnoli M., Pegazzano F., 1985. Catalogue of the Berlese Acaroteca. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Firenze. Arti Grafiche Giorgi e Gambi, Firenze, 490 pp.
- Castagnoli M., Liguori M., Nannelli R., 1989. A methodology for rearing *Euroglyphus (E.) maynei* (Coor.) (Acarina: Pyroglyphidae) in laboratory. *Redia* 72 (1):127-131.
- Castagnoli M., Nannelli R., Tarchi F., Simoni S., 2007. Screening of astigmatid mites for mass-rearing *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari Phytoseiidae). *Redia* 89 (2006): 55-58.
- Cosi E., Triggiani O., Irdani T., Tarasco E., Roversi P.F., 2008. First results of entomopathogenic nematodes cryopreservation in liquid nitrogen and storage at -140°C. *Redia* 91: 181-183.
- Irdani T., Marinari A., Bogani P., Ambrogioni L., Caroppo S., Buiatti M., 1995. Molecular diversity among wood *Bursaphelenchus* populations detected by RAPD analysis. *Redia* 78 (1): 149-161.
- Irdani T., 2000. Genetic analysis of three *Bursaphelenchus* species by random amplified polymorphic DNA. *Nematologia Mediterranea* 28: 111-120.
- Irdani T., 2008. Molecular identification of some plant parasitic nematode species. *Redia* 91: 125-128.
- Irdani T., Carletti B., Ambrogioni L., Roversi P.F., 2006. Rapid cooling protocol for storage of *Bursaphelenchus* spp at -140°C. *Cryobiology* 52: 319-322.
- Irdani T., Cosi E., Roversi P.F., 2007. The challenge of preserving invertebrate's species by cryopreservation. *Adv. Hort. Sci.* 21 (4): 274-276.
- Irdani T., Scotto C., Roversi P.F., 2011. Low cryoprotectant concentrations and fast cooling for nematode cryostorage. *Cryobiology* 63: 12-16.
- Lombardini G., 1936. Elenco alfabetico di specie esistenti nell'acaroteca della R. Stazione di Entomologia Agraria di Firenze. *Redia* 22: 37-51.
- Lombardini G., 1945. L'Acaroteca Berlese dopo la Seconda Guerra Mondiale. *Redia* 31 (1945-46): 53-54.
- Melis A., 1950. Anno di giubileo. Il settantacinquesimo anniversario della fondazione della Stazione di Entomologia Agraria di Firenze. *Redia* 35, Appendice: III-XXVIII.
- Simoni S., Nannelli R., Goggioli D., Guidi S., Castagnoli M., 2007. Biological and demographic parameters of *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari Phytoseiidae) reared on two astigmatid mites. *Redia* 89 (2006): 59-63.

- Targioni Tozzetti A., 1899. Storia della Regia Stazione di Entomologia Agraria. Estratto dalle Nuove Relazioni intorno ai lavori della R. Staz. Ent. di Firenze, Serie I, n. 1. Tipografia di M. Ricci, Firenze, 86 pp.
- Trotter A., Cecconi G., 1900-1917. "Cecidotheca italica" o Raccolta di galle italiane determinate, preparate ed illustrate. Fascicoli I- XXIII, nn. 1-575. Padova-Avellino.
- Zocchi R., 1972. Berlese nel disegno e nella pittura. Atti del IX Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Siena, 21-25 giugno 1972, pp. 419-428 + XX tav.
- Zocchi R., 1975. Centenario di una Istituzione (1875-1975). Redia 56: XI-XXII.

STORIA ED INTERVENTI DI CONSERVAZIONE DEL NUCLEO ITALIANO DEL CAVALLO LIPIZZANO*

Responsabili Scientifici: Dr Gennaro Catillo, Dr Alfonso Carretta, Dr Cinzia Marchitelli, Dr Luca Buttazzoni

CRA-PCM Centro di ricerca per la produzione delle carni ed il miglioramento genetico
Via Salaria, 31 – 00015 Monterotondo (RM)

Riassunto

L'allevamento di Lipizza fu fondato da Carlo II d'Austria nel 1580 per la produzione di cavalli spagnoli utilizzati dalla corte di Graz. Riunificato l'Impero asburgico nel 1619, per quasi due secoli l'allevamento si sviluppò sotto la diretta cura della famiglia imperiale, producendo esclusivamente cavalli per la Corte di Vienna. Tra il 1797 ed il 1815 la mandria venne pesantemente coinvolta nelle guerre napoleoniche e andarono perdute tutte le registrazioni genealogiche. Le registrazioni oggi a disposizione iniziarono nel 1816. Alla fine della I guerra mondiale, la mandria venne divisa tra l'Austria ed il Regno d'Italia, nel cui territorio era passata Lipizza. Durante la seconda guerra mondiale i Tedeschi riunirono la maggior parte degli allevamenti di Lipizzani ad Hostau, nei Sudeti (ora Hostouň nella Repubblica Ceca). Il 18 novembre 1947 vennero restituiti all'Italia 80 soggetti provenienti in gran parte, ma non solo, dal nucleo originale di Lipizza. Geneticamente, dal 1816 ad oggi la mandria italiana è stata quasi completamente isolata, avendo da allora introdotto solo 34 fattrici nate tra il 1820 ed il 2000, e solamente 19 stalloni nati tra il 1819 ed il 1948. Dopo il 1900 sono stati introdotti solo cinque stalloni e cinque fattrici.

Il nucleo storico dei cavalli di razza Lipizzana fu trasferito all'Istituto Sperimentale per la Zootecnia, attuale CRA-PCM, grazie alla legge n. 549 del 1954. Il CRA-PCM, fin d'allora, ha continuato a praticare gli schemi tradizionali di riproduzione mantenendo così il nucleo di selezione in purezza al riparo dal meticciamiento.

Le analisi condotte sia per quanto riguarda la consanguineità che per quanto riguarda i contributi genetici dei fondatori e degli ascendenti hanno evidenziato la ridotta base genetica del nucleo attuale. In particolare, il Numero di fondatori effettivi, il numero di ascendenti effettivi ed il numero di genomi di fondazione rimanenti sono risultati rispettivamente 47,4; 12,02 e $2,6 \pm 0,74$. I contributi degli ascendenti hanno confermato l'efficacia dello schema riproduttivo tradizionale basato sui nomi convenzionali. La consanguineità della linea maschile è stata mediamente di $12 \pm 0,19$ e quella femminile di $11,3 \pm 0,37$.

Summary

The Lipizza stud-farm was established by Charles II of Austria in 1580 in order to produce horses of Spanish breed to be used at the court in Graz. After the Empire was re-united in 1619, Lipizza stud-farm was directly taken care of by the Imperial family and developed for nearly two centuries exclusively to produce horses for the court in Vienna. Between 1797 and 1815, the herd was heavily involved in the Napoleonic wars and all pedigree registrations went lost. Data available today were started in 1816. At the end of WWI, the herd was split between Austria and the Kingdom of Italy, which had taken Lipizza territory. During WWII, the German Army gathered Lipizzans from many stud-farms in Hostau (now Hostouň in the Czech Republic). On November 18th, 1947, 80 Lipizzan Horses were handled back to Italy, most of them, but not all of them, coming from the original Lipizzan farm. Genetically, from 1816 to 2007 the Italian Lipizzan herd has been kept nearly isolated, descending completely from 34 mares born between 1820 and 2000, and only introducing 19 stallions born between 1819 and 1948.

The historical stud of the Lipizzan horses have been transferred, to the farm of the Animal Production Research Institute, actual CRA-PCM, according to the Law n. 549, of 30 June 1954. The CRA-PCM is continuing to perform the traditional reproduction system, maintaining therefore the selection nucleus in purebred, by avoiding any crossbreeding.

* doi:10.4458/0986-24

Analyses performed on pedigrees on inbreeding, founder contributions and ancestor contributions confirmed the reduced genetic basis of current breeding stock. Particularly, the number of effective founders, the number of effective ancestors and the number of remaining founder genomes respectively were 47,4; 12,02 and $2,6\pm 0,74$. Ancestor contributions confirmed the importance of classical lines and families and the effectiveness of traditional method of mating based on naming conventions. The overall average inbreeding coefficient, from year 1945 to 2005, was 11.3 ± 0.37 for the female line; it was 12.0 ± 0.19 for the male line.

Parole chiave

Cavalli Lipizzani, conservazione, consanguineità, management

Keywords

Lipizzan horse, preservation, inbreeding, management

1 Il cavallo Lipizzano

Lipizza "Terra dei tigli", villaggio sloveno al confine con l'Italia, fu scelta verso la fine del XVI secolo, dall'Arciduca Carlo di Stiria, terzogenito dell'Imperatore d'Austria Ferdinando 1° d'Asburgo, come culla per la costituzione di una razza che raccogliesse tutte le caratteristiche dei più affermati cavalli dell'epoca; fu di fatto la sede per l'impianto di un allevamento Statale, destinato alla produzione di cavalli per il traino delle berline della corte di Graz.

Nel 1580 l'Arciduca affittò dall'arcivescovo di Trieste le terre necessarie per l'allevamento e nello stesso tempo acquistò stalloni e fattrici di razza Spagnola. La razza Lipizzana risale però al regno dell'Imperatrice Maria Teresa (1740-1780), anche se fino alla seconda metà dell'800 quella di Lipizza veniva indicata come "razza del Carso" o, in tedesco, "*Karstner*".

I riproduttori utilizzati in quel periodo, ovvero i loro ascendenti più remoti, identificano la maggior parte delle cosiddette linee maschili e famiglie femminili "classiche". Convenzionalmente ogni maschio appartiene alla linea del padre ed ogni femmina appartiene alla famiglia della madre. Da allora, molte linee o famiglie si sono perse, ed oggi sopravvivono e sono riconosciute come classiche solo sei linee maschili (Pluto – Danimarca 1765; Favory – Kladrub 1779; Conversano – Regno di Napoli 1767; Napolitano – Regno di Napoli 1790; Maestoso – Kladrub 1773/Mezohegyes 1819; Siglavy – Arabo 1810) e 15 famiglie femminili (Argentina – Carso 1767; Sardinia – Carso 1776; Spadiglia – Carso 1778; Africa – Kladrub 1747; Rava – Kladrub 1755; Almerina – Kladrub 1769; Engländeria – Kladrub 1773; Europa/Capriola – Kladrub 1774; Ivanka – Koptshan 1754; Fistula – Koptshan 1771; Deflorata/Bradamanta – Danimarca 1767; Gidrane – Araba 1841; Djebrin – Babolna 1824; Mercurio – Araba 1806; Theodorosta – Bukovina, prima del 1870).

Delle 15 oggi riconosciute come "classiche", quattro famiglie discendono da fattrici arabe importate nel corso dell'800: Mercurio (1806), Djebrin (1824), Gidrane (1841) e Theodorosta (1870).

I Libri genealogici e gli scritti che illustrano l'evoluzione della razza e delle strutture, fino all'inizio del secolo XVIII, sono andati perduti nelle guerre napoleoniche e le notizie riportate da scritti successivi non sono ben documentate; l'intera storia dell'allevamento di Lipizza è infatti complessa e travagliata.

La prima guerra mondiale si concluse con l'entrata di Lipizza in territorio italiano nel 1918. Il 17 luglio 1919, 109 cavalli vennero consegnati dall'Austria e vennero riportati a Lipizza. Successivamente, all'inizio della seconda guerra Mondiale, i cavalli presenti nell'allevamento vennero confiscati dalle truppe tedesche che li trasferirono ad Hostouň, a nord di Praga.

Solo il 18 novembre 1947 l'Italia recuperò i Libri genealogici ed una parte dei cavalli che le erano stati sottratti il 12 ottobre 1943: in tutto 5 stalloni, 42 fattrici, e 33 puledri nati tra il 1943 ed il 1946 che vennero portati a Pinerolo in provincia di Torino e dopo pochi mesi al Centro Rifornimento Quadrupedi del Lazio a Montelibretti in provincia di Roma. Infine, il 15 febbraio 1955, l'azienda di allevamento, i cavalli (7 stalloni, 33 fattrici, 20 puledri e 38 puledre) ed i Libri genealogici originali passarono al Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, il quale le affidò in gestione all'allora Istituto Zootecnico Sperimentale, poi Istituto Sperimentale per la Zootecnica ed oggi CRA-PCM.

Caratteri morfologici della razza.

I cavalli Lipizzani nascono con un mantello sauro o baio di diversa tonalità del colore, ma tra i quattro e i sei anni di età diventano grigi, variando dal grigio ferro al grigio perla.

Il tipo è mesomorfo, con un'altezza al garrese minima di 153 cm e che, per l'impiego in alta scuola, non dovrebbe superare i 158 cm. Tuttavia sono frequenti i soggetti che superano abbondantemente i 160 cm.

La struttura è caratterizzata da ossa relativamente corte e di buon diametro, che fanno da impalcatura ad una muscolatura ipertrofica. Il collo è robusto e portato verticalmente, la testa non è particolarmente leggera, ma di forme molto eleganti in gran parte provenienti dal sangue arabo. Il portamento di collo e testa al trotto è di particolare bellezza e costituisce una caratteristica specifica della razza.

La muscolatura abbondante, su ossa corte fa muovere il cavallo in modo tale da alzare gli arti con movimenti più in elevazione che in avanzamento. Questo tipo di movimenti determina quel passo alto, da parata, di eccezionale eleganza, che è tipico della razza Lipizzana. La linea dorsale presenta una leggera cifosi, e la groppa è ovale e spiovente, caratteristiche che rendono il cavallo più adatto al lavoro in piano che al salto. Gli zoccoli sono ampi e robusti, il che conferisce una bassa predisposizione alle tare dello zoccolo e una resistenza ai microtraumi.

1.1 A.S.Ca.L. - Allevamento Statale Cavallo Lipizzano

Il CRA-PCM gestisce l'A.S.Ca.L. (Allevamento Statale del Cavallo Lipizzano), con il compito di salvaguardare e conservare il patrimonio genetico del cavallo di razza Lipizzana, mantenendo il nucleo di selezione in purezza, al riparo da ogni meticciamiento.

Nell'azienda di Casali Nuovi di Montemaggiore, sita in Montelibretti (RM), sede operativa dell'ASCaL, si adotta lo schema classico di selezione su cavalli diretti discendenti dei riproduttori allevati a Lipizza prima della Prima Guerra Mondiale e appartenenti alle 6 linee di sangue maschili (Conversano, Neapolitano, Maestoso, Pluto, Favory e Siglavy) ed a 11 (Almerina, Africa, Argentina, Ivanka, Deflorata Djebrin, Europa, Fistula, Spadiglia, Sardinia, Theodorosta) delle 15 famiglie femminili classiche.

Il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali

attraverso l'Istituto Sperimentale per la Zootecnia, ha dedicato un notevole impegno al recupero dell'allevamento sia sotto il profilo gestionale che per quanto riguarda gli aspetti tecnici della conservazione della razza.

Dal 1984 a tutt'oggi la tenuta del Libro Genealogico della Razza Lipizzana è affidata all'A.I.A. (Associazione Italiana Allevatori).

L'ASCaL oltre a partecipare a manifestazioni equestri per la promozione della razza e a fornire cavalli alle forze armate ed ai corpi di polizia, gestisce la conservazione e salvaguardia della razza, con un continuo monitoraggio di tutti gli indicatori della variabilità genetica della razza.



Figura1 Cavalli Lipizzani nell'allevamento di Tor Mancina (CRA-PCM).



Figura 2 Scuderia dell'allevamento di Tor Mancina

1.2 Management

L'azienda dispone di una superficie di oltre 160 ha accorpate, di cui 76 ha coltivate in asciutta per la produzione di foraggi, cereali e paglia, da reimpiegare in azienda per l'alimentazione e le lettiere e 70 Ha impiegati a prati-pascolo naturali, permanenti, che garantiscono spaziosi e ricchi pascoli, dove i cavalli vivono secondo un sistema di allevamento di tipo semi-brado che oggi prevede un costante contatto con l'uomo.

I soggetti oggi presenti in allevamento sono circa 168, ripartiti nelle categorie: stalloni (7), fattrici (46), puledri fino a quattro anni (97), cavalli oltre i quattro anni (11) e cavalli in lavoro (7).

La monta solitamente è brada e viene eseguita da marzo a giugno, distribuendo le fattrici in differenti gruppi, tanti quanti sono gli stalloni.

La formazione dei gruppi di monta si basa su un piano di accoppiamento programmato, al fine di contenere i livelli di consanguineità.

I puledri, ad un'età media di sei mesi, vengono svezzati per essere incapezzati e domati. Si tratta di una attività necessaria in quanto l'immissione in rimonta di soggetti addestrati facilita la regolare gestione delle mandrie.

La scelta della rimonta viene effettuata al più tardi durante il terzo anno di età, i soggetti non destinati alla riproduzione vengono venduti.

Giornalmente i cavalli in fase di addestramento ed i cavalli già addestrati vengono impiegati in attività di lavoro, a sella ed agli attacchi.

Inoltre per una migliore gestione e per avere sempre una visione completa di ciò che avviene in allevamento, tutti i dati genealogici, a partire da quelli storici fino ad oggi e quelli riferiti agli eventi che giornalmente si verificano, sono registrati in apposito archivio informatico, costantemente aggiornato.

1.2.1 Materiali e metodi

1.2.1.1 Costruzione degli alberi genealogici

Sono stati esaminati i Libri genealogici originali disponibili. Si tratta di sette volumi per le fattrici di complessive 1.048 pagine, due per ciascuna fattrice nata nel nucleo tra il 1818 ed il 1959; due volumi per gli stalloni di complessive 260 pagine, due per ogni stallone nato nel

nucleo tra il 1817 ed il 1958; quattro volumi per la registrazione dei puledri (10 ogni due pagine) e due volumi di indici per la ricerca dei riproduttori. Tutte le registrazioni fino alla prima guerra mondiale sono manoscritte in tedesco in carattere gotico corsivo. Vi sono registrate le genealogie, gli allevamenti di provenienza, le rilevazioni zoognostiche, le cause di riforma e tutta la carriera riproduttiva, costituendo un'imponente messe di dati ancora non del tutto esaminata.



Figura 3 - Antichi *Stud-books* (registri anagrafici)

Tuttavia i Libri originali non riportavano tutte le informazioni genealogiche sui pochi riproduttori esterni che pur vennero impiegati: in particolare uno stallone arabo e tre stalloni Lipizzani vennero introdotti da altri allevamenti dell'impero tra il 1850 ed il 1915, due stalloni vennero introdotti a Lipizza tra le due guerre, alcuni stalloni, anche arabi, vennero usati dai Tedeschi durante la II guerra mondiale ed infine alcune femmine furono scambiate nel primo dopoguerra e nel 1980 con l'allevamento di Lipizza, allora in Iugoslavia, e altre con l'allevamento federale austriaco di Piber nei primi anni '80. È stato quindi necessario verificare le genealogie mancanti presso l'allevamento statale Austriaco di Piber, presso la Lipizzan International Federation, presso l'American Lipizzan Association e su vecchi certificati genealogici emessi dai Libri genealogici di diversi Paesi. Le genealogie di tutti i soggetti attualmente allevati presso l'ASCaL sono completamente ricollegate ai riproduttori di fondazione che danno il nome alle linee e famiglie classiche.

Partendo dalla composizione dei gruppi di monta del 2007 (7 stalloni e 46 fattrici), identificati come popolazione di riferimento, si è risaliti ad identificare tutti gli ascendenti: i dati così ottenuti sono stati elaborati per quantificare il contributo di ciascun fondatore, i contributi marginali degli ascendenti più importanti e per calcolare con diversi metodi il numero teorico di soggetti indipendenti, equivalenti in termini di variabilità genetica alla popolazione fortemente imparentata del nucleo.

1.3 Risultati

1.3.1 Costruzione degli alberi genealogici

Le accurate indagini sugli ascendenti, che comunque non sono terminate, hanno rimesso in discussione nozioni che sembravano definitivamente acquisite. Ad esempio, l'esame dei Libri genealogici originali consentì di scoprire che le famiglie "Deflorata" e "Presciana/Bradamanta" erano in realtà una sola, con capostipite Deflorata (1767), la figlia Bradamanta (1777) e la nipote Presciana (1782). Questo risultato venne successivamente avvalorato da un lavoro sulle sequenze del DNA mitocondriale di fattrici Lipizzane di diversa origine (Kavar et al., 1999). Il DNA mitocondriale viene trasmesso esclusivamente per via materna e gli Autori trovarono, tra l'altro, che le discendenti di Deflorata (1767) e Presciana (1782) presentavano una identica

sequenza nucleotidica, avvalorando l'ipotesi di un diretto legame tra di esse. Inoltre, sempre dalle registrazioni genealogiche originali, anche le famiglie "Europa" e "Capriola" risultarono essere un'unica famiglia la cui capostipite era Europa (1774) ed una delle sue due figlie era Capriola (1785). È in fase di pubblicazione una vasta ricerca condotta dal CRA-PCM assieme alla Facoltà di Medicina veterinaria dell'Università di Perugia sulla caratterizzazione del DNA mitocondriale. Già sulla base dei primi risultati, è stato possibile verificare l'attendibilità dell'attribuzione delle fattrici alle rispettive famiglie.

Un altro esempio fu il recupero della genealogia di Pluto Nadrozica, stallone largamente usato a Piber (Austria) tra le due guerre anche se di esso si sapeva solo che era nato a Lipizza, probabilmente nel 1910. Dopo aver rilevato che in tutta la storia di Lipizza era stata impiegata una sola fattrice di nome Nadrozica, che essa era nata nel 1895 e che aveva generato quattro figli maschi con uno stallone della linea Pluto (Pluto Bona 1903), e che i puledri erano nati il 09.11.1908, il 29.11.1909, il 13.02.1911 ed il 23.01.1912, fu inevitabile identificare lo stallone Pluto Nadrozica nel puledro nato il 13 febbraio 1911. L'apparente perdita dei dati è comprensibile alla luce del generale crollo della società austriaca nel difficile primo dopoguerra. Una volta consolidate le informazioni genealogiche, gli ascendenti noti delle 46 fattrici e dei 7 stalloni impiegati nella stagione di monta 2007 sommavano in totale a 1259 individui, mentre quelli che contribuivano informazioni (eliminati i fondatori con una sola progenie) erano 987, distribuiti su un massimo di 23 generazioni.

Dopo aver escluso i fondatori non informativi da un punto di vista genetico (fondatori con un'unica progenie) si sono calcolati i contributi di ciascuno dei fondatori rimanenti alla costituzione genomica dell'effettivo 2007. In tabella 1 sono elencati in ordine decrescente del loro contributo i 26 fondatori che contribuiscono per oltre l'1 % dei geni della popolazione di riferimento: essi rappresentano complessivamente quasi il 70 % del totale.

Tabella 1 Proporzione di geni nei riproduttori 2007 originati dai fondatori più importanti.

	Nome	Anno di nascita	Contributo %
1	NEAPOLITANO	1790	7,444
2	GAZLAN-OX	1840	6,000
3	TOSCANELLO	1773	5,376
4	MAESTOSO X	1819	4,421
5	SIGLAVY	1810	4,047
6	TOSCANELLO HEDERA	1785	3,969
7	PLUTO III	1775	3,683
8	TADMOR	1834	3,627
9	RATISBONA II	1816	2,821
10	FAVORY	1779	2,783
11	GROZANA II	1817	2,735
12	LIPP I	1797	2,255
13	DEFORATA	1767	2,163
14	MONTEDORO	1766	2,024
15	46 FAVORY I	1879	1,954
16	CONFITERO	1796	1,728
17	MONAGY	1817	1,693
18	MORSU	1776	1,689
19	LIPP	< 1754	1,484
20	MONTEDORO FAVORY	1763	1,389
21	MILLORD	1790	1,321
22	SAMSON	1849	1,266
23	CONVERSANO	1784	1,230
24	BEN AZET	1851	1,218
25	MONTEDORO	1776	1,099
26	BELLADONA	1779	1,038
	Totale		69,417

Tra i fondatori riportati in tabella, si osserva che quelli di origine araba contribuiscono per il 18,274 % e quelli Puro Sangue Inglese per il 2,587 %. Cinque dei sei stalloni classici o i loro immediati discendenti si ritrovano entro i primi 10 posti, e Conversano 784 (figlio di

Conversano 767) si trova al 23° posto. Complessivamente i sei stalloni classici di fondazione contribuiscono per il 23,614 % del totale, molto più di quanto trovato da Zechner et al. (2002) sia perché quegli Autori avevano esaminato congiuntamente diversi nuclei europei, sia perché avevano incluso nella loro analisi anche i fondatori non informativi.

Tuttavia, il metodo della probabilità dell'origine dei geni non tiene conto dei "colli di bottiglia" nel pedigree, e per superare tale problema nel 1997 venne proposto il metodo del "contributo marginale" degli ascendenti sul complesso genico di una popolazione di riferimento (Boichard et al., 1997). È possibile in tal modo definire il numero minimo di ascendenti (fondatori o meno) i cui contributi marginali (quindi indipendenti l'uno dall'altro) sono in grado di spiegare completamente la variabilità genetica della popolazione in esame. In tabella 2 vengono presentati i risultati di tale analisi: bastano 30 ascendenti nati tra il 1911 ed il 1987 per spiegare tutta la variabilità dei riproduttori impiegati in nucleo nel 2007.

Tabella 2 Contributi marginali degli ascendenti dei riproduttori 2007.

	Nome	Fam. Fem m.	Anno nascita	Contributi marginali	Contributi cumulati
1	CONVERSANO AUSTRIA	-	1911	15,31	15,31
2	NEAPOLITANO PASQUA	-	1972	12,36	27,67
3	PLUTO BONADEA	-	1941	11,87	39,55
4	FAVORY STRANA	-	1948	10,36	49,91
5	MAESTOSO MIRABELLA	-	1972	8,40	58,31
6	NEAPOLITANO SLAVONIA I	-	1928	4,87	63,18
7	ALBA	Al	1945	4,20	67,37
8	CONVERSANO ROMANIA	-	1948	4,14	71,52
9	SESSANA	Fi	1982	4,05	75,57
10	SIGLAVY ALGA	-	1971	3,76	79,33
11	FAVORY ROMANIA	-	1979	3,19	82,52
12	DELIA	Dj	1967	2,94	85,46
13	TELESIA	Iv	1986	2,26	87,72
14	ALBONA	De	1968	1,65	89,37
15	GIOIA	Sa	1976	1,39	90,76
16	MIRABELLA	Al	1979	1,37	92,12
17	ANIMOSA	Ar	1954	1,19	93,31
18	SPADIGLIA II	Sp	1968	1,12	94,43
19	TROPEA	Eu	1987	0,90	95,33
20	FAVORY SAVA	-	1981	0,87	96,20
21	RARA	Af	1984	0,80	96,99
22	STORIA	Iv	1967	0,70	97,70
23	CONVERSANO BLANCA II	-	1974	0,51	98,20
24	SANTIA	Al	1935	0,50	98,70
25	MADDALENA	De	1979	0,33	99,03
26	RENNA II	Iv	1984	0,32	99,35
27	QUIRINA	De	1983	0,31	99,66
28	ORIA	Th	1981	0,16	99,82
29	MAESTOSO AMABILE	-	1954	0,10	99,91
30	GRAZIELLA	Me	1935	0,09	100,00

È interessante notare che in tabella 2 appaiono solo stalloni delle sei linee classiche, e che il loro contributo cumulato è pari ad oltre tre quarti del totale (Conversano 19,96; Neapolitano 17,23; Favory 14,42; Pluto 11,87; Maestoso 8,50; Siglavy 3,76; Totale 75,74 %). Inoltre, per quanto riguarda gli ascendenti femminili, appaiono soggetti di tutte le 11 famiglie rappresentate presso l'ASCaL, più la famiglia Mercurio oramai estinta.

È quindi evidente che lo studio dei contributi marginali alla popolazione attualmente in riproduzione fornisca un quadro molto diverso da quello che si può ricavare dallo studio dei contributi dei fondatori. Appare infatti che i contributi marginali degli ascendenti siano in

perfetto accordo con quanto ci si attende da una strategia riproduttiva di conservazione delle linee maschili e delle famiglie femminili classiche basata sullo schema riproduttivo tradizionale. Infine, per rappresentare in forma sintetica la variabilità di una popolazione di riferimento, è utile quantificare il numero di soggetti indipendenti che sarebbero in grado di produrre la medesima variabilità genetica della popolazione in esame.

I contributi dei fondatori consentono di calcolare il numero di fondatori effettivi o "fondatori equivalenti" (f_e), mentre dai contributi marginali degli ascendenti più importanti è possibile calcolare il numero di ascendenti effettivi (f_a). Inoltre, è possibile ottenere un'ulteriore e diversa stima a partire da un metodo iterativo, basato su una simulazione Monte-Carlo, per stimare la probabilità di un gene fondatore di essere ancora presente nella popolazione di riferimento. Da tali probabilità è possibile calcolare il numero effettivo dei genomi di fondazione rimanenti nella popolazione attuale (N_g) (Crow e Kimura, 1970).

In generale, f_e fornisce stime affidabili solo se le progenie sono numerose ed equilibrate tra i diversi genitori ad ogni generazione; f_a tiene invece conto della riduzione di variabilità genetica indotta dagli eventuali "colli di bottiglia" presenti nei pedigree; infine N_g tiene conto di tutte le fonti casuali di perdita di geni per le segregazioni ad ogni generazione.

In tabella 3 vengono riportate le stime ottenute elaborando i 1259 ascendenti dei 53 soggetti della popolazione di riferimento.

Tabella 3 Analisi dei fondatori dei riproduttori impiegati nel 2007

	Totale ascendenti	Numero fondatori	Pop. rif.	f_e	f_a	N_g
Totale	1.259	232	53	47,4	12,02	2,6 ± 0,74
Stalloni	439	117	7	47,3	11,47	2,3 ± 0,68
Fattrici	820	115	46	49,5	12,60	2,6 ± 0,74

I risultati confermano quanto ci si poteva attendere per un nucleo tenuto chiuso per un tempo molto lungo, con numerosi "colli di bottiglia" nei pedigree dovuti alle diverse vicissitudini storiche e necessariamente con pochi figli per ciascun riproduttore: mentre il numero di fondatori effettivi è abbastanza elevato e vicino alle dimensioni della popolazione di riferimento (47,4), il numero di ascendenti effettivo è molto più basso (12,02). Infine, il numero effettivo dei genomi di fondazione rimanenti, calcolato mediante 1000 iterazioni Monte-Carlo, è ancora inferiore (2,6 ± 0,74).

1.3.2 Stima del coefficiente di consanguineità

Dall'analisi dei dati ottenuti in tabella 4 si evince che considerando tutti gli animali, la percentuale di omozigosi è aumentata del 6% circa, sia nei maschi che nelle femmine nel corso degli ultimi sessanta anni.

Nella tabella 5 sono riportati i coefficienti medi di consanguineità dei soli soggetti maschi e femmine che sono stati effettivamente utilizzati come riproduttori, notando come il valore varia da 9,2 nel primo decennio (1946-1955) a 15.5 nell'ultimo decennio (1996-2005).

Questo andamento crescente della consanguineità, è da attribuirsi al fatto che durante il quarto e il quinto decennio, la numerosità degli animali destinati alla riproduzione si era notevolmente ridotta.

Nell'ultimo decennio e tuttora, si sta cercando di ripristinare un livello di eterozigosità, nei limiti biologici, aumentando il numero di soggetti da immettere in riproduzione. I risultati di accoppiamenti programmati mirati si potranno osservare nel prossimo decennio.

I valori di consanguineità stimati sono abbastanza alti in assoluto, ma relativamente contenuti ove si consideri che l'ASCAL è un nucleo chiuso di allevamento.

Tabella 4 Valori medi del Coefficiente di consanguineità e deviazione standard per sesso e per decenni, di tutti i soggetti nati dal 1945 al 2005.

Decennio	Maschi			Femmine			Totale		
	n	c	± ds	n	c	± ds	n	c	± ds
1	20	8.6	± 0.73	69	9.7	± 0.39	89	9.2	± 0.41
2	18	9.9	± 0.76	35	10.0	± 0.55	53	10.0	± 0.47
3	12	11.0	± 0.94	26	10.8	± 0.64	38	10.9	± 0.56
4	6	11.8	± 1.33	41	13.4	± 0.51	47	12.6	± 0.71
5	88	14.7	± 0.34	95	14.0	± 0.33	183	14.3	± 0.24
6	155	15.2	± 0.26	160	15.0	± 0.26	315	15.1	± 0.18

n = numerosità c = coefficiente di consanguineità ds = deviazione standard

Tabella 5 Valori medi del Coefficiente di consanguineità e deviazione standard per sesso e per decenni, di tutti i soggetti riproduttori impiegati dal 1945 al 2005.

Decennio	Maschi			Femmine			Totale		
	n	c	± ds	n	c	± ds	n	c	± ds
1	14	8.5	± 0.74	34	9.7	± 0.48	48	9.1	± 0.44
2	17	9.0	± 0.68	43	9.8	± 0.43	60	9.4	± 0.40
3	18	10.4	± 0.66	31	11.1	± 0.50	49	10.8	± 0.41
4	13	12.8	± 0.77	31	13.0	± 0.50	44	13.0	± 0.46
5	7	12.5	± 1.00	20	13.1	± 0.62	27	12.8	± 0.61
6	14	16.3	± 0.74	73	15.4	± 0.32	87	15.8	± 0.40

n = numerosità c = coefficiente di consanguineità ds = deviazione standard

1.4 Utilizzo dei risultati per la conservazione e valorizzazione della mandria

L'analisi dei contributi marginali degli ascendenti ha evidenziato l'efficacia dello schema riproduttivo tradizionale basato sul sistema dei nomi per distribuire i contributi tra le diverse linee e famiglie. Tuttavia, il lungo periodo di abbandono dello schema riproduttivo tradizionale e la diversa numerosità dei gruppi di monta dei diversi stalloni ha squilibrato la composizione genetica dei riproduttori ed attualmente all'ASCAL le linee maschili Maestoso e Siglavy sono fortemente sotto rappresentate.

Come era prevedibile trattandosi di un allevamento nucleo condotto da circa due secoli in condizioni di isolamento quasi perfetto, il numero di ascendenti effettivo è basso ed attorno alle 12 unità, mentre le simulazioni tese a misurare il numero di genomi di fondazione rimanenti forniscono stime ancora inferiori. La consanguineità media dei riproduttori è abbastanza elevata, anche se per il momento non sembra dare effetti indesiderati. E' comunque possibile che la continua ricerca storica possa portare all'individuazione di ulteriori vincoli di parentela tra gli ascendenti.

Se l'ASCAL fosse un allevamento privato di cavalli sportivi probabilmente questa situazione consiglierebbe la partecipazione ad un più ampio programma selettivo che preveda lo scambio riproduttori con altri allevamenti.

Tuttavia, un allevamento equino di proprietà e conduzione pubblica giustifica la propria esistenza solamente se è in grado di svolgere un'attività di interesse pubblico. In tal senso l'Allevamento Statale del Cavallo Lipizzano è in grado di svolgere, molto più di quanto abbia avuto occasione di fare finora, alcuni compiti di grande interesse, quali la rappresentanza, i servizi di polizia, lo sport, fino all'impiego di riproduttori per programmi razionali di produzione di incroci. Si ricorda in proposito la produzione sperimentale di alcuni soggetti d'incrocio nati nel 2005 e nel 2006 da Favory Telesia (n.226) e alcune cavalle Sella italiano presso il Centro ippico di Ladispoli (RM) della Polizia di Stato.

Ma al di là dei servizi che certamente l'ASCAL può fornire, il principale ed insostituibile scopo dell'ASCAL è quello di assicurare la conservazione per le generazioni future della risorsa genetica "Lipizzana" al riparo da rischi di meticciamiento. Gli strumenti per il contenimento

della consanguineità in un nucleo di piccole dimensioni consistono essenzialmente nel mantenere il più alto numero possibile di riproduttori, nel tenere il rapporto tra i sessi quanto più possibile vicino all'unità, nell'evitare accoppiamenti tra consanguinei stretti e nell'allungamento dell'intervallo di generazione. E' abbastanza difficile invece trovare nuovi soggetti con caratteristiche genealogiche conformi: gli allevamenti dei Paesi del centro Europa hanno seguito un proprio processo evolutivo sviluppando le proprie famiglie, mentre l'allevamento federale austriaco di Piber, gemello di quello italiano, subì nel 1981 una devastante epidemia di herpes, e per ripristinare la consistenza dovette importare cavalli, oltre che dall'ASCaL, anche dalla Romania (Zechner et al., 2002). Gli scambi di materiale genetico non sono quindi facili perché è difficilissimo trovare soggetti integralmente discendenti da riproduttori allevati a Lipizza prima del 1915.

In ogni caso, il lavoro condotto in Italia negli ultimi 10 anni sulle linee di fondazione della razza ha avuto una certa risonanza internazionale, ed ha contribuito a sancire l'importanza della conservazione delle genealogie classiche nei nuclei di allevamento statali che continuano ad esistere nei Paesi già parte dell'Impero Asburgico.

Si tratta di un impegno di testimonianza che deve continuare per preservare, con i cavalli dell'ASCaL, un esempio di cultura "materiale" che evidenzia la capacità di coloro che si dedicarono alla selezione dei cavalli in un'epoca in cui i cavalli erano la base della potenza militare ed economica degli imperi.

1.5 Ringraziamenti

Si ringrazia il Sig. Arduino Zappi per la gentile concessione delle foto.

1.6 Bibliografia

- Boichard D., Maignel L., Verrier É., 1997. The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genet.Sel.Evol.*, 29: 5-23.
- Crow J.F. and Krimura M., 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper and Row, New York, pp 591.
- Kavar T., Habe F., Brem G., Dovč P., 1999. Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. *Anim.Gen.*, 30: 423-430.
- Zechner P., Sölkner J., Bodo I., Druml T., Baumung R., Achman R., Marti E., Habe F., Brem G., 2002. Analysis of diversity and population structure in the Lipizzan horse breed based on pedigree information. *Liv.Prod.Sci.* 77: 137-146.

CONSERVAZIONE E VALORIZZAZIONE DELLA RAZZA BOVINA MAREMMANA*

Responsabili Scientifici: Dr. Gennaro Catillo, Dr. Cinzia Marchitelli, Dr. Luca Buttazzoni

CRA-PCM Centro di ricerca per la produzione delle carni ed il miglioramento genetico
Via Salaria, 31– 00015 Monterotondo (RM)

Riassunto

La razza bovina Maremmana discende dal *Bos taurus macroceros* che si diffuse in Europa dalle steppe asiatiche e che, in Italia, può rintracciarsi fin dai tempi degli antichi Etruschi. Questo ceppo ancestrale (il *Bos silvestris* descritto da Plinio nella sua *Naturalis historia*) sarebbe stato incrociato con bovini di ceppo podolico derivanti dal *Bos primigenius podolicus* di origine mediorientale dando così origine alla razza Maremmana. La peculiarità di questa razza è stata la capacità di sopravvivere nelle zone paludose e infestate dalla malaria dell'Italia centrale (Toscana e Lazio). Riproduttori di questa razza sono stati esportati in diverse regioni e Paesi del Mondo. Nel corso del XX secolo l'allevamento della Maremmana ha attraversato diversi momenti di crisi e negli ultimi decenni la razza è stata annoverata tra quelle minacciate di estinzione.

Fin dal 1923, quando fu fondato l'Istituto Zootecnico di Roma, progenitore dell'odierno CRA-PCM, nell'azienda di Tor Mancina viene allevato un nucleo in purezza di soggetti Maremmani. Il nucleo iniziale era composto da 60 vacche e tre tori, provenienti da vari allevamenti della maremma tosco-laziale. Ad oggi l'allevamento è composto da 92 tra vacche e giovenche, 63 giovani animali e tre tori che sono attivi in genere per 4 anni. Le femmine vengono allevate tutto l'anno all'aperto e al pascolo.

I dati genealogici e riproduttivi sono stati registrati, nel corso degli anni, sotto varie forme, ma sempre su supporto cartaceo. Si è resa così necessaria la creazione di un data base su supporto informatico contenente i dati genealogici e fenotipici (parti, pesi, aspetti sanitari, eliminazioni ed altro) di tutti gli animali del passato e del presente. Le informazioni genealogiche raccolte nel database saranno utili per ricostruire le famiglie, in base al toro, e per calcolare il coefficiente di parentela e di consanguineità.

Summary

The longhorned Maremmana breed is a descendent of the *Bos taurus macroceros*, that spread from the Eurasian steppes throughout Europe and that, in Italy, can be traced as far back as the Etruscan era. This cattle (the *Bos Silvestris* described by Pliny in his *Naturalis historia*) was later crossed with the Podolica cattle developed from *Bos primigenius podolicus* in Middle-East, giving rise to the Maremmana breed. The peculiarity of this breed is the ability to survive in the marshy and malarial areas of the Maremma in Central Italy (Tuscany and Latium). Maremmana breedingstock was exported from these areas to various regions and countries. During the XX century, the Maremmana breed registered a consistent decrease in the number of animals, so that it is now enlisted among the endangered breeds.

In the experimental farm of CRA-PCM, a purebred Maremmana nucleus is maintained; the animals derive from 60 cows and 3 bulls that were part of the original nucleus in 1923, when the research institute was established. Today the Maremmana herd consists of 92 cows and heifers, 63 young animals and three bulls; breeding bulls are normally changed every four years. (Females are kept on range along the whole year.) The females are bred all year round outdoor grazing. Over the years, genealogical data and phenotypes of animals have always been registered on paper. In order to process these data it is now necessary to create an electronic database, containing both the genealogy and the available phenotypes (calvings, body weights, veterinary records, culling reasons and other events) of all the animals. It will then be possible to construct families, on the basis of the sire, and to calculate the coefficients of kinship and inbreeding.

Parole chiave: Razza Maremmana, conservazione, consanguineità, gemellarità

Keywords: Maremmana breed, preservation, inbreeding, twinning

* doi:10.4458/0986-25

1 La razza bovina Maremmana

La razza bovina Maremmana discende dal *Bos taurus macroceros* che si diffuse in Europa dalle steppe asiatiche e che, in Italia, può rintracciarsi fin dai tempi degli antichi Etruschi. Questo ceppo ancestrale (il *Bos silvestris* descritto da Plinio nella sua *Naturalis historia*) sarebbe stato incrociato con bovini di ceppo podolico derivanti dal *Bos primigenius podolicus* di origine mediorientale dando così origine alla razza Maremmana.

La Maremmana viene allevata tra la bassa Toscana e l'alto Lazio, a ridosso della fascia costiera grossetana e viterbese nel cuore della Maremma. Dalla Maremma essa è stata esportata in diversi paesi: i Granduchi di Toscana, in particolare, esportarono soggetti Maremmani, nei loro possedimenti in Ungheria, per incrociarli con la razza Pustza, anch'essa di ceppo podolico.

Nel corso del XX secolo la Maremmana ha attraversato diversi momenti di crisi, causati inizialmente dalla grandiosa opera di bonifica della zona paludosa della Maremma, che rese disponibili all'agricoltura molti dei terreni in cui pascolava questa razza. In quel periodo, la Maremmana veniva considerata da molti allevatori una razza primitiva e poco redditizia, ma a metà degli anni sessanta fu rivalutata, grazie alle sue caratteristiche di robustezza, rusticità, resistenza alle malattie e adattamento all'allevamento allo stato brado. Fu utilizzata per la produzione di vitelli da ristallo puri o derivanti da incroci con razze da carne più prestigiose (Chianina e Charolaise).

La razza è frutto della selezione naturale che ha esaltato alcune sue caratteristiche tra cui la robustezza di costituzione, la resistenza alle malattie, la frugalità e la sua conformazione, quest'ultima caratteristica che la identifica nel tipo brachimorfo.

Le sue attitudini produttive riguardano soprattutto il lavoro, totalmente sostituito dall'avvento della meccanizzazione, e la carne. Anche quest'ultima caratteristica ha assunto sempre minor valore rispetto a quella di altre razze da carne (in particolare per la minor resa).

La minor produttività e la sempre più diffusa intensificazione e specializzazione dell'allevamento bovino, ha determinato negli ultimi decenni una contrazione numerica della razza Maremmana, tanto da annoverarla tra le razze a rischio di estinzione.

Attualmente gli allevamenti di Maremmana che possono garantire la conservazione del tipo genetico sono in numero limitato e ancor meno sono quelli che attuano piani di miglioramento genetico ben bilanciando i caratteri di adattamento all'ambiente e quelli di produzione. Tutto ciò al fine di garantire non solo la conservazione della razza ma anche di valorizzare il sistema di allevamento bovino brado nelle aree marginali.

Nel 2010 la consistenza della razza bovina Maremmana (fonte ANABIC) era di 10.029 capi, distribuiti in 201 allevamenti localizzati in otto regioni.

Caratteri morfologici della razza.

Testa piccola nella vacca e corta e larga nel toro; corna a lira nella vacca e più circolari e meno curvate nel toro, di colore avorio alla base e nere in punta; collo corto con pronunciata gibbosità e sviluppatissima pagliolaia che va dal mento allo sterno; tronco con torace alto, profondo e largo che va restringendosi verso la groppa. Arti robusti, appiombi perfetti, articolazioni ampie, unghioni compatti, stinchi e pastorali corti, caratteristiche dell'animale che lo adatta perfettamente per il pascolo.

Altezza al garrese di 1.50 m nella vacca e 1.55 m nel toro, il peso oscilla da 500 a 650 kg nella vacca e da 800 a 950 kg nel toro.

Mantello si presenta grigio più chiaro nelle femmine e più scuro con peli neri nel maschio; musello è generalmente nero con alone bianco.

La pelle è pigmentata nera ed è di consistenza spessa.

Alla nascita i vitelli presentano un mantello fromentino che diventa grigio verso il quinto-sesto mese.

1.1 L'allevamento bovino di razza Maremmana di Tor Mancina

Fin dal 1923 quando fu fondato l'Istituto Zootecnico di Roma, il CRA-PCM nell'azienda di Tor Mancina alleva un nucleo in purezza di soggetti Maremmani. Il nucleo iniziale era composto da 60 vacche ed 3 tori in attività, provenienti da vari allevamenti della Maremma tosco-laziale. Ad

oggi l'allevamento è composto di 92 vacche e manze, 63 giovani animali e tre tori che sono attivi in genere per 4 anni, allevati tutto l'anno all'aperto e al pascolo.

Fino al 1978 la mandria era suddivisa in tre gruppi allevati al pascolo in tre differenti località: azienda di Montemaggiore, pascoli di Alingoli e pascoli di Monti dei Preti dell'azienda di Tor Mancina. Attualmente la mandria è suddivisa negli ultimi due gruppi.

La riproduzione nella mandria avviene sia per monta naturale che per inseminazione strumentale. Gli animali sottoposti alla monta naturale sono suddivisi in gruppi di monta al fine di poter risalire con certezza alla paternità del redo.

Il toro viene immesso nel gruppo da maggio ad agosto, gli animali rimangono al pascolo e la diagnosi di gravidanza viene effettuata in autunno, in occasione della profilassi annuale.

Le nascite avvengono nel periodo che va da Febbraio a Giugno e nella prima settimana di vita dei redi si effettua la pesatura, la bollatura e l'immatricolazione per il riconoscimento aziendale.

Il tasso medio di fertilità è del 81%, superiore alla media di razza (77,3%). La mortalità infantile è per lo più dovuta alla morte della fattrice al momento del parto (generalmente per setticemia) od in fase di allattamento, oppure per abbandono da parte della madre del più debole dei due vitelli di un parto gemellare, comportamento che risulta essere frequente.

La rimonta maschile è aziendale per la monta naturale e acquistata all'esterno per la inseminazione strumentale.

Per i torelli l'età al primo salto è intorno ai 2 anni e la loro carriera riproduttiva dura mediamente 4 anni. Le manze vengono inseminate all'età di due anni ed il primo parto avviene a tre anni.

Attualmente l'interparto dura 438 giorni (circa 14,6 mesi).

L'attività riproduttiva delle vacche dura mediamente 10-12 anni, con una media di 8-9 vitelli nella carriera.

Va sottolineato che la riproduzione della mandria è strettamente correlata agli andamenti stagionali che determinano l'andamento produttivo dei pascoli e di conseguenza le condizioni alimentari degli animali.



Figura1 Vacche maremmane nell'allevamento di Tor Mancina (CRA-PCM).

Un aspetto particolare che caratterizza l'allevamento di bovino Maremmano di Tor Mancina è l'elevata frequenza di parti gemellari (10%). Approfonditi studi sperimentali condotti in Nebraska (USA) negli anni '90 del secolo scorso hanno evidenziato un elevato livello di ereditabilità per il carattere "gemellarità" nei bovini. Si ritiene pertanto che anche nella razza maremmana si potrebbe ottenere un veloce responso di selezione.

1.2 Progetto BIODATI: conservazione e valorizzazione della razza bovina Maremmana

Il CRA-PCM nell'ambito del progetto BIODATI ha presentato come preziosa collezione da mantenere proprio il nucleo di bovini maremmani presenti nell'azienda di Tor Mancina.

I dati genealogici e riproduttivi sono stati registrati, nel corso degli anni, sotto varie forme, ma sempre su supporto cartaceo, di conseguenza la gestione della mandria e la scelta dei riproduttori si è basata più su basi empiriche che non su elementi scientifici. Si è invece evidenziato, nel corso di indagini sporadiche, che alcuni soggetti presentano caratteristiche di fertilità e gemellarità superiori agli altri, ma non è possibile studiare l'andamento dei parametri riproduttivi proprio per la mancanza di un data base che includa tutti i soggetti presenti e passati. Anche la scelta di nuovi tori per evitare la consanguineità si basa solo sull'esperienza dei responsabili di tale scelta in quanto, non avendo un archivio elettronico di genealogie, non è possibile stimare i coefficienti di parentela.

Quindi al fine di conservare e valorizzare il nucleo si è deciso di creare un database su supporto informatico contenente i dati genealogici e fenotipici (parti, eventuali pesi, aspetti sanitari, eliminazioni ed altro) di tutti gli animali del passato e del presente. Le informazioni genealogiche raccolte nel database saranno utili per ricostruire le famiglie, in base al toro, calcolare il coefficiente di parentela e di consanguineità. Inoltre saranno registrati tutti i parti gemellari passati e presenti al fine di calcolare il tasso di gemellarità della mandria e l'ereditabilità del carattere.

1.2.1 Raccolta dei dati genealogici e fenotipici

La prima fase del progetto ha riguardato la ricerca e raccolta di tutti i dati genealogici e fenotipici reperibili in azienda e presso l'ANABIC, per tutti i soggetti che sono stati e che sono presenti nell'azienda di Tor Mancina, che sono stati archiviati sotto qualsiasi forma (registri, schede, fogli meccanografici, etc.). I dati presi in considerazione sono:

- gli ascendenti (nome e numero di matricola) fino a X generazioni;
- le date dei parti;
- il numero dei nati per parto;
- il sesso e il peso dei nati;
- patologie riproduttive (aborti, mortalità neonatale...).



Foto 2 Registri anagrafici manoscritti risalenti agli anni '40 della razza bovina Maremmana di Tor Mancina

1.2.2 Costruzione del database

Si metterà a punto la struttura del data base meccanografico che verrà costituito nell'ambito di questo progetto tenendo in considerazione anzitutto i dati disponibili ed in secondo luogo la gestione dei dati (aggiornamento ed elaborazione).

1.2.3 Analisi dei rapporti di parentela

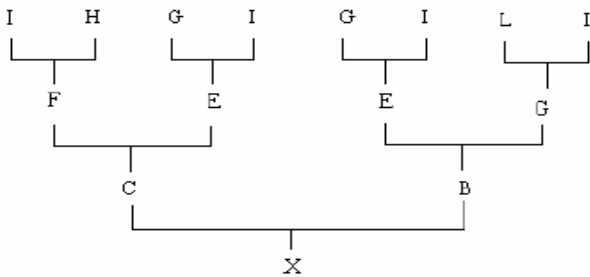
Una volta costruito il database informatico le informazioni raccolte saranno utilizzate per la costruzione degli alberi genealogici, per il calcolo del coefficiente di parentela e di consanguineità.

1.2.3.1 Genealogia

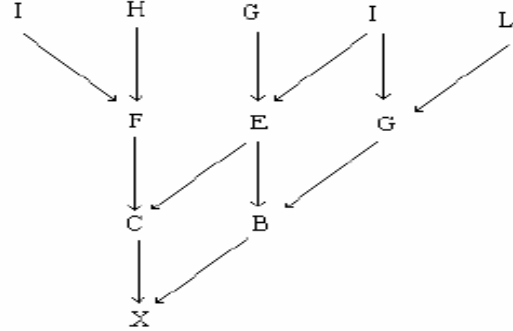
La genealogia o pedigree di un individuo è la sequenza degli individui suoi ascendenti. La costruzione di una genealogia permette di conoscere anche gli individui collaterali. Tutti gli individui appartenenti ad una stessa genealogia, sono detti parenti in quanto condividono per discendenza una quota del loro patrimonio genetico, il quale quindi risulta più simile rispetto alla media della stessa popolazione.

L'albero genealogico è rappresentabile graficamente secondo diverse modalità:

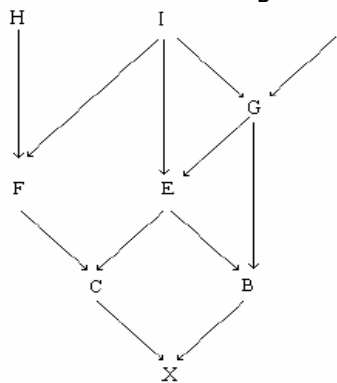
1) Rappresentazione mediante elencazione dei due genitori, quattro nonni, otto bisnonni, ecc.



2) Rappresentazione mediante diagrammi a frecce in cui gli individui si ripetono



3) Rappresentazione mediante diagrammi a frecce in cui gli individui non si ripetono (X)



I pedigree del tipo 1 (e 2) sono comunemente riportati nei certificati genealogici adottati dalle varie associazioni di razza. Questi sono più intuitivi rispetto al terzo, ma a scopi di calcolo non servono e devono essere trasformati in quest'ultimo.

I pedigree del tipo 3 sono quelli più facili da seguire e sono necessari per il calcolo dei coefficienti di parentela e di consanguineità con il metodo del "tracciare le vie". Le frecce partono dal genitore e arrivano alla sua progenie. In generale, un individuo è originato da due frecce, provenienti dai genitori. Quando ad un individuo arriva una sola freccia, significa che non se ne conosce l'altro genitore.

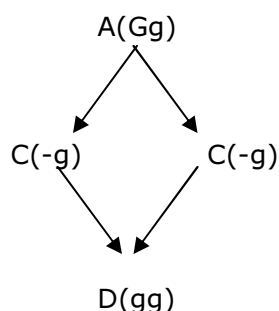
1.2.3.2 Parentela

La parentela quantifica la frazione di geni in comune per discendenza tra due individui (i,j). I geni in comune determinano la somiglianza che caratterizza gli individui tra loro parenti. Quando i geni hanno un effetto semplice e diretto di tipo additivo sul fenotipo, due animali con una parte dei loro geni in comune avranno in comune anche i relativi effetti e questo si tradurrà in una certa somiglianza dei loro fenotipi, riferiti sia ai caratteri morfologici sia produttivi. Si avrà così una parentela additiva (a_{ij}) che, per le produzioni animali, è della massima importanza perché esprime la proporzione di geni in comune tra due individui (i e j) e quindi i relativi effetti genetici. La parentela è quindi associata a una specifica coppia di due individui.

1.2.3.3 Consanguineità

La consanguineità (o inbreeding) indica la proporzione di geni allo stato omozigote per discendenza mendeliana che ci si aspetta siano presenti nel genotipo di un dato individuo. L'espressione "geni omozigoti per discendenza mendeliana" significa geni che derivano dalla duplicazione di un gene originariamente presente in un antenato comune ai due genitori dell'individuo.

Es:



I genitori di D possono aver entrambi ricevuto il gene g da A che aveva una condizione di eterozigosi Gg. C'è quindi una certa probabilità che D sia omozigote. Questa probabilità, relativa a un qualsiasi gene di D, costituisce il coefficiente di consanguineità F_D .

1.2.3.4 Calcolo della parentela additiva e della consanguineità

L'unità di misura di base comune alla parentela e alla consanguineità, intese come quantità, è il coefficiente di kinship "f". Tale coefficiente si definisce come la probabilità che estraendo a caso due alleli allo stesso locus in due individui i e j, questi siano identici per discendenza.

Nel calcolo del coefficiente di parentela tra genitore-figlio risulta che f_{ij} è $\frac{1}{4}$, ciò vuol dire che facendo un'estrazione nel genotipo del genitore e del figlio, la probabilità di trovare lo stesso allele per discendenza sarà pari a 0,25.

La parentela additiva genitore figlio è pertanto:

$$a_{ij} = 2f_{ij} = \frac{1}{2}$$

Inoltre f_{ij} è uguale al coefficiente di consanguineità F della progenie k di i e j. Infatti la formazione di uno zigote può essere vista, ad ogni locus, come l'estrazione a caso di un gene paterno e uno materno. Pertanto:

$$F_k = \frac{1}{2} a_{ij} = f_{ij}$$

$$a_{ij} = 2F_k$$

La parentela e la consanguineità sono intimamente legati. In effetti non vi è consanguineità di un individuo se i suoi genitori non sono imparentati.

I metodi di stima della parentela e della consanguineità proposti ed utilizzati sono diversi, i più rapidi ed efficienti sono quelli suggeriti: da Wright (1922) e Falconer (1977) che si basano sulle cosiddette vie di legame dei diversi individui (Path analysis). Si tratta di un approccio molto semplice ed intuitivo che però presenta dei limiti in caso di pedigree complessi. L'altro

metodo è quello tabulare suggerito da Melecot (1948) che si basa su due principi fondamentali:

1. se un animale è parente di un altro, allora uno o entrambi i genitori dell'individuo devono essere parenti dell'altro animale.
2. il coefficiente di consanguineità di un animale è $\frac{1}{2}$ del coefficiente di parentela additiva tra i suoi genitori

Questo metodo è costituito da una tabella (detta matrice di parentela) di n righe ed n colonne ed in essa vengono indicati i coefficienti di parentela additiva tra gli animali della popolazione in oggetto e lungo la diagonale i coefficienti di consanguineità di tutti gli individui della popolazione.

Il vantaggio del metodo tabulare consiste nel fatto che se al pedigree si aggiungono dei nuovi soggetti (nuove nascite nell'allevamento), basterà aggiungere nuove righe (e colonne) alla tabella senza necessità di ricalcolare le parentele già note.

1.2.3.5 Stima del coefficiente di ereditabilità del carattere gemellarità

L'ereditabilità è un coefficiente che concettualmente esprime la quota di variabilità di una differenza o di uno scarto che è di natura genetica; viene indicata generalmente da h^2 .

Un carattere fenotipico di un individuo dipende sia dal suo patrimonio genetico che dalle condizioni ambientali in cui lo stesso vive. Quindi il fenotipo è uguale al genotipo più l'ambiente.

Gli effetti genetici che determinano un genotipo sono: additivi ovvero indipendenti dalla natura degli alleli; di dominanza quando vi è interazione fra alleli; di epistasi quando vi è l'influenza dei geni di un locus su geni di altri loci.

Riferiti ad una popolazione di individui il fenotipo, il genotipo e l'ambiente possono essere misurati come varianza ovvero come scarti o differenze quadratici rispetto al valore medio.

Il rapporto fra la varianza genetica ($V(A)$) (di natura additiva) e la varianza totale ($V(P)$) (genetica + ambientale ($V(E)$)) dà il valore della ereditabilità (h^2).

$$h^2 = V(A) / V(P) = V(A) / [V(A) + V(E)]$$

Il coefficiente di ereditabilità è utilizzato per predire l'efficacia dei programmi di miglioramento genetico e quindi permette di decidere quali strategie utilizzare. La selezione è tanto più efficace quanto più alto è il valore di h^2 ovvero tanto più le differenze di produzione sono trasmissibili.

L'ereditabilità dei caratteri morfologici strettamente legati alla produzione della carne è generalmente elevata (0.30 - 0.50), i caratteri quanti-qualitativi del latte presentano una ereditabilità media (0.20 - 0.30) mentre i caratteri riproduttivi hanno una ereditabilità bassa (0,05 - 0.15).

Come già evidenziato una caratteristica importante della razza Maremmana riguarda la fertilità e la gemellarità. Questi caratteri riproduttivi sono studiati al fine di verificare se è possibile inserirli nei piani di miglioramento per ottimizzare l'efficienza riproduttiva e quindi l'efficienza tecnica-economica dell'allevamento di questa razza.

Nell'azienda di Tor Mancina (CRA-PCM) il tasso di gemellarità va dal 10 al 15 % con una ereditabilità, attualmente stimata su un campione parziale, intorno al 10%.

1.3 Utilizzo dei risultati per la conservazione e valorizzazione della mandria

Grazie alla raccolta di tutti i dati genealogici e fenotipici ed alla loro elaborazione sarà possibile suddividere la mandria attualmente presente in famiglie e sarà possibile stimare i parametri che indicheranno lo stato di inbreeding all'interno di ogni famiglia. Inoltre sarà possibile individuare i riproduttori che hanno diffuso il carattere gemellarità al fine di indagare, mediante strumenti di genomica, sui discendenti per identificare regioni cromosomiche o polimorfismi in geni candidati.

La valorizzazione di questa risorsa passa attraverso la conoscenza delle potenziali capacità produttive e riproduttive. In particolare la identificazione genomica di alcuni caratteri

riproduttivi potrebbe fornire informazioni utili anche per le razze ad elevata specializzazione che attualmente presentano un decadimento dell'efficienza riproduttiva.

La migliore conoscenza della razza è un prerequisito essenziale per verificare la possibilità di aumentarne la redditività attraverso un miglioramento dell'efficienza riproduttiva con la selezione e l'aumento della produttività con l'incrocio delle femmine eccedenti la quota di rimonta con tori di razze specializzate da carne.

Si ritiene che l'allevamento della razza Maremmana possa costituire un'utile alternativa all'utilizzo delle zone de-ruralizzate diffuse soprattutto nell'Italia centrale.

Un aspetto di non meno importanza riguarda la conservazione di una razza attraverso la quale si conserva la biodiversità genetica e quindi la difesa di un patrimonio genetico consolidatosi in secoli di adattamento funzionale al territorio.

1.4 Ringraziamenti

Un ringraziamento al Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali che ha finanziato il progetto BIODATI (D.M. 15421/7303/11 del 14/07/2011). Si ringrazia il Sig. Arduino Zappi per la gentile concessione delle foto.

1.5 Bibliografia

- Bigi D. e Zanon A., 2008. Atlante delle razze autoctone. EDAGRICOLE.
- Falconer D.S., 1977. Introduction to Quantitative Genetics. Longman, London pp 60-67.
- Gregory K.E., Bennet G.L., Van Vleck L.D., Echternkamp S.E., and Cundiff L.V., 1997. Genetic and environmental parameters for ovulation rate, twinning rate, and weight traits in a cattle population selected for twinning. *Journal of Animal Science* 75: 1213 – 1222.
- Komisarek J., Dorynek Z., 2002. Genetic aspects of twinning in cattle. *Journal of Applied Genetic* 43(1): 55-68.
- Marchitelli C. and Nardone A., 2011. Polimorfismi nei geni BMP15, GDF9 e BMP1B e gemellarità nei bovini di razza Maremmana nella Tenuta di Castelporziano. "Il Sistema Ambientale della Tenuta Presidenziale di Castelporziano" III Serie, in press.
- Mason, I.L. 1996. A World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties. Fourth Edition. C.A.B International, pp 273 .
- Melecot G., 1948. Les mathematiques de l'Hérédité, Paris: Masson et Cie. vi + 63 pp.
- Pagnacco G. 2004. Genetica animale applicata. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 107-119
- Tortorelli N., 1977, *Zootecnica Speciale*. Edagricole, 2nd Ed., Bologna, Italy.
- Van Vleck L.D., Gregory K.E., 1995 Genetic trend and environmental effects in a population of cattle selected for twinning. *J. Anim. Sci.*, 74: 522-528.
- Wright S., 1922. Coefficient of Breeding and Relationship. *Amer.Nat.*, 56: 330-338.

LA COLLEZIONE DI GERMOPLASMA DI BACO DA SETA (*BOMBYX MORI* L.) E GELSO APPARTENENTE ALL'UNITÀ DI APICOLTURA E BACHICOLTURA DI BOLOGNA, SEDE DI PADOVA*

Responsabile Scientifico: Dr.ssa Silvia Cappellozza
Co-autori: Dr. Alessio Saviane, Dr.ssa Ludovica Toso

CRA - Centro di ricerca per le colture industriali, Unità di apicoltura e bachicoltura di Bologna, sede di Padova, Via Leonardo Eulero, 6A – 35143 Padova

Riassunto

La sede di CRA-API di Padova possiede due collezioni di germoplasma: una di baco da seta (*Bombyx mori*) e una di gelso (*Morus* spp.); esse si trovano fisicamente unite perché nel passato la bachicoltura e la gelsicoltura erano considerate inscindibili, per la caratteristica di *B. mori* di alimentarsi solo di foglia di gelso. Attualmente, le due collezioni, pur mantenendo un forte legame, hanno un loro valore indipendente, poiché *B. mori* può essere allevato anche sulla dieta sostitutiva della foglia di gelso, mentre quest'ultima essenza arborea può essere valorizzata utilmente per la produzione di biomassa, di frutta, di fibra e di principi attivi per l'industria farmaceutica oltre che per la zootecnia.

La collezione di *B. mori* è andata continuamente arricchendosi fino dalla fondazione della Regia Stazione Bacologica (1871). Alla confluenza della Stazione di Bachicoltura di Ascoli Piceno e di quella di Padova (1958) in unico istituto, l'allora direttrice Porzia Lorenza Lombardi portò con sé numerose razze di baco e varietà di gelso; altre razze per la produzione di seme-bachi furono affidate alla sede patavina (1979) dopo la chiusura del centro genetico ed ecologico di S. Giacomo di Veglia (TV). Recentemente (2009) un'importante collezione di mutanti e antiche razze europee di baco, è stata trasferita a Padova dall'INRA (Lione) con una quindicina di varietà di gelso. Le collezioni di germoplasma di Padova sono uniche nel loro genere. In Europa esiste un'altra collezione analoga, ma non identica, in Bulgaria (Vratza), mentre banche di germoplasma di pari importanza si possono trovare solo in Giappone e Cina.

Summary

The CRA-API seat of Padua maintains two germplasm collections: the former concerns the silkworm (*Bombyx mori*), the latter the mulberry (*Morus* spp.); they are physically joint in the same place because in the past sericulture and moriculture were considered inseparable, as *B. mori* feeds only on mulberry leaves. Currently, the two collections, even though maintaining a strong relationship, have an independent value, because *B. mori* can also be reared on the artificial diet, and the mulberry can be usefully exploited for biomass, fruit, fibre, active ingredients for the pharmaceutical industry production in addition to animal husbandry.

B. mori germplasm collection has been continuously enriching since the establishment of the Royal Sericulture Station (1871). When the Sericulture Station of Ascoli Piceno and Padua merged into one Institution only (1958) the director, at that time Porzia Lorenza Lombardi, transferred several silkworm strains and mulberry varieties with her; other strains for the silkworm egg production were conferred to the Padua seat (1979) after the closure of the Genetic and Ecological centre of S. Giacomo di Veglia (TV). Recently, an important collection of silkworm mutants and ancient European strains was transferred to Padua from the INRA (Lyon) jointly with around fifteen mulberry varieties. Germplasm collections in Padua are unique in their character. In Europe there is another collection only which can be considered analogue, but not overlapping, located in Bulgaria (Vratza), while germplasm banks of equal importance can be found into Japan and China only.

Parole chiave

Baco da seta, razze, linee, *Bombyx mori*, seme-bachi, gelso, *Morus* spp., cultivar, germoplasma

Keywords

Silkworm, strains, lines, *Bombyx mori*, silkworm eggs, mulberry, *Morus* spp., cultivar, germoplasm

* doi:10.4458/0986-40

1.1 Le origini del baco da seta, il suo arrivo in Europa e la storia della collezione di Padova

Si ritiene che il baco da seta (*Bombyx mori* L.) sia originario dell'Asia, in particolare delle pendici sub-himalayane e sia stato ridotto in stato domestico dalle popolazioni indiane o cinesi (Reali *et al.*, 1985). La lunga domesticazione lo ha reso incapace di vivere allo stato selvatico, e la specie che attualmente potrebbe essere identificata come l'antico progenitore è *Bombyx mandarina*, che condivide con il baco da seta molte caratteristiche morfologiche e di sviluppo (Kawaguchi, 1928; Astaurov *et al.*, 1959; Yoshitake, 1968; Chikushi, 1972) ed, inoltre, può essere incrociato con *B. mori*, producendo una progenie fertile. Mentre l'ecotipo giapponese di *B. mandarina* ha un numero cromosomico $2n=54$, le popolazioni del baco selvatico che vivono nell'estremo oriente della Russia e Cina hanno un numero cromosomico $2n=56$, cioè lo stesso di *B. mori* (Chiang *et al.*, 1979). I documenti storici testimoniano il lungo viaggio che ha interessato prima la fibra serica, poi l'insetto stesso, verso Occidente, fino a giungere in Europa, attraverso la famosa via della Seta, facendo tappa alla corte di Giustiniano, dove, secondo la leggenda narrata da Procopio di Cesarea, due monaci, verso il 552 d.C., trasportarono in un bastone cavo, le uova di baco sottratte furtivamente in Cina. Riguardo all'introduzione della sericoltura in Italia i documenti storici sono scarsi; si sarebbe diffusa ad opera degli Arabi in Sicilia attorno al 1000 d.C., o ad opera dei Bizantini in Calabria (IX sec. D.C.), o nell'Italia del Nord (tra IX e X sec. D.C.) o addirittura in Campania nell'XI sec. (Bettelli Bergamaschi, 1989). Comunque, le uova di baco da seta, importate in una o più zone originarie, furono autoriprodotte dagli stessi agricoltori o acquistate presso i contadini e rivendute dai cosiddetti "semai" fino al 1845, che risulta un anno fondamentale per la sericoltura europea. In quest'anno, infatti, si diffonde in Francia una terribile malattia, che partendo dalla Francia si sposta presto in Italia e poi in tutta Europa. La devastazione provocata dall'epidemia, attribuibile ad un fungo sporigeno (*Nosema bombycis*), si può comprendere sulla base delle seguenti cifre: in Italia, subito prima del suo diffondersi, si producevano 3.460.000 kg di seta grezza, se ne ottennero 2.108.000 nel 1863 e 963.000 kg nel 1870 (Pigorini, 1918). Nonostante l'approvvigionamento di seme-bachi sano fosse compiuto in Estremo oriente per molti anni, con viaggi spesso rocamboleschi, la situazione si risolse definitivamente con la scoperta, attribuita formalmente a Pasteur, dell'agente eziologico della malattia e con la diffusione dell'esame preventivo delle farfalle madri. Nel 1969 il Governo austriaco fondò un Istituto bacologico a Gorizia, poco dopo il governo italiano lo imitò con la fondazione della Regia Stazione Bacologica Sperimentale di Padova (1871) (Cappelozza e Cappelozza, 1996). Nel primo decennio dalla sua fondazione la Stazione Bacologica Sperimentale provvide all'esame e confezione di uova di baco da seta prodotte in Italia ed esenti da malattia, limitando così le importazioni di seme-bachi dal Giappone; ben presto, tuttavia, l'attività fu demandata agli Osservatori sericoli, sparsi su tutto il territorio nazionale, su cui la Stazione svolgeva compito di sorveglianza e direzione (*ibidem*) e poco alla volta la produzione delle uova di baco da seta divenne appannaggio degli stabilimenti di produzione di seme-bachi, che erano gestiti da privati e i cui direttori venivano formati presso la Stazione Bacologica. Negli stabilimenti seme-bachi si faceva la riproduzione delle razze di baco da seta e la loro selezione. Stabilimenti erano presenti in tutte le Regioni italiane e vi si allevavano razze geografiche acclimatate nelle diverse zone d'Italia e selezionate localmente per la produttività e/o caratteri di robustezza e resistenza alle malattie. Nel 1918, la direttrice della Stazione Bacologica di Ascoli Piceno, Porzia Lorenza Lombardi, iniziò un'opera di selezione delle vecchie razze italiane, abbandonate dall'industria semaia, cui si aggiunsero altre 27 razze provenienti dall'Istituto di Zoologia dell'Università di Pavia, dove lavorò l'illustre genetista, prof. Carlo Jucci. Il lavoro di Lombardi, durato quarant'anni, formò il primo nucleo di razze della collezione di germoplasma che fu trasportata a Padova, alla chiusura della Stazione di Ascoli Piceno (1958) (Lombardi, 1964). Un altro importante arricchimento della collezione di Padova avvenne alla chiusura dell'ultimo stabilimento seme-bachi italiano, il "Centro Genetico ed Ecologico" di San Giacomo di Veglia (TV) (1976). Le razze del Centro rimasero per tre anni (fino al 1979) presso lo stesso stabilimento gestito dal Co.Se.Ba. (Consorzio Seme Bachi, costituitosi il 25/02/1976); allo scioglimento dello stesso (1979) furono trasferite presso l'Istituzione patavina (Premuda, 2008). Tali razze, secondo quanto descritto dalla stessa Premuda (Premuda, 2007) in un contestato articolo, erano state importate segretamente dal Giappone, con un'operazione di spionaggio industriale svoltasi negli anni '50, quando era apparso evidente che il poliibrido giapponese era molto superiore agli ibridi "bigialli" italiani, a

causa dell'avanzare degli studi di genetica nel Paese del Sol Levante. Queste razze giapponesi, con particolari caratteristiche di produttività, avrebbero costituito il nucleo da cui sarebbero sorte le linee per la produzione del poliibrido del Centro di S. Giacomo di Veglia, che operò per molti anni, anche posteriormente al 1954, sotto il controllo di tecnici giapponesi, in particolare del prof. Kobari (*ibidem*). Tali razze giapponesi confluirono anch'esse nella collezione di Padova. Con la chiusura del centro di S. Giacomo, l'attività di allevamento del baco da seta, sebbene notevolmente ridimensionata, non cessò definitivamente. L'Associazione Nazionale Bachicoltori (ANB) continuò ad importare il seme-bachi da Paesi quali la Cina, il Giappone e la Turchia. Allo scopo di compiere studi sulla possibilità di riprendere l'attività di produzione del seme-bachi in Italia, negli anni '90 furono importate un'altra decina di razze dalla Turchia e dal Giappone da parte di ANB (Tino Sartori, comunic. personale). Anche queste razze furono affidate all'Istituto patavino per il mantenimento, poiché proprio negli anni '90, a causa delle problematiche riguardanti l'inquinamento da fenoxycarb in Italia, la reintroduzione della filiera di produzione del seme-bachi appariva molto difficile. Sempre negli anni '90 una razza albanese fu donata dal dott. Aleksander Xhoxhi a Silvia Cappelozza in seguito alla cessazione dell'attività tecnica in Albania. Gli anni dal 1990 al 2000 furono molto sofferti per quanto riguarda il mantenimento della collezione. Molte razze, sia appartenenti alla vecchia collezione della prof.ssa Lombardi, sia alcune fra quelle ricevute dal Centro, furono perse irrimediabilmente a causa della cosiddetta "sindrome della mancata filatura" (Cappelozza *et al.*, 1990; Viggiani e Loia, 1991; Cappelozza and Burlini, 1992; Cappelozza *et al.*, 1992; Plantevin *et al.*, 1991), determinata da un inquinamento diffuso della foglia di gelso (Arzone *et al.*, 1989), da parte di un insetticida ad azione iuvenilizzante (fenoxycarb) utilizzato sugli alberi da frutta (prevalentemente meli) nel periodo primaverile, per la difesa contro i lepidotteri tortricidi. L'indecisione con cui il legislatore affrontò il problema, con divieti d'utilizzo limitati ad alcune zone dell'Italia, solo tardivamente estesi a tutto il territorio nazionale, esclusa la provincia di Bolzano, l'impiego illegale da parte dei frutticoltori, anche in presenza di una chiara normativa, contribuirono, specialmente nei primi anni d'impiego del presidio fitosanitario, ad un grave danneggiamento della collezione. Infatti, soprattutto in questo periodo, prima che si riuscisse esattamente a capire in che cosa consistesse la "sindrome della mancata filatura" e a prendere una serie di contromisure adeguate, la riproduzione di alcune razze fu danneggiata ed anche la ripetizione degli allevamenti delle stesse, in stagione più avanzata, fu compromessa dal perdurare dell'inquinamento. Fu necessario, in alcuni casi, spostare l'allevamento dal periodo primaverile a quello di fine estate, cui non tutte le razze si adattarono, specialmente le più fragili e meno resistenti alle alte temperature e ad una qualità nutrizionale della foglia di gelso non ottimale. La collezione, perciò, fu temporaneamente ridimensionata nella numerosità delle accessioni in essa presenti. La firma di un trattato, "Agreement for the scientific and technical collaboration", fra il CRA (Unità di Apicoltura e Bachicoltura) e l'Accademia d'Agricoltura Bulgara (Stazione Sperimentale per la Sericoltura e Agricoltura di Vratza), portarono dal 2009 allo scambio di alcune razze fra CRA-API e la menzionata istituzione, con l'importazione di due nuove razze bulgare. Inoltre, sempre alla fine del 2009, venne ratificato con l'INRA francese un accordo per il trasferimento della collezione di germoplasma di *B. mori* dell'Unità Internazionale Sericola di Lione a Padova, dove tale collezione potesse essere conservata e mantenuta disponibile per la collettività scientifica, in seguito alla chiusura dell'Istituzione francese. Sebbene ci fossero delle sovrapposizioni di accessioni fra il germoplasma francese e quello italiano, il numero di nuove razze giunte a Padova fu davvero cospicuo. Inoltre, in seguito a rapporti di collaborazione con istituzioni straniere, la banca di germoplasma di Padova sta continuando ad arricchirsi di razze provenienti dalla Cina, Giappone e dalla Spagna, dove è recentemente sorta una banca privata di antiche razze di baco da seta, da cui sono state ricevute in un rapporto di scambio, due nuove accessioni. La possibilità di allevare le razze in periodi diversi da quelli tipici, grazie alla disponibilità di una dieta sostitutiva della foglia di gelso brevettata da CRA-API (Cappelozza *et al.*, 2005), contribuisce a ripartire nei vari periodi dell'anno il mantenimento di una collezione veramente molto ricca, ma anche di onerosa gestione.



Foto 1 Bachi da seta allevati su dieta artificiale.

1.2 Le risorse genetiche del baco da seta

Le risorse genetiche mantenute nel mondo comprendono numerose razze geografiche, linee "inbred" e mutanti che differiscono per numerosi caratteri morfologici, di sviluppo e comportamentali e biochimici. Si stima che circa 3000 genotipi diversi siano conservati in Asia ed Europa (Nagaraju *et al.*, 2000), anche se probabilmente si tratta di una sovrastima, dovuta al fatto che alcune accessioni sono catalogate in Paesi diversi sotto differenti denominazioni. Si possono identificare, in base ad alcuni tratti distintivi, quattro gruppi di razze geografiche che, oltre a diversificarsi per caratteri morfologici, si differenziano anche per caratteri qualitativi e quantitativi (merceologici): 1) Giapponese; 2) Cinese; 3) Europeo; 4) Tropicale (vedi tab. 1). In generale i genotipi che sono originari di zone tropicali e sub-tropicali sono scarsi produttori di seta, ma riescono a sopravvivere in condizioni avverse (elevate umidità e temperatura ambientale), mentre le razze native delle zone temperate filano bozzoli ricchi di seta, ma sono sensibili alle condizioni climatiche sfavorevoli.

Oltre alle razze, ci sono circa 500 mutanti, ceppi che differiscono dalla popolazione originaria solitamente per un carattere che interessa uno o più geni; i mutanti sono riconoscibili fenotipicamente (colore della membrana sierosa delle uova; colore del tegumento della larva e dell'adulto; colore e forma del bozzolo; colore delle uova;...); o per caratteristiche fisiologiche (numero delle mute, diapausa, tempi di sviluppo; ...); o per caratteristiche biochimiche (amilasi del succo digestivo, amilasi dell'emolinfa, esterasi delle uova e dell'emolinfa, contenuto proteico dell'emolinfa; ...).

Tabella 1 Caratteristiche delle razze geografiche del baco da seta (adattata da Nagaraju *et al.*, 2000)

	Gruppo geografico d'appartenenza			
	Giapponese	Cinese	Europeo	Tropicale
Uova	Sierosa grigio - violacea, corion translucido, uova diapausanti occasionalmente non colorate, mortalità dopo la fase embrionale di pigmentazione del corpo.	Sierosa grigio pallido, corion giallo pallido, scarsa la presenza di uova non fertili o disseccate.	Uovo grande, schiusura delle larve asincrona.	Uova giallo chiaro, che non sopportano le basse temperature e lo svernamento.
Larva	Pigmentazione larvale di tipo selvatico "wild-type", molte rosate alla maturità larvale e giallastre alla muta, piuttosto lente nella crescita, suscettibili ai virus della poliedrosi nucleare e della flaccidezza, non molto sensibili alla qualità della foglia.	Mancanza di pigmentazione larvale (larve bianche), molte giallastre a maturità e biancastre alla muta, veloci nello sviluppo, sensibili alle malattie fungine, non molto sensibili alla temperatura.	Forma del corpo allungata, molte rosate alla maturità, molto lente nella crescita, suscettibili alla pebrina (<i>N. bombycis</i>) e al virus della poliedrosi citoplasmatica, sensibili alle condizioni ambientali sfavorevoli.	Larve bianche, solitamente non pigmentate, molto rapide nella crescita, suscettibili alle malattie fungine, molto resistenti contro le malattie in genere.
Bozzolo	Bianchi di colore, a forma di arachide, con un restringimento, più o meno accentuato nel centro, doppioni occasionali, fibra spessa e corta.	A forma sferica o ellittica, bianchi o gialli, con fibra fine e lunga, molti bozzoli doppi.	A forma allungata, ellittica, con un restringimento centrale più o meno accentuato, bianchi o di colore giallo carneo, abbondanti di sericina, con una buona ricchezza in seta, a fibra fina, pochi bozzoli doppi.	A forma affusolata, dorati rosa o verdi, con un'abbondante quantità di spellaia, con corteccia serica di peso limitato, fibra fine, pochi bozzoli doppi.
Voltinismo	Larva monovoltina	Larva monovoltina o bivoltina	Larva monovoltina	Larva polivoltina

1.3 La collezione di Padova

Le razze ricevute anteriormente al 2009 (trasferimento della collezione di Lione) sono elencate qui di seguito, rispettando la primitiva divisione in gruppi e la descrizione data da Lombardi (1964); si sono, poi, aggiunte altre accessioni, gradualmente importate.

A) Vecchie razze colorate e bianche

A1) Razze Gialle Anellate: sotto questo nome sono comprese vecchie razze recuperate dagli stabilimenti seme-bachi e successivamente selezionate. Presentano come caratteristica comune la cinturazione del bozzolo (cioè un restringimento più o meno accentuato del loro diametro, a circa metà della lunghezza del bozzolo, se considerato nella

dimensione maggiore), così da assumere la caratteristica forma ad arachide. Si tratta di razze originariamente abbastanza produttive, ma attualmente non molto ricche di seta. Sono di colore giallo carneo, di diverse gradazioni a seconda della razza.

- 1) TG10
- 2) Varo
- 3) Brianza
- 4) Abruzzo
- 5) Romagna
- 6) Romagna bis
- 7) Almeria
- 8) B
- 9) Giallo Grecia
- 10) Alpe

A2) Razze oro cinesi: anche queste sono vecchie razze degli stabilimenti seme-bachi, di forma sferica e di colore oro. La loro produzione e ciclo vitale è particolarmente soggetta alle condizioni ambientali.

- 11) AP
- 12) Oro 208

A3) Razze bianche e biancastre: fra queste razze selezionate da ceppi provenienti dagli stabilimenti seme-bachi, Lombardi reputa AP11 la migliore per incrocio con altra razza bianca cinturata. Inoltre, le larve di questa razza risultano robuste e veloci nella salita al bosco. Le razze cinturate Bianca Italia e Novi non presentano un'accentuata ricchezza in seta, ma riescono bene se incrociate con altre razze bianche cinesi. Poiché sono segregazioni di razze gialle, incrociate fra loro, possono dare luogo alla comparsa di individui a bozzolo giallo. La razza Bagdad è originaria del Medio-Oriente, la GB408 è di origine giapponese, selezionate successivamente in Italia.

- 13) AP 11
- 14) B14b
- 15) Bianca Italia
- 16) Novi
- 17) Bagdad
- 18) BS 16
- 19) GB 408

A4) Razze Mari bianche e colorate: Con questo nome vengono indicate razze cinturate e sferiche che furono selezionate da Benedetto Mari a partire da incroci compiuti tra razze derivanti dalle più rinomate zone sericole della Cina. Sebbene originariamente molto ricche in seta, persero questo carattere dopo l'importazione in Italia (nel giro di due-tre anni). Ne esistevano di bianche e colorate, attualmente in collezione ci sono solo razze bianche.

A4-1) Razze Mari bianche sferiche

- 20) 280 M
- 21) 772 M
- 22) 120 M

A4-2) Razze Mari bianche cinturate

- 23) 10 M
- 24) 441 M
- 25) 351 M

B) Nuove razze: sono il risultato del lavoro di selezione di Lombardi, compiuto dal 1918 al 1958; la ricercatrice ne aveva create 105, ma successivamente aveva ridotto il loro numero a sole 26, cioè il meglio della selezione. Provengono da incroci di due o più razze. In particolare la razza SA 48 si è ottenuta per mutazione (tegumento trasparente) ed ha un bozzolo molto piccolo; la razza 21 Malucelli (dal nome del selezionatore) deriva da una mutazione nel colore delle uova che sono rosa-rosse (anziché grigie). Le seguenti sono ancora in conservazione.

B1) Nuove razze colorate

- 26) SA 48
- 27) PL 24
- 28) PL 20
- 29) 21 Malucelli

B2) Nuove razze bianche

- 30) Sa n. 15
- 31) Sa n. 67
- 32) PL 22
- 33) Cinese bava lunga (CHBL)
- 34) Sa 105

B3) Razze polivoltine: le razze polivoltine importate fino al periodo in cui scrive Lombardi (1964) erano allevate durante l'inverno con grande fatica, con piante di gelso vegetanti in serre riscaldate e spesso venivano conservate, a causa della gran fatica nel compiere cicli continui, solo le ovature che perdevano l'originario carattere di polivoltinismo. A quei tempi, infatti, non era possibile allevare con la dieta sostitutiva della foglia di gelso, come viene attualmente realizzato nei nostri laboratori durante la stagione invernale. Perciò, le razze di seguito descritte sono in realtà accessioni in cui il carattere polivoltinismo compare solo parzialmente in alcuni individui.

- 35) Nistari
- 36) Awojiku
- 37) Icot

B4) Razze cinesi e giapponesi importate prima del 1964: comprendono razze treette o derivate da razze treette (a tre mute anziché quattro) o dotate di caratteristiche particolari (colore del bozzolo) o gibbosità del corpo.

- 38) Razza Gialla 9/496
- 39) 175 FA
- 40) Verde cinturato
- 41) Verde ovale
- 42) Gibbosi

C) Razze varie ricevute dall'Istituto di Zoologia "Spallanzani" di Pavia: come già accennato si tratta di razze importate dalla Cina, dal Giappone ed una ottenuta dalla Sardegna da parte del prof. Jucci.

- 43) Albini
- 44) Sejaku green bozzolo giallo
- 45) Nemor
- 46) Noupei
- 47) Orgosolo
- 48) Dominante cioccolato bozzolo bianco
- 49) Polivoltina melanica

D) Razze ricevute dal Centro Genetico-Ecologico di S. Giacomo di Veglia (TV) (1979)

Come descritto precedentemente si ritrovano in questo gruppo le linee derivanti dalle razze importate dal Giappone a partire dagli anni '50, allo scopo di produrre poliibrido. In generale, la sigla BC significa bozzolo cinese (bozzolo bianco sferico od ellittico, larva priva di pigmentazione), la sigla BG significa bozzolo giapponese (bozzolo bianco cinturato, larve con pigmentazione tipica consistente nelle lunette "star spots" e mascherina "mask").

- 50) BC 2
- 51) BC17
- 52) BC 20/1
- 53) BC 20/II
- 54) BC 21
- 55) BC 22/I
- 56) BC 23
- 57) BC 24
- 58) BC 25
- 59) BC 26
- 60) BC 27
- 61) BC 28
- 62) BG I/II
- 63) BG I/III
- 64) BG 2
- 65) BG 5/I
- 66) BG 8/I

- 67) BG 20
- 68) BG 24
- 69) BG 28
- 70) BG 35
- 71) BG 36
- 72) BG 37
- 73) BG 38
- 74) BG 40
- 75) BG 41
- 76) KG
- 77) IG
- 78) UC
- 79) RC
- 80) NC
- 81) CC SG
- 82) YC
- 83) TC BB
- 84) TC BG
- 85) R 33
- 86) RC 33
- 87) RG 35
- 88) RG 36
- 89) R3G

E) Razze d'origine sconosciuta: si tratta di razze di cui non si conosce esattamente l'origine.

- 90) Dominante cioccolato bozzolo sferico (treetto)
- 91) Japkino verde
- 92) B uova rosse
- 93) B uova gialle
- 94) B ceppi, uova trasparenti
- 95) Han Han
- 96) Rosa
- 97) 199 LS
- 98) Arancio
- 99) R9 neri BP
- 100) Nistari uova trasparenti , larve verdi
- 101) Giallo B incerto
- 102) Treetto Rosa
- 103) BO
- 104) 628 scanalato
- 105) SA 48 larve bianche

F) Razze ottenute da selezione di primi incroci: tali razze sono state ottenute per selezione di incroci di razze perdute come tali (C60, SA1, Oro gigante) e nel caso della razza indiana, da un ibrido importato nel 1991 dall'Associazione Nazionale Bachicoltori dall'India.

- 106) Razza indiana 1991
- 107) Rosa x C60
- 108) S.A.1 x R9 Neri BP (larve bianche)
- 109) S.A.1 x R9 Neri BP (larve rigate)
- 110) Oro gigante x Oro 208

G) Razze importate dall'Associazione Nazionale Bachicoltori: sono razze importate dall'Associazione Nazionale bachicoltori dalla Turchia (Bursa) (1995) e dal Giappone (1997).

- 111) 10 turca
- 112) 15 turca
- 113) 28 turca
- 114) SC1
- 115) SC2
- 116) SC3
- 117) SG1

118) SG3

H) Razza albanese: donata dal Dott. A. Xhoxhi

119) Cinese II

I) Razze importate dopo il 2009: comprendono due razze bulgare, Bulgaria 1 e 2, una razza localmente conservata in Spagna, nella zona di Murcia, una razza giapponese, importata dall'Università di Fukuoka, per ragioni scientifiche, due razze cinesi, avute in scambio con il "Sericulture Research Institute" di Zhejiang, una razza spagnola, avuta in scambio da una banca genetica privata.

120) Bulgaria 1

121) Bulgaria 2

122) Baco Moro

123) P 50

124) Cinese 5007

125) Cinese 5012

126) Sierra Morena

F) Razze facenti parte della collezione di germoplasma dell'INRA: tali razze furono importate nel Dicembre 2009, alla chiusura dell'Unità Sericicola Internazionale di Lione.

127) 201 A

128) 301 A

129) 141/4

130) 141/5

131) AUZ 4

132) AUZ 5

133) B 40

134) B 41

135) B 50

136) BL1AO

137) BL1B

138) BL1C

139) BL1D

140) Brd

141) CH2A

142) CH3B

144) CH4

145) G 133

146) GB3

147) Giro SC1

148) HKS. A

149) HKS B

150) K 16

151) K 22

152) K 23

153) I 20 treotto

155) LY 4

156) LY 5

157) LY 22

158) M 83

159) Para

160) PK1

161) PK8

163) PK 10

164) PK 11

165) PK 12

166) PK 13

167) PK 14

168) PK 17

169) PVN

170) VAR 1

- 171) VAR 2
- 172) VAR 3
- 173) VM 1
- 174) VM 2
- 175) VM 2A
- 176) VM 3
- 177) VM 4
- 178) W2
- 179) ZB
- 180) ZJ
- 181) ADPR polivoltina
- 182) Nistari polivoltina

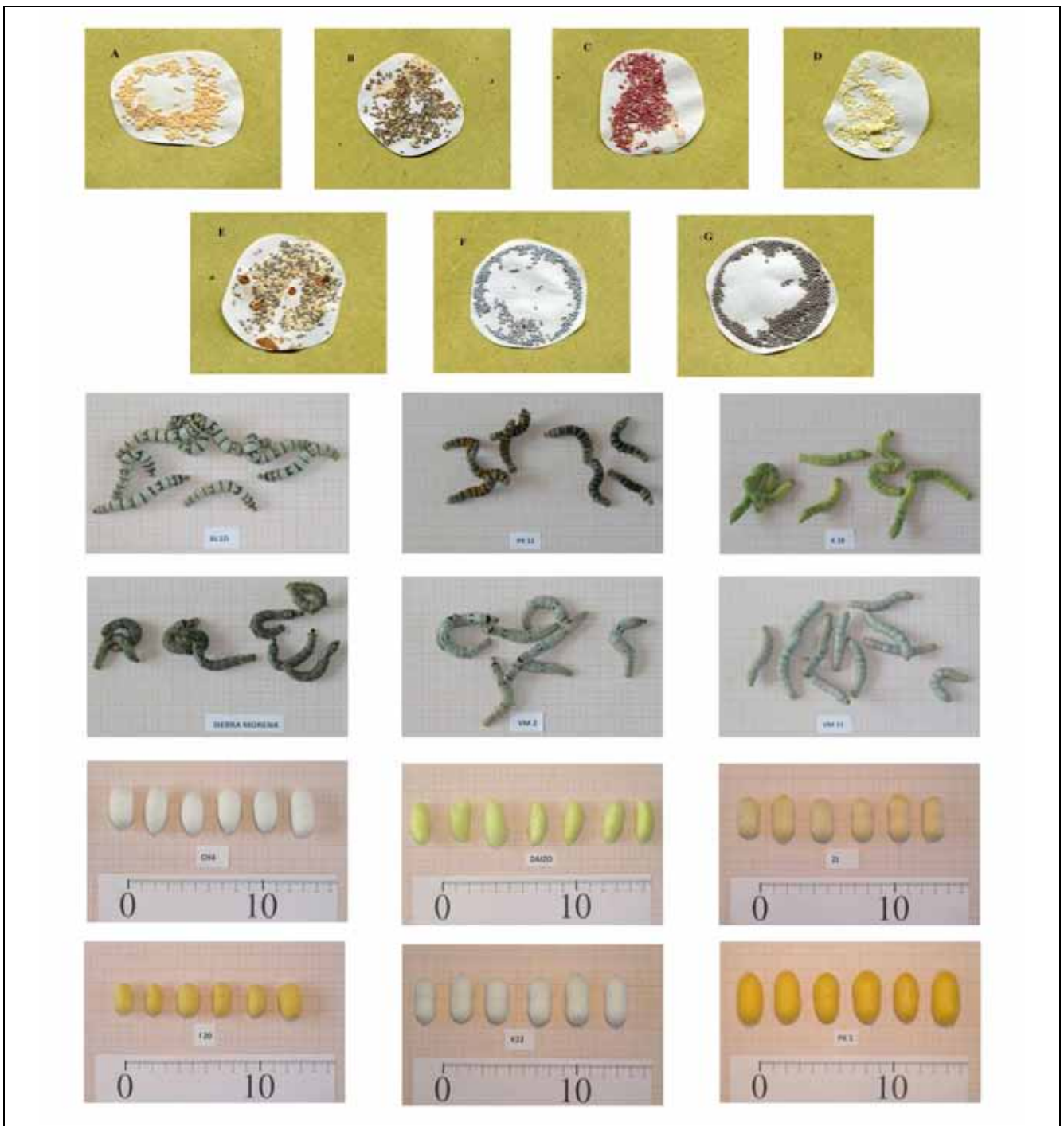


Foto 2 Diversi mutanti in larve, uova e bozzoli di *Bombyx mori*.

1.4 Perché conservare le risorse genetiche del baco da seta

Le banche di germoplasma di *B. mori* sono per lo più istituzioni pubbliche, che si trovano nei Paesi dove attualmente, o nel passato, la bachicoltura ha, o aveva assunto, un ruolo economico importante. La circolazione delle razze non è libera, e la restrizione è comprensibile in base al grande sforzo economico per il mantenimento e la selezione che le nazioni ospiti devono attuare per la conservazione del germoplasma. D'altro canto questo fenomeno rappresenta anche una limitazione per i Paesi che vogliono intraprendere l'attività bachicola. Nel passato la FAO ha tentato di incoraggiare la partnership tra Paesi possessori di germoplasma, dove la bachicoltura non è più praticata su larga scala, e paesi emergenti, soprattutto allo scopo di sviluppare un'attività economica che, se attuata con mezzi tradizionali, ha un forte impatto sulle zone rurali in termini di occupazione di manodopera, specialmente femminile. Tuttavia, gli sforzi non sono stati coronati da successo, a causa del monopolio quasi assoluto che la Cina ha mantenuto sulla produzione e commercio della seta per decenni. Un importante tentativo di classificazione del germoplasma mondiale di baco da seta è stato realizzato nel 2003 con la pubblicazione del documento "Conservation status of sericulture germplasm resources in the world. II. Conservation status of silkworm (*Bombyx mori*) genetic resources in the world" derivato dal Congresso tenutosi in Thailandia nel 2002, sulla "Promozione di uno Scambio Globale di Germoplasma", pubblicato in rete all'indirizzo: <http://www.fao.org/DOCREP/005/AD108E/ad108e00.htm>.

Alla compilazione di questo documento hanno partecipato Cina, India, Giappone, Corea, Bulgaria, Francia e Italia, depositarie delle maggiori collezioni mondiali. Il problema della conservazione del germoplasma di *B. mori* si pone poiché dal momento in cui è stato scoperto il fenomeno dell'eterosi nel baco da seta, viene utilizzato il poliibrido (in genere un incrocio a quattro vie) per la produzione di bozzolo da parte degli agricoltori. Alcune razze commerciali sono, perciò, conservate presso gli stabilimenti di produzione del seme-bachi, i quali, tuttavia, impiegano prevalentemente alcune linee parentali migliorate. La variabilità genetica del baco da seta è completamente affidata all'uomo, poiché, come già sottolineato, l'insetto non esiste allo stato selvatico in natura. A causa, quindi, della tendenza ad utilizzare poche razze produttive per la formazione dell'ibrido, si pone il problema della sparizione dall'allevamento "in situ" di molte varietà locali dotate di una significativa diversità ecologica e della conseguente perdita di geni specifici (erosione genetica). Un esempio di come ciò possa essere pericoloso è la crisi della pebrina che si è verificata in Europa durante il 19° secolo. Infatti, le razze europee erano tutte sensibili all'attacco del *N. bombycis*, agente eziologico della malattia, e ciò ebbe come risultato la rovina dell'industria serica europea, fino a che si giunse all'introduzione di nuove razze più robuste, oltre che ad una nuova metodica di produzione del seme-bachi. Perciò, il ruolo delle banche genetiche è centrale, per rifornire i produttori di uova di nuove risorse genetiche, qualora se ne presenti la necessità. Ad esempio, caratteri derivati da mutazioni che sono stati largamente impiegati nella produzione di ibridi commerciali sono stati: 1) la polifagia, limitatamente alle razze da allevare su dieta sostitutiva della foglia di gelso; 2) il carattere tre mute (treotti), anziché quattro, che nelle razze portatrici di tale mutazione si associa ad un'estrema finezza della bava serica, impiegata per specifici utilizzi; 3) la mancanza di colla delle ghiandole associate all'apparato ovopositore femminile (colleteriche), per la deposizione di uova naturalmente separate dal substrato (la caratteristica assume importanza per un più facile confezionamento delle uova in telaini da distribuire agli agricoltori); 4) la mancanza di scaglie sulle ali delle farfalle (*n/w*) che rende più confortevole l'attività degli addetti alla riproduzione degli adulti (le scaglie che ricoprono le ali delle farfalle provocano un fastidioso inquinamento dell'aria dell'ambiente di lavoro nell'impianto di produzione del seme, che può dare anche manifestazioni allergiche negli operatori e richiede l'utilizzo di sistemi di aspirazione e/o purificazione dell'aria); 5) le mutazioni legate al sesso (un diverso colore delle uova nei maschi e nelle femmine, o delle larve o dei bozzoli o delle farfalle) che facilitano la separazione degli individui per l'incrocio.

Oltre che per la sericoltura, il baco da seta è divenuto un modello per gli studi di genetica, di fisiologia, di microbiologia. Il fenomeno ha subito una recente accelerazione perché è stato pubblicato il genoma dell'insetto dall'International Silkworm Genome Consortium (2008) e ciò facilita l'utilizzo di *B. mori* per indagini e ricerche di vario genere. La possibilità di allevare il baco da seta in cicli ripetuti nel corso dell'anno con l'utilizzo della dieta sostitutiva della foglia di gelso in condizioni controllate (biofabbrica) e anche in condizioni di sterilità (Matsubara,

1997), la specializzazione dell'insetto nel produrre grandi quantità di proteine nelle ghiandole della seta, lo rendono molto attraente per la produzione di fibroina ad uso biomedicale, che solubilizzata e rigenerata in membrane o tessuti tridimensionali, può essere impiegata per molteplici obiettivi. Alcuni di quelli che hanno già trovato realizzazione sono gli "scaffolds" per la crescita cellulare, membrane per la riparazione di tessuti epiteliali danneggiati in seguito a ustioni o ferite o piaghe da decubito, membrane per la riparazione corneale, o per l'impianto stomatale, la creazione di protesi vascolari e tendini ad alta biocompatibilità, e così via. Inoltre, grazie all'utilizzo di piattaforme di espressione virale (baculovirus) è possibile introdurre geni esogeni all'interno del baco da seta e farli esprimere nell'emolinfa, tessuto adiposo e ghiandole della seta, per ottenere proteine ad utilizzo farmacologico (per ora sono in commercio proteine ad uso diagnostico e terapeutico in campo veterinario) (Kato *et al.*, 2010). La transgenesi per inserzione di geni esogeni, mediata da trasposoni, nelle linee germinali (Tamura *et al.*, 2000) è un'altra strategia su cui si sta lavorando da tempo per ottenere principi attivi ad uso biomedicale dal baco da seta. Attualmente, il campo di utilizzo degli insetti, in particolare di quelli facilmente allevabili come il baco da seta, si sta continuamente ampliando, estendendosi ai loro prodotti, ai microorganismi, a loro volta allevabili sugli insetti stessi e alle utilizzazioni delle loro cosiddette "proprietà", intese come "funzioni biologiche specifiche" (Takeda, 2013). Una particolari enfasi viene posta, in primo luogo, sullo studio dei meccanismi regolatori del metabolismo di alcune sostanze tipiche degli insetti (ad esempio: fibroina, chitina e peptidi antimicrobici), a livello chimico e molecolare, per sviluppare un sistema di produzione su larga scala, che sia finalizzato alla creazione di nuovi bio-materiali. Ma, secondariamente, l'analisi del sistema sensorio degli insetti, della percezione degli stimoli, di come essi processino le informazioni e della loro struttura di protezione (esoscheletro) e delle loro funzioni motorie (volo, salto, spostamento sulle diverse superfici) può essere utilizzato per sviluppare nuove tecnologie (biochips, biosensori, micromacchinari).

Infine, poiché gli insetti cominciano ad essere considerati un'importante risorsa alimentare, non solo per i Paesi dove tradizionalmente sono stati sempre consumati, ma anche per soddisfare l'imponente domanda di proteine di fonte animale da parte di una popolazione umana in crescita continua, la conservazione delle risorse genetiche di baco da seta assume una valenza fondamentale anche sotto questa prospettiva. Infatti, il baco da seta è impiegato da circa 3000 anni in Cina (Zimian *et al.*, 2005) come alimento nutraceutico tipico della medicina tradizionale e le crisalidi del baco da seta sono una fonte proteica considerevole, poiché contengono tra il 48 e il 60% di proteina grezza sul peso secco, mentre i lipidi sono formati dal 66.8% di acidi grassi insaturi, di cui l'acido α -linolenico rappresenta circa il 25.7% (Rao *et al.*, 1994). L'acido α -linolenico (che fa parte della categoria degli omega 3) è un acido grasso essenziale per l'organismo umano, perché non può essere sintetizzato.

E' chiaro, quindi, che gli utilizzi attuali e quelli futuri impongono una particolare attenzione alla conservazione dell'insetto e le banche di germoplasma di *B. mori* rappresentano, per quei pochi Paesi che le posseggono, una vera e propria risorsa da rispettare e valorizzare.

1.5 I problemi relativi alla conservazione delle banche di germoplasma di *B. mori*

Le uova del baco da seta, nelle razze monovoltine, hanno la massima capacità di schiusura a circa un anno dal momento della deposizione, a poco intervallo dalla quale entrano in diapausa. Per potere superare questa fase embrionale devono essere sottoposte ad un periodo a temperatura ambiente (estivazione), successivamente ad uno di discesa controllata della temperatura, che mima il passaggio naturale dalla stagione estiva a quella autunnale e, infine, ad uno di freddo (ibernazione). Sebbene si siano trovati espedienti per abbreviare la durata di ciascuno di questi periodi, ed anche per interrompere artificialmente la diapausa delle uova, rimane la limitazione temporale della durata della vitalità dalla deposizione alla schiusura, comportamento che impone di allevare tutte le razze in conservazione almeno una volta all'anno per le monovoltine, due volte l'anno per le bivoltine e in cicli continui per le polivoltine; infatti, tali razze non sopportano la conservazione col freddo a lungo e non entrano mai in diapausa.

Qualora l'allevamento riguardi un numero rilevante di razze, come nel caso della collezione di Padova, i problemi gestionali sono notevoli. Per prima cosa, la schiusura delle uova deve essere sincronizzata con l'emissione della foglia di gelso, unico alimento del baco da seta, che è un insetto strettamente monofago. Mentre la schiusura delle uova può essere controllata con l'utilizzo del freddo (bloccando lo sviluppo embrionale a 2,5°C), l'emissione di germogli da

parte del gelso dipende dalle condizioni ambientali esterne, per cui è necessaria un'accurata programmazione degli allevamenti ed anche una certa flessibilità nella fase d'incubazione delle uova, che si deve adattare all'andamento climatico.

L'utilizzo della dieta può sopperire ad una temporanea iniziale mancanza di foglia di gelso, ma è necessario ricordare che non tutte le razze si adattano agevolmente all'allevamento su substrato sostitutivo.

Un altro problema è dato dalla gestione degli spazi di allevamento. 1000 larve di baco da seta occupano circa 1 mq in V età, più i corridoi di servizio; perciò, se le razze sono molte, lo spazio impiegato può essere considerevole. D'altra parte, tale spazio viene utilizzato solo in un certo periodo dell'anno, e non può essere facilmente destinato ad usi alternativi in altre stagioni. Allo scopo di non lasciare sottoutilizzate vaste superfici, in genere si fraziona l'allevamento in più cicli concatenati; questo permette anche di utilizzare più efficacemente il personale addetto agli allevamenti, che in certi casi dovrebbe essere assunto solo stagionalmente. Tuttavia, una siffatta organizzazione rende complicata la ripetizione degli allevamenti di alcune razze, in caso si rendessero necessari per eventi accidentali (malattie, non conformità agli standard,...), perché l'agenda stagionale si fa molto fitta.

Anche la quantità di cibo consumata dalle razze è problematica (1000 larve arrivano a mangiare 20 kg di foglia di gelso) e impone la presenza di un gelseto in prossimità degli allevamenti, nonché di personale specializzato per la raccolta della foglia e della sua lavorazione (deve essere trinciata per l'alimentazione delle prime età larvali). In caso di condizioni meteorologiche avverse per periodi prolungati è necessario disporre di celle frigorifere per la conservazione della foglia, come pure si deve disporre di luoghi ombreggiati e freschi dove immagazzinare elevate quantità di rami di gelso, che debbono essere stoccati fra il momento della raccolta e quello della somministrazione.

L'igiene dell'allevamento è importante e il diffondersi di malattie ad andamento epidemico (batteriosi, virosi, malattie fungine) può essere frequente se il personale non è perfettamente addestrato, le disinfezioni degli ambienti e degli attrezzi non sono correttamente svolti, o le condizioni ambientali non sono mantenute nel "range" di variazione tollerato dal baco da seta.

Il personale deve lavorare, inoltre, in turni, poiché l'alimentazione viene compiuta ad intervalli regolari 3-4 volte al giorno, compresi i giorni festivi.

La conservazione di ciascuna razza deve essere pianificata anche considerando di mantenere una certa variabilità genetica nella popolazione, per non andare incontro a fenomeni di depressione da inincrocio, cui il baco è molto sensibile. Almeno 20 ovature devono essere poste in allevamento per ogni razza (a Padova il numero standard è 36) e, a mano a mano che le larve crescono d'età, parte delle larve vengono eliminate. Si può anche utilizzare solo parte di ciascuna delle ovature, in maniera da risparmiare il seme-bachi per altro impiego, ma non sempre la suddivisione in più porzioni delle deposizioni, considerato il numero elevato di razze risulta agevole, specialmente in considerazione della disinfezione delle uova. E' auspicabile arrivare, comunque, alla fine della V età con circa un migliaio di larve per razza, allo scopo di avere abbastanza bozzoli fra cui selezionare quelli dei riproduttori, che devono manifestare le caratteristiche morfologiche e i caratteri quantitativi propri della razza di appartenenza. Alla fine della selezione è indicato disporre di 200 riproduttori almeno, fra maschi e femmine, da cui ottenere il numero di ovature che dovrà essere conservato per la nascita dell'anno successivo, più un pari numero di ovature da stoccare, in caso di necessità di ripetere l'allevamento. Si deve considerare, inoltre, che in ogni fase dell'allevamento è indispensabile mantenere distinte le razze, per evitare mescolamenti di individui e ciò si ottiene con una stretta separazione spaziale. Conservare gli individui confinati è particolarmente difficile quando le larve sono mature e nel momento della filatura del bozzolo, poiché in questo periodo l'atteggiamento tipico è quello del "wandering" ovvero del vagabondaggio, in cerca di un appiglio ove posizionare i fili che sorreggono e ancorano l'involucro serico (Foto 3).



Foto 3 Metodica per separare le varie razze al momento della salita al bosco, per evitare mescolamenti di individui diversi.

Spesso, inoltre, l'allevamento è complicato da inquinamenti della foglia dovuti alla contaminazione delle piante di gelso da parte di pesticidi o erbicidi arrivati per deriva, in seguito a trattamenti delle zone limitrofe al gelseto. Il riconoscimento precoce dei sintomi d'avvelenamento (vomito e contorcimento) e l'individuazione delle zone del gelseto eventualmente contaminate, giocano un ruolo fondamentale nella corretta gestione dell'emergenza.

Si deve considerare che durante tutta la durata dell'allevamento è necessario svolgere un'accurata rilevazione morfologica e comportamentale sulle larve di ciascuna razza, controllare i parametri produttivi e merceologici e queste osservazioni devono essere svolte nell'arco di ristretti intervalli di tempo, superati i quali non c'è possibilità di ripetizione.

Come nota conclusiva, si deve sottolineare che si sta lavorando sulla crioconservazione di sperma ed ovari di baco da seta (Mochida *et al.*, 2007), sul successivo reimpianto degli ovari in una femmina recipiente, infine sulla fecondazione artificiale con lo sperma crioconservato. La tecnica è complessa e richiede un'abilità manuale piuttosto raffinata; inoltre, alcune razze non sono, comunque, adatte a questo tipo di mantenimento.

Oltre alle banche di germoplasma classiche, esistono anche banche di DNA di baco da seta, che facilitano la ricerca e l'indagine scientifica in assenza del concreto trasferimento delle razze.

1.6 I database

Le banche di germoplasma necessitano per la loro gestione dell'esistenza di database, cartacei ed informatici, che hanno un duplice scopo: 1) fornire al supervisore e ai tecnici e tutti gli operatori che lavorano nella banca di germoplasma una sequenza storica dell'origine e caratteristiche morfologiche e quantitative della razza, in maniera da poterla mantenere invariata nel tempo ed eventualmente prendere quelle decisioni che si rendono necessarie per preservare i geni essenziali che la caratterizzano; 2) fornire agli utenti (comunità scientifica, produttori seme-bachi, industrie biotecnologiche, operatori didattici, agricoltori...) una panoramica delle caratteristiche di ciascuna razza, per potere scegliere, in autonomia, o con l'aiuto di un esperto, il materiale biologico che risponde ad una specifica esigenza.

In particolare, un database ben studiato dovrebbe essere in grado di dare le seguenti prestazioni:

- fare una ricerca per ogni razza (nome) e caratteristica richiesta (es: colore delle uova). A sua volta dovrebbe essere possibile fare la ricerca delle caratteristiche sia per il fenotipo ("uova rosse") sia per il gene (*re*). Per il gene dovrebbe essere poi possibile rintracciarlo su una "mappa linkage", che dia il numero del cromosoma su cui il gene è localizzato e la posizione relativa;
- se dall'utente vengono più richieste (ad esempio: uova rosse e occhi rossi) cercare tutte le varietà che rispondono alla domanda;
- fare una ricerca per ogni carattere (ad esempio: quali sono i diversi colori dei bozzoli?);

- cercare il massimo e il minimo valore per ogni razza e carattere (ad esempio: qual è la razza che produce il massimo numero di uova e quale il minimo?);
- ricercare i caratteri economici in sequenza secondo le richieste dell'utilizzatore (ad esempio: quale accessione ha un peso medio del bozzolo fresco maggiore a 2 g e, nello stesso tempo, un peso medio della corteccia serica maggiore di 380 mg e una ricchezza in seta superiore al 19%? Se nessuna delle accessioni soddisfa la richiesta, quale vi si avvicina di più, impostando come prioritario il valore di 2 g come peso del bozzolo?).

Naturalmente questo tipo di database richiede un numero di osservazioni e di dati e una serie storica degli stessi che è difficile riscontrare presso qualsiasi Paese di quelli che possiedono una banca genetica. Quello che vi si avvicina maggiormente, al momento, è il database del baco da seta gestito dall'Università di Kyushu (prof. Yutaka Banno), Giappone, nell'ambito del progetto nazionale delle bio-risorse, iniziato nel 2002 e finanziato dal Ministero dell'Educazione, Cultura, Sport, Scienza e Tecnologia. Nella Figura 1 ne viene mostrata la prima pagina per evidenziarne il funzionamento.

È da sottolineare che la banca di germoplasma giapponese, pur avvalendosi di finanziamenti pubblici, è aperta a soddisfare le necessità sia della comunità scientifica, sia del mondo industriale, sia dei privati; tuttavia, il costo imputato per avere accesso al materiale genetico, differisce a seconda di chi lo richiede; inoltre, la banca fornisce un modulo da firmare, assieme

all'invio delle uova o larve, per tutelare, comunque, i diritti di proprietà e di privativa. Le risorse genetiche, in questo modo, possono essere valorizzate, ma rimangono un bene pubblico e, in caso di sfruttamento commerciale delle razze, alla collettività viene reso parte del denaro investito nel mantenimento della banca stessa. Inoltre, mentre la banca di germoplasma è aperta per quanto riguarda il conferimento dei mutanti, che hanno per lo più interesse scientifico, l'iter è diverso per quanto riguarda le razze da cui può essere prodotto seme-bachi commerciale.

INTRODUCTION

Important Notice

Starting from 1st April 2010, we are going to charge handling and shipping fees for any resource request. This change is to be defended based on the policy of self-sustainability of distribution service of the resources. (MTA) We are also starting WEB service for your resource request. Thank you for your cooperation.

Pricing of Silkworm (2011/10/11 updated)

Operation of WebOrder

WEB order can be done by "Strain list" of a left menu.

About NBRP "Silkworm"

During the long history of sericulture, the domesticated silkworm has various differentiated into a number of races and strains as can be seen today. Up to 50% of the mutant strains of silkworm in the world are collected and systematically preserved in Japan. They are not only important genetic resources for the research work in Japan but also precious inheritance of human beings.

Silkworms are widely used by researchers to study on genetics, physiology, biochemistry, and pathology. Recently, along with the progress of the "silkworm genome project", analysis of genes with special functions ranging from feeding habits and taste, to the resistance and sensitivity to pathogens such as viruses, fungi, and bacteria, and to mold is conducted intensively. These results make silkworm, a Lepidoptera insect, a premier model for studies of pest control and will facilitate the production of new pesticides. Likewise, their relatively large size makes silkworm a good model for the study of brain. With transgenic technologies such as transposon tagging, it is easy to generate mutants related to action pattern, ecology, morphology, and physiology. Comparing mutants with the normal silkworm, we can elucidate the fascinating system of brain, specifically in brain building, and some of these molecules involving mutants may be of value.

This project aims to improve the quality of silkworm resources with more detail trait information and establish a system so that we can supply more reproductive and more stable materials.

The 2011 Silkworm Rearing Schedule

Phase	Beginning of rearing	Larval stage	Pupal stage
1	May 6	May 6 - May 26	May 26 - Jun 5
2	Jun 24	Jun 24 - Jul 14	Jul 14 - Jul 24
3	Aug 19	Aug 19 - Sep 8	Sep 8 - Sep 18
4	Oct 7	Oct 7 - Oct 27	Oct 27 - Nov 6
5	Nov 25	Nov 25 - Dec 15	Dec 15 - Dec 25

Related sites

- Silkworm Genetic Resource Database (Japanese ver.)
- Silkworm EST
- Silkworm cDNA
- WGR Silkworm
- Insect Proteome Database, Silkworm

NBRP National BioResource Project

Figura 1 Esempio di database informatico utilizzato in Giappone nell'ambito del progetto nazionale delle bio-risorse.

1.6.1 La situazione del database in Italia

Il problema della conservazione della banca di germoplasma di baco da seta presso CRA-API, sede di Padova, che si unisce a quello della conservazione della collezione di gelso, affidata alla stessa struttura, è stato preso in attenta considerazione solo in anni recenti, con il finanziamento da parte del MiPAAF di alcuni progetti (Collezioni, Serico e Serico integrazione, Biodati) che avevano ed hanno, come scopo principale, il mantenimento delle collezioni stesse. Purtroppo gli importi devoluti a questo fine, considerato che lo staff della banca di germoplasma è formato da personale precario, sebbene dotato di lunga esperienza lavorativa, sono stati appena sufficienti al mantenimento delle collezioni, ma non sono stati abbastanza cospicui da permetterne l'adeguata valorizzazione. La questione della creazione di un database è una delle priorità che è necessario affrontare. Al momento esiste un registro delle diverse accessioni, sia per le razze appartenenti alla collezione di germoplasma italiana, sia a quella francese. Il registro è cartaceo e su di esso si compiono le annotazioni durante gli allevamenti. Negli ultimi anni, grazie ai progetti summenzionati, è stato possibile raccogliere una documentazione digitale (foto di bozzoli e larve) che sono una prima fonte di materiale per l'elaborazione di un database. Inoltre, si è cercato di raccogliere in maniera organica dati quantitativi sulla produzione di seta e si è a buon punto con l'organizzazione e l'analisi degli stessi. Molto lavoro è ancora necessario per raggiungere un risultato ottimale e, questo è, a sua volta, dipendente dal finanziamento delle attività future della banca e dalla possibilità di assumere personale dedicato.

Nel capitolo successivo viene mostrata una tipica scheda del registro cartaceo oggi in uso. Ricordiamo che nel caso del baco da seta sono definiti primari i caratteri morfologici (ad esempio: colore del bozzolo), secondari sono quelli che incidono sull'allevamento (ad esempio: percentuale di schiusura delle uova), terziari sono i caratteri commerciali (ad esempio: peso del bozzolo).

1.6.2. Un esempio di record del database di Padova

1 - Razza TG 10

Storia:

Originaria della Francia. Importata nel 1940 con il nome di "Varo", derivato dalla regione in cui veniva prevalentemente allevata. Selezionata per la ricchezza in seta, presentava variazioni frequenti per la percentuale di individui a bava lunga e corta. La bava serica nel 1960 misurava 2.9 micron di diametro. Le larve si presentavano di 2 tipi a tegumento bianco: con maschera (36%), senza maschera (64%).

Caratteri morfologici

- Larva:

Alla schiusura marron scuro, (prima della perdita delle setole).

- I	età:	Torace grigio chiaro, addome marroncino.
- II	età:	Torace grigio-chiaro, addome marroncino-grigio.
- III	età:	Torace grigio-chiaro, addome grigio-marroncino.
- IV	età:	Larve grigio-marroncine, con lunette poco accentuate, ma escrescenti.
- V	età:	Larva bianca-giallastra, non mascherata, con lunette poco accennate. Pseudozampe gialle. Monovoltina. Molto soggetta a poliedria nucleare (giallume).

- Bozzolo:

Giallo pallido all'esterno, giallo intenso all'interno, colorazione omogenea, più o meno cinturato, poco consistente, grana fine.

- Farfalla:

Di grandi dimensioni, beige, con occhi neri, venature alari tendenti al marrone, marcate soprattutto nel maschio.

- Uova:

Color grigio. 1.400-1.500 uova/g (1960).

Caratteri Quantitativi

Lunghezza bava dipanabile	910 (1960); 380 (autunno 1991)
Titolo (denari)	2,3 (1960); 1,44 (autunno 1991)
N.º bozzoli/Kg.:	450 (1960); 1013 (1991)
N.º bozzoli/litro:	
Peso del bozzolo (g):	0,967 (Giugno 1999); maschio (primavera 2005): 1,23 + 0,08
Peso della corteccia serica (g):	0,115 (Giugno 1999); maschio (primavera 2005): 1,67+ 0,02
Ricchezza seta (%):	9,5 (aut.1991); maschio (primavera 2005): 14% + 1
Dimensione bozzolo:	2004: Ø maggiore: 3,04 + 0,17; Ø minore: 1,34 + 0,08
Lunghezza ciclo vitale (giorni) (circa 25°C):	Nascita-emergenza bozzolo: 30gg ; chiusura-sfarfallamento: 16

1.7 Le origini di *Morus* spp., l'introduzione in Europa e la storia della collezione di Padova

Come per l'introduzione del baco da seta in Europa, anche per l'origine del gelso abbiamo scarse notizie. Per una diffusa trattazione dell'argomento si rimanda all'interessantissimo testo di Bettelli Bergamaschi (1989), citato nella bibliografia della sezione precedente, di cui si riassumono qui alcune linee fondamentali. Innanzitutto è opinione abbastanza diffusa, anche se manca di solidi fondamenti storici, che il gelso, probabilmente originario della Persia (Iran), presente in Europa dall'antichità al basso Medioevo, fosse il gelso nero (*Morus nigra*), conosciuto per i frutti dolci e le proprietà medicamentose (Ovidio I sec. a.C., Plinio I sec. d.C., Palladio, IV-V sec. d.C.). Di presenza di gelso (senza specificare se bianco o nero) si parla ancora in Spagna nel VII sec. d.C., in Germania occidentale tra l'VIII e il IX sec. d. C., in Italia tra il IX e il X sec. d.C.

Per quanto riguarda l'origine di *Morus alba* (gelso bianco) gli studiosi non sono concordi sull'epoca in cui ne sarebbe avvenuta l'importazione dall'Oriente. Alcuni legano l'introduzione del gelso bianco in Italia alla nascita dell'attività sericola, ma è possibile che, almeno inizialmente, la bachicoltura fosse praticata anche con le foglie del gelso nero. Come ricorda Bettelli Bergamaschi (*ibidem*) il primo documento sicuro riguardo all'introduzione di *M. alba* in Italia viene da Pescia (1434), dove Francesco Bonvicino "primum exoticam mori plantam in suam patriam advexit" (tornando dall'Oriente). Anche se presente da prima dell'introduzione della bachicoltura, comunque, il vero e proprio inizio della coltivazione del gelso bianco in Europa è legato all'espandersi dell'attività sericola e generalizzato all'Italia, e ad altri Paesi dell'Europa mediterranea (soprattutto Grecia, Spagna, Francia). A dispetto della sua stretta relazione con il baco da seta il gelso non ha mai riscosso molto interesse scientifico in Italia, tanto da far scrivere: "... è deprecabile che su una pianta che ha per così lungo e lungo tempo determinato il paesaggio agricolo italiano non ci sia ancora nessuno studio sistematico che ne segua l'evoluzione nel tempo" (Zanier, 1998). Per quanto riguarda la collezione di gelsi presenti a Padova, anche qui siamo debitori alla direttrice di Ascoli Piceno, Porzia Lorenza Lombardi, sia per avere portato a Padova le cultivar (cv) che erano in possesso della collezione di quell'Istituto, sia per avercene data una descrizione (Lombardi, 1964). Dopo il 1964 la collezione è rimasta sostanzialmente stabile per quanto riguarda le accessioni di gelso: le uniche variazioni si sono avute per importazione della cv Ichinose, la mutazione di una pianta di Kokusou, che ha dato origine alla cv Kokusou rosso, e alla donazione da parte di un italiano espatriato in Brasile (Pino Briani) di due cv brasiliane (Miura e Korin) nel 2000. Nel 2009, alla chiusura dell'Unità Sericicola Internazionale di Lione, oltre alla collezione di *B. mori* sono state trasferite anche le talee di un gruppo di quattordici varietà di gelso (gennaio 2010) che sono state fatte radicare e piantate in campo (essendo ora al 2° anno di vita). Si spera di riuscire ad ottenere anche le restanti varietà che facevano parte della collezione e che sono ancora

conservate a Lione. Inoltre, il prof. Dan Dezmirean, dell'Università di Cluji Napoca ha donato a Silvia Cappelozza, le talee di una varietà conservata in Romania (Ukraina 9) nel 2010.

1.7.1 Le risorse genetiche di *Morus* spp.

Il gelso, pianta a rapida crescita, deciduo, che vegeta ugualmente bene in climi temperati, subtropicali e tropicali, appartiene al genere *Morus*, tuttavia a causa di una grande variabilità dei caratteri, le definizioni di specie e di varietà all'interno di una data specie sono sfumate e spesso si sovrappongono a seconda dell'autore che stabilisce la suddivisione sistematica. Perciò, una revisione tassonomica del genere sarebbe urgente e da intraprendere a livello globale. Molti dei genotipi attuali sono "naturalizzati" (Sharma *et al.*, 2000) perché sono stati stabiliti, adattati e si sono diffusi in aree diverse da quelle originarie, rendendone complicata la caratterizzazione. Sebbene il gelso includa prevalentemente cultivar diploidi $2n=28$, sono coltivati anche poliploidi naturali e altri sono stati indotti artificialmente (Machii *et al.*, 2000). Le diverse specie di gelso sono state soggette ad un'intensa opera di selezione, a partire dalle popolazioni naturali ad impollinazione aperta, o da singoli individui, prodotti con ibridazione controllata e soggetti a mutagenesi, con il risultato di ottenere più di un migliaio di varietà, includendo quelle triploidi, tetraploidi e anche esaploidi (Sanchez, 2000). I metodi finora impiegati hanno utilizzato analisi sistematiche convenzionali, ad esempio differenze nella forma della pianta, morfologia della foglia, lunghezza degli stili nei fiori femminili, forma degli idioblasti, colore del frutto ed altri caratteri agronomici (Katsumata, 1972). Koidzumi (1917) ha raggruppato le specie di gelso in *Dolichostylae* e *Macromorus*, basandosi sulla lunghezza degli stili nei fiori femminili dividendo ciascuna di queste due sezioni sulla base della morfologia fogliare (Rangaswamy *et al.*, 1976). Hotta, invece, ha separato le specie di gelso in due gruppi, ovvero le *Dolychocystolithiae* e *Brachycystolithiae* (1954), secondo la posizione e la forma dei cistoliti nella foglia, e tale classificazione è quella attualmente adottata in Giappone (Sharma *et al.*, 2000). Mentre nel passato sono stati fatti tentativi per esaminare la variabilità in *Morus* utilizzando markers citologici (Katsumata, 1979) e isozimi (Hirano, 1982), da qualche tempo si sono introdotte anche analisi basate sui markers molecolari. L'assunto di base di questa tecnica è che i markers molecolari individuano i polimorfismi testando una parte delle variazioni totali di sequenze di DNA nel genoma e sono indipendenti dalle influenze ambientali. Fra i vari markers si possono annoverare i RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), gli ISSR (Inter-Simple sequence Repeat Polimorphism), gli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), gli SSR (Simple Sequence Repeat), gli SCAR (Sequence-Characterized Amplified Regions), e gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). In particolare, gli ISSR e i RAPD sono stati fra i markers più utilizzati nel gelso (Ipek *et al.*, 2011, Kar *et al.*, 2008; Vijayan e Chatterjee, 2003; Vijayan *et al.*, 2004 a,b; Vijayan *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007 a,b). Tuttavia, gli AFLP sembrano i migliori markers molecolari perché individuano simultaneamente molti loci polimorfici, solitamente distribuiti casualmente nel genoma, e, in comparazione ad altri markers co-dominanti, con alleli multipli per ogni *locus*, (ad esempio, SSR), questo sistema di markers consente una stima più precisa delle frequenze alleliche del marker ad un singolo locus ed una più rapida stima del polimorfismo a molti *loci* (Botton *et al.*, 2005). Per questo motivo è stato adottato da Sharma *et al.* (2000), per l'analisi del germoplasma di gelso conservato in Giappone e da Botton *et al.* (2005) per l'analisi del germoplasma di gelso italiano. Mentre nel caso del germoplasma giapponese si è osservata una buona corrispondenza fra il raggruppamento in cluster suggerito dall'analisi genetica e quello in specie diverse suggerito dall'analisi morfologica (Sharma *et al.*, 2000), nel caso della collezione italiana si è notata una più sfumata divisione interspecifica e una più alta variabilità intraspecifica. Inoltre, sono state evidenziati probabili sovrapposizioni di accessioni classificate sotto nomi diversi. Questo non è sorprendente se pensiamo che molti genotipi di *Morus*, introdotti in Italia da qualche secolo, possono avere variato il loro fenotipo sotto la pressione selettiva dell'ambiente e dell'uomo, con la conseguenza di essere identificati come varietà distinte, con nomi diversi dagli originali. Inoltre, la nomenclatura locale e un non sempre corretto mantenimento dei registri varietali, possono avere comportato un'erronea o confusa catalogazione delle cv. La metodica AFLP, sembra essere affidabile per l'individuazione di possibili differenze o, al contrario, sovrapposizioni non individuabili morfologicamente. In Figura 2 viene riportato un dendrogramma descrittivo delle accessioni di Padova basato sui dati AFLP e che utilizza la matrice di distanza genetica di Dice (Botton *et al.*, 2005).

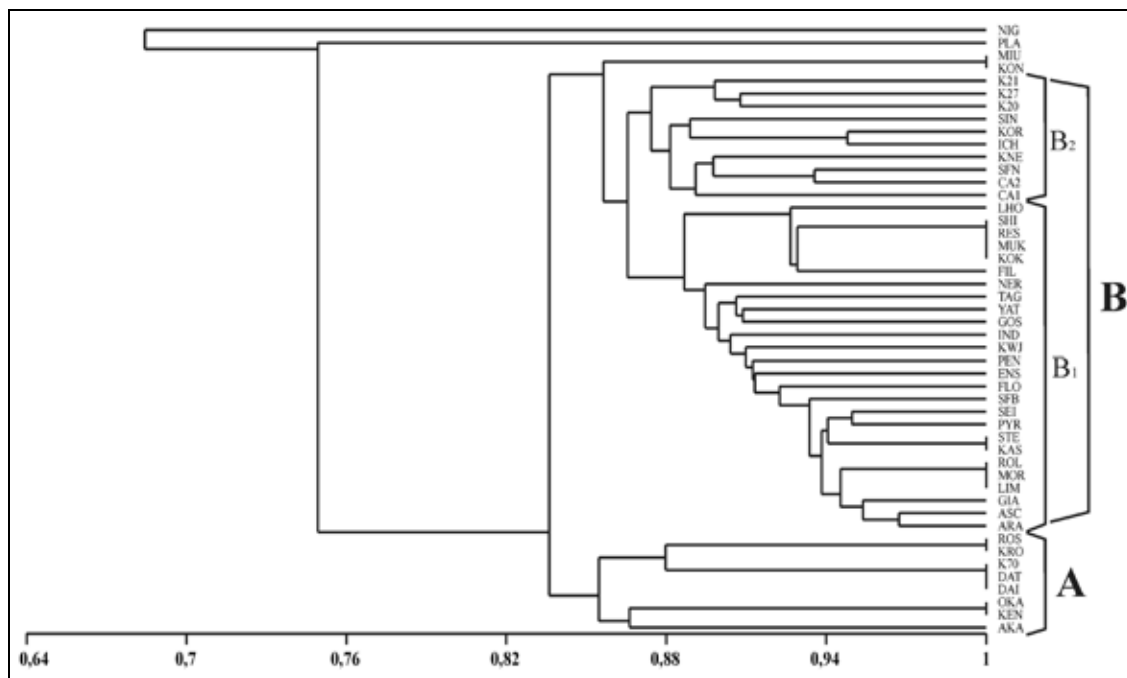


Figura 2 Dendrogramma che descrive la distanza genetica delle cultivar conservate a Padova.

1.7.2 La collezione di Padova

Seguendo la stessa metodica adottata nel caso del baco da seta, si segue l'originaria suddivisione impartita da Lombardi, per le cv esistenti in collezione anteriormente al 1958 (trasferimento a Padova della collezione di Ascoli). Le cv sono elencate qui di seguito, rispettando la primitiva divisione in gruppi, cui, poi, si sono aggiunte le accessioni progressivamente importate. La descrizione dei gruppi è ripresa anch'essa da Lombardi (1964).

A) Gruppo 1: cultivar acquistate in Italia presso vari vivaisti da privati o altri Istituti.

- 1) Arancina
- 2) Morettiana
- 3) Limoncina
- 4) Rosa di Lombardia
- 5) Filippine
- 6) Spagna a frutto bianco
- 7) Cattaneo femmina
- 8) Cattaneo maschio
- 9) Restelli
- 10) Sterile
- 11) Muki
- 12) Giazzola
- 13) Lhou
- 14) Spagna a frutto nero
- 15) Florio
- 16) Pyramidalis
- 17) Sinuense
- 18) Pendula
- 19) Nervosa a foglia stretta e a foglia larga
- 20) Platanoide

21) Ascolana

B) Gruppo 2: cultivar proveniente da seme e allevate a ceppaie basse o a cespuglio.

22) Indiana

23) Selvatica a lamina lobata

24) Selvatica a lamina intera

C) Gruppo 3: cultivar cinesi e giapponesi importate nel 1934. Le piante erano arrivate in pessime condizioni in Italia, per la lunga permanenza nel porto di scalo dopo un lunghissimo viaggio. Erano originariamente 23 cultivar, con etichette rovinare e alcune senza etichette. Le caratteristiche della foglia delle piante sopravvissute sono cambiate parecchio rispetto a quelle delle piante originarie in seguito al loro acclimatemento in Italia. I nomi scritti da Lombardi sono stati corretti secondo l'attuale nomenclatura riportata da Machii *et al.* (1999).

C-1) Cultivar giapponesi

25) Kayrio rosou

26) Yamanaka-Takasuke

27) Kokka

28) Kenmochi

29) Rosou

30) Goshorami

31) Okaraguwa

C-2) Cultivar cinesi

32) Akagi

33) Shimanouchi

34) Seijuurou

35) Kasuga

36) Kayriou nezumigaeshi

37) Tougounishiki

38) Kayriou wase juumonji

39) Dateakagi

40) Daikokusou

41) Kokusou 70

42) Enshutakasuke

43) Tagowase

D) Gruppo 4: Cultivar giapponesi di cui la Stazione di Ascoli è venuta in possesso nel 1955-56 e mutazione di una pianta del gruppo per il colore del germoglio da cui si è ricavata una varietà a sé stante.

44) Kokusou 20

45) Kokusou 21

46) Kokusou 27

47) Kokusou rosso

E) Gruppo 5: cv importate successivamente dal Giappone (Ichinose) e dal Brasile (Miura e Korin)

48) Ichinose

49) Miura

50) Korin

F) Gruppo 6: varietà importate nel 2010; si tratta di talee ricevute dall'Unità sericicola internazionale di Lione e fatte radicare a Padova, oltre ad alcuni astoni radicati ottenuti dalla Romania (Ukraina 9).

51) Cabassette

52) Rougetto

53) Badena Tout

54) Herati

55) Grisetto

56) Planifolia

57) Chirtout

58) Hicks Fancy

59) Queensland black

60) Georgeous

61) Kokusou 25

- 62) Aoba nezumi
- 63) Egyptienne indéterminée
- 64) Nagasaki
- 65) Ukraina 9

G) *Morus nigra*: sebbene non siano classificate cultivar di questa specie, alcune piante sono conservate presso la collezione.

- 66) *Morus nigra*

1.7.3 Perché conservare le risorse genetiche del gelso

Come precedentemente spiegato il gelso era diffuso nell'antichità per le proprietà medicinali dei suoi frutti e per la loro appetibilità. La coltivazione della pianta in relazione alla bachicoltura è stata importante e le specie e cv del genere *Morus* rimangono le uniche con la foglia delle quali è possibile allevare il baco da seta, *B. mori*. Il gelso è stato selezionato per lunghissimo tempo per la quantità e qualità (in particolare il contenuto proteico) di foglia prodotta. Tuttavia la conservazione delle risorse di germoplasma di *Morus* non deve essere legata unicamente a questo aspetto del suo impiego, perché ciò risulterebbe riduttivo rispetto alle enormi potenzialità dell'essenza arborea. Ad esempio è sorprendente che una pianta che è stata soggetta a miglioramento delle proprie qualità nutrizionali per fungere da alimento di un insetto così esigente come il baco da seta, sia stato così poco preso in considerazione per la produzione zootecnica. Il contenuto di proteina del gelso varia dal 15 al 28% cioè può essere paragonato al tenore di proteina grezza di una leguminosa foraggera. La frazione fibrosa delle foglie di gelso è bassa in comparazione ad altri tipi di foglie, e il contenuto minerale molto alto. La digeribilità della foglia è buona, come pure la palatabilità; ne è stato proposto l'utilizzo per i ruminanti, ma anche per i monogastrici, e ci sono ormai vari studi sull'argomento, alcuni anche in Italia (Autori vari, 2002; Talamucci e Pardini, 1993; Micheletto, 2005).

Il frutto del gelso è un sorosio, che si sviluppa da un'infiorescenza e che in natura si presenta, in funzione della specie e dello stadio di maturazione, in diverse sfumature di colore dal bianco al porpora. Una pianta adulta, in piena produzione può dare luogo anche 200 kg di more/anno (Bellini *et al.*, 2000). La frutta viene prodotta soprattutto su rami di due anni, quindi la potatura per l'alimentazione del baco da seta non è compatibile con l'ottenimento di grandi quantità di more. La maturazione della frutta è scalare e la raccolta è perciò complicata. Il consumo delle more viene fatto soprattutto fresco, perché sono facilmente deperibili. Il gusto più apprezzato è quello del sorosio di *M. nigra*, che ha sapore dolce e meno acidulo di quello di *M. alba*. Specialmente negli Stati Uniti sono state selezionate alcune varietà di gelso da frutto: a *M. nigra* appartengono le varietà Wellington, Chirtout, Black English; a *M. multicaulis* le varietà California Giant, Georgeous, Large Black, Queensland Black; a *M. rubra* le varietà: Townsend, Illinois Everbearing, Far Bibay, Hicks Fancy, Scott Jumbo; tuttavia anche fra le varietà di *M. alba*, ve ne sono di apprezzate per la frutta: var. pendula Dippel (frutti neri), Tut Badena (frutti bianchi), var. aureifolia Tsen (frutti bianchi), Gamette Hative (frutti neri), var. italica Spach (frutti neri) (Bellini *et al.*, 2000). La mora di gelso è un frutto ricco in composti biologicamente attivi di natura fenolica, in particolare acidi fenolici, flavonoli e antocianine, queste ultime responsabili del caratteristico colore del frutto pigmentato (da rosso a porpora). Il contenuto di antocianine del frutto maturo è di circa lo 0.2%, comparabile con il contenuto di molte cultivar di mirtillo (*Vaccinium corymbosum*) (Brambilla *et al.*, 2008). Le more nere (*M. nigra*) sono tradizionalmente impiegate a scopo alimentare, ma anche le more pigmentate di *M. alba*, hanno una colorazione molto intensa e i pigmenti in esse contenuti possono essere proficuamente utilizzati anche come coloranti naturali (Bellini *et al.*, 2000). Le more sono un cibo ipocalorico (43 calorie per 100 g di prodotto fresco), ma fonte di molti interessanti principi attivi. Studi sulle antocianine hanno suggerito un'azione antiossidante, come carattere di maggiore rilievo, ma anche di protezione cardiovascolare, potenziamento immunitario, attività antivirale, riduzione dello stress e altri potenziali benefici per la salute. Inoltre, in *M. nigra* il contenuto fenolico è compreso tra 1943 e 2237 mg equivalenti di ac. gallico/100g di massa fresca. Il contenuto di vitamina C è compreso tra 14.9 e 18.7 mg/100 ml di succo. Il contenuto maggiore in acidi grassi è in acido linoleico (53.57-64.41%) e palmitico (11.36-16.41%). Il contenuto in acidi organici è di circa 123-218 mg/g di acido malico, seguito da acido citrico (21-41 mg/g) (Ercisli e Orhan, 2007). Le more sono anche un'eccellente fonte di ferro (1.85 mg/100 g di frutta), potassio, manganese e magnesio.

A parte il frutto, tutta la pianta del gelso ha proprietà medicinali: dalle radici sono stati isolati la morusina, la morusina glucoside e il kuwanone. La corteccia della radice di *M. nigra* contiene la deoxyjirimycina e la foglia la N-methyl-alfa-deoxynoyjirimicina che avrebbero attività contro l'AIDS (Ramesh *et al.*, 2003). Dalla foglia di gelso viene attualmente preparato anche un thè, commercializzato in Giappone. La bevanda, con azione nutraceutica, contiene un ampio assortimento di amine biogeniche: dopamina, tyramina, ... (*ibidem*).

Il gelso può essere utilizzato anche per la produzione di fibra. Nel passato in Italia era iniziata la produzione di una fibra vegetale, a partire dai residui della potatura del gelso, che veniva chiamata "gelsolino". Con il declino della bachicoltura, anche l'impianto industriale per la lavorazione del gelsolino fu chiuso. Tuttavia, la produzione di materiali compositi di origine vegetale è tornata di grande attualità, per la necessità di contenere l'utilizzo di plastiche derivanti da petrolio, non facilmente smaltibili e non biodegradabili, e per la progressiva riduzione della disponibilità di quest'idrocarburo. Il gelso è molto promettente da questo punto di vista per la notevole produzione di biomassa ed il rapido accrescimento. Rispetto alle bioplastiche derivate da colture di cereali (mais), il gelso potrebbe occupare zone non competitive con le colture alimentari, essendo pianta rustica e poco esigente per le caratteristiche dei suoli.

Inoltre, come ulteriore applicazione, il gelso, proprio per l'elevatissima capacità di rigenerazione, prossima a quella del bambù, viene raccomandato per la riforestazione di terreni marginali o minacciati dall'erosione. La biomassa può essere considerata una fonte rinnovabile di energia e può essere convertita sia direttamente in energia, sia in composti energetici, tramite combustione diretta, sistemi di digestione anaerobica, distillazione distruttiva, gassificazione, idrolisi chimica e idrolisi biochimica (Ramesh *et al.*, 2003).

1.7.4 I problemi relativi alla conservazione delle banche di germoplasma di *Morus*

La conservazione dei semi o del polline sono fra le metodologie più comuni di mantenimento delle risorse genetiche arboree, perché richiedono minimi impieghi di manodopera, spazio e mezzi. Tuttavia ci sono molte piante, quali il gelso, che non possono essere conservate come semi o polline, per molte ragioni, tra cui l'alto livello di eterozigosi, la rapida perdita di vitalità dei semi, la fecondazione intervartietale e interspecifica, l'impollinazione anemofila; per questo motivo tali essenze arboree devono essere mantenute sotto forma di materiale in vegetazione (intere piante) "in-situ" e/o "ex-situ" (Vijayan *et al.*, 2011) e la riproduzione avviene per taleggio (Cappelozza *et al.*, 1990; Meneghini *et al.*, 1986 a,b) o innesto di gemme dormienti. La conservazione "in situ" è quella che si attua facendo permanere le risorse genetiche nel loro habitat naturale ed è quella migliore per salvaguardare la diversità genetica di una specie vegetale, in quanto offre il vantaggio che le popolazioni di piante sono aperte al libero scambio di materiale genetico attraverso l'incrocio e riproduzione casuali. Le mutazioni selettivamente vantaggiose vengono accumulate e diffuse nelle popolazioni e mantengono le specie in una dinamica di evoluzione, che è particolarmente benefica per le risorse genetiche minacciate di estinzione, o per i progenitori selvatici delle specie coltivate. In generale, questo tipo di conservazione viene perseguita senza che ci sia un dettagliato elenco della flora protetta ed è tipica dei parchi nazionali, foreste, riserve ed oasi naturali, dove vengono protette quelle piante che generalmente si adattano solo ad una particolare nicchia ecologica e ad un habitat selvatico. Per quanto riguarda il gelso abbiamo notizie della sua conservazione in ambienti naturali protetti in alcune aree dell'India (Naik e Mukherjee, 1997) e in Canada (relativamente al gelso rosso) (Tikader *et al.*, 2000). In Italia, dove il gelso è pianta diffusa capillarmente nel territorio, molti esemplari sono presenti in parchi e in alcune zone collinari protette (ad esempio: Parco dei Colli Euganei), e seppure non specificatamente protetti si trovano anche nella campagna. Situazioni analoghe sono riscontrabili in altre parti dell'Europa (ad esempio: Grecia, Francia, Spagna, Bulgaria, Romania) e in tutta la Turchia.

La conservazione "ex-situ" viene effettuata presso giardini botanici, istituti di ricerca, stazioni sperimentali, vivai e giardini domestici ed anche banche di semi. La conservazione anche negli orti, lungo le strade di campagna, nei filari che delimitano i poderi, sul bordo dei fossi o dei canali si concretizza nel mantenimento di esemplari derivati da prime selezioni molto antiche da parte degli abitanti locali, che poi sono state di nuovo esposte sia agli incroci aperti, sia ai fattori ambientali di stress. Perciò, anche queste tipologie di piante possono essere fonti di alleli utili, specialmente per quanto riguarda la resistenza alle avversità naturali. In generale, nelle collezioni di gelso conservate presso le banche di germoplasma si è posta grande

attenzione al mantenimento delle varietà da utilizzare per la coltivazione e dei progenitori selvatici, ma alcune specie selvatiche, la cui foglia è poco adatta all'allevamento del baco da seta come *M. laevigata* e *M. serrata*, sono state molto trascurate (Tikader e Dandin, 2005), anche se importanti per la forestazione e l'utilizzo del legno.

Fra le tipologie di conservazione "ex-situ" c'è la coltivazione "in vitro" di apici, gemme ascellari e l'embrionogenesi somatica ed organogenesi da callo ottenuto da differenti espianti. Poiché tutti gli individui rigenerati dal clonaggio sono identici alla pianta madre, una qualsiasi piccola porzione di pianta può essere considerato come materiale per lo stoccaggio. Nel gelso, il metodo di rigenerazione della pianta più utilizzato è la coltura delle gemme ascellari (Jain *et al.*, 1990; Sharma e Thorpe, 1990; Yadav *et al.*, 1990; Cappellozza e Dradi, 1993; Ponchia *et al.*, 1994; Pattanaik *et al.*, 1996), mentre la rigenerazione da callo soffre dell'introduzione di variazioni genetiche (Narayan *et al.*, 1993). Per conservare le risorse vegetali con variazioni minime, bisogna preservare le gemme ascellari o i meristemi apicali e la rigenerazione deve essere condotta con un minimo numero di subculture. Oltre alla preparazione di semi sintetici, incapsulando le gemme apicali o ascellari o gli embrioni somatici con sodio alginato e una soluzione di cloruro di calcio (Bapat *et al.*, 1987; Chand *et al.*, 1994) la conservazione "in vitro" può essere compiuta con il metodo della crescita lenta o della crioconservazione. La prima metodica consiste nel ritardare la crescita del tessuto "in vitro" utilizzando fattori diversi (nutrizionali, osmotici, ormonali ed ambientali). Questo metodo presenta il vantaggio che il materiale stoccato è prontamente disponibile per un successivo utilizzo ed è una tecnica di routine per la conservazione del gelso (Shii *et al.*, 1994). Tuttavia, la metodica non è impiegabile, per ovvi motivi, per la conservazione a lungo termine, che potrebbe essere più facilmente conseguita con la crioconservazione, che, a sua volta, può essere crioconservazione classica o vitrificazione. La prima è compiuta con l'ausilio di impianti di refrigerazione programmabili per la lenta discesa della temperatura e successiva immersione in azoto liquido. Il materiale (gemme dormienti ascellari, o apici vegetativi) viene trattato con crioprotettivi per prevenire la cristallizzazione intracellulare dell'acqua e il conseguente danno alle cellule. Successivamente il materiale viene riportato a temperatura ambiente e sottoposto a subcoltura. Questo metodo è stato applicato con successo a molte piante, fra cui anche il gelso (Rao *et al.*, 2009), ma presenta il grosso inconveniente di richiedere freezer sofisticati per la discesa programmata della temperatura, di solito molto costosi. Con la vitrificazione, invece, si solidifica un liquido, accrescendone la viscosità con l'abbassamento della temperatura. La vitrificazione dei soluti intracellulari si ottiene quando l'acqua intra o inter-cellulare che potrebbe dare luogo a congelamento viene ridotta per essiccazione fisica o con l'utilizzo di miscele altamente concentrate di crioprotettivi, cui segue il congelamento rapido per immersione in azoto liquido. La crioconservazione per vitrificazione non richiede freezer programmabili, è meno complessa ed è stata utilizzata per conservare il gelso (Niino *et al.*, 1992 a, b, 1993, 1995; Kazutoshi *et al.*, 2004). Anche le banche di DNA sono un modo di conservare l'informazione codificata nel genoma e, naturalmente, devono essere associate ad un database e regolate da un "Accordo di trasferimento del materiale", per cui, generalmente, chi riceve il DNA non ha diritti di proprietà intellettuale su questo e il suo sfruttamento.

Chiaramente il metodo migliore per mantenere il materiale genetico è avere le tre modalità operanti in maniera concomitante ("in situ", "ex-situ", come collezione di accessioni in campo e nella modalità di crioconservazione), cui si possa aggiungere la banca di DNA per lo studio genetico e funzionale delle diverse risorse vegetali.

In Italia, attualmente la conservazione di materiale vegetativo di *Morus* si svolge solo in una banca genetica di cloni, collocata nel gelseto sperimentale di CRA-API, sede di Padova. Il gelseto copre più di due ettari di superficie, tuttavia la collezione occupa solo una parcella. Le piante sono vecchie, e, perciò, in cattive condizioni. Molti esemplari sono morti a vari anni di distanza dalla piantagione e sono stati rimpiazzati con alberi più giovani. Perciò le piante non sono omogenee. Un altro problema è che le diverse specie e cv sono state riprodotte per innesto; il portinnesto era di solito selvatico (gelso riprodotto da seme) o della varietà Cattaneo da seme, mentre la marza apparteneva alla varietà da riprodurre. Nel corso degli anni, in qualche caso, il portinnesto ha ripreso vigore sull'innesto, perciò qualche pianta non appartiene alla varietà desiderata. Per ogni varietà/specie, sono mantenuti dai 4 ai 10 esemplari, di solito posti sullo stesso filare o su filari contigui. Fino a qualche tempo fa, l'unico modo di identificare le piante in campo erano delle strisce di colore diverso, dipinte sul tronco, da confrontare con una mappa della collezione. In questa mappa sono indicati la forma della

parcella, il numero di filari e il numero di piante per varietà, ma non le piante morte (mancanti). Le piante coltivate in questa parcella hanno generalmente una forma a vaso, perché questa era considerata la forma di potatura più adeguata per avere informazioni sul portamento naturale della pianta. Tuttavia, non tutte le varietà in conservazione fanno parte della parcella collezioni, perché importate successivamente al primo impianto o ripiantate da talea, per ringiovanire le vecchie accessioni. In questo caso gli esemplari hanno una forma di potatura a media altezza (60-100 cm dal suolo), più adatta alla potatura di raccolta dei rami. In generale si può dire che alcune varietà necessitano di essere ripiantate per ringiovanire le accessioni e preservarle dal naturale deperimento, altre sono di difficile riconoscimento, a causa della mancanza di identificazione sul tronco (etichetta o cartellino) e dell'improbabile corrispondenza con quanto annotato sulla mappa a disposizione. Recentemente una parcella a parte è stata formata con gli esemplari di importazione francese.

1.7.5 I database

La caratterizzazione delle risorse genetiche del gelso determina gli attributi funzionali e strutturali delle accessioni ed è essenziale per la loro identificazione genetica. L'informazione globale sulla variabilità, se registrata, aiuta i selezionatori e gli utilizzatori in un efficace sviluppo della coltura. La valutazione morfologica è basata, soprattutto, sull'osservazione visiva e qualora sia necessario è supportata da una misurazione quantitativa. Quei tratti che sono altamente ereditabili in natura e si manifestano egualmente in tutti gli ambienti vengono utilizzati per l'identificazione genetica e aiutano nella veloce discriminazione tra i fenotipi. Inoltre, la caratterizzazione e stima della variabilità morfologica fornisce un'utile misura della diversità genetica prevalente in un pool genico. Un primo tentativo di "descriptor" del gelso, che potesse essere una traccia comune per tutte le banche genetiche è stato pubblicato da Dandin e Jolly (1986). Successivamente Machii *et al.* (1997) hanno proposto un manuale per la caratterizzazione e valutazione delle risorse genetiche del gelso. Sono stati creati tre gruppi di caratteri: primari, secondari e terziari. I caratteri primari sono morfologici, come la forma delle foglie e delle gemme. Quelli secondari riguardano tratti agronomici, quali la precocità di germogliamento e la resistenza alle malattie. Infine, i terziari includono parametri commerciali che influiscono sul raccolto agricolo, come la quantità di foglia prodotta e la qualità nutrizionale della foglia stessa.

1.7.5.1 La situazione del database in Italia

Con il progetto RGV (Risorse Genetiche vegetali – FAO) è iniziata una descrizione sistematica delle risorse genetiche di gelso della collezione. Durante il 2011, in particolare, si è provveduto a redigere un descriptor, comune anche ad altre risorse genetiche vegetali conservate nelle collezioni del CRA, in modo da unificare l'informazione. Nel 2011 si è incominciata anche un'opera di catalogazione delle more di gelso, sia fotografica, sia per dimensione, in maniera di disporre di informazioni affidabili per un possibile lavoro di selezione per la produzione di frutta.

1.7.5.2 Un esempio di record del database di Padova

Informazioni fitogeografiche:

Cv: Rosa di Lombardia

Binomio specifico: *Morus alba* L.

Origine: cv acquistata da Lombardi prima del 1960 da vivaisti o istituti di ricerca

Caratteri morfologici:

Foglia: fillotassi: spiralata

Natura: eterofillia moderata

Forma: poco lobata, mucrone sviluppato

Margine: dentato

Colore: verde intenso

Tricomi: pubescente

Lenticelle: (densità media per cmq): 7.8

Gemme:

portamento: eretto-chiuse

forma: triangolare

colore: rosso-bruno

Strutture riproduttive:

Sessualità: dioica

Infiorescenze: femminili

Frutto:

colore: bianco

pelosità: scarsa

Seme:

superficie: reticolata

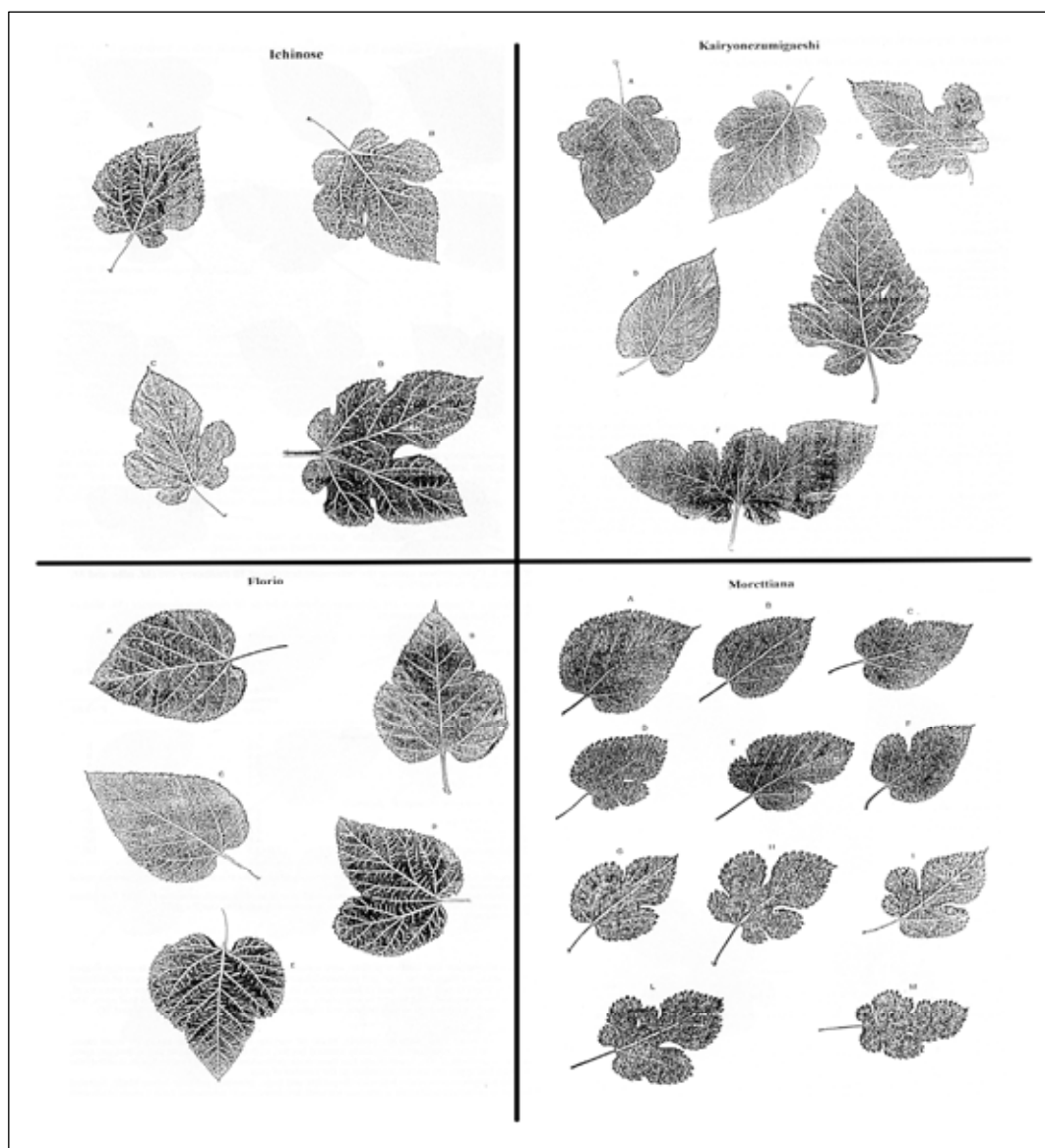


Figura 3 Eterofilia tipica delle foglie di gelso



Foto 4 More e foglie di gelso appartenenti a diverse cv.

1.8 Ringraziamenti

La conservazione di una banca di germoplasma è un'opera corale: i miei ringraziamenti sono, perciò, rivolti a tutti i colleghi della sede di Padova, quelli ancora con me e quelli che sono già in pensione, che con la loro quotidiana dedizione permettono e hanno permesso il mantenimento della collezione, riversando nel loro lavoro molti più sforzi di quelli richiesti dai compiti loro assegnati contrattualmente. Il mio pensiero di gratitudine va anche a tutta quella schiera di "bigattini", soprattutto donne, che hanno allevato con pazienza e fatica per lunghi anni le razze della "Regia Stazione Bacologica", tramandandocene, e agli operai che hanno lavorato nel nostro gelseto sperimentale durante il periodo degli allevamenti, fra questi ricordo specialmente Albano Panizzolo, scomparso qualche anno fa.

Un grazie particolare all'ex-direttore della Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova, dott. Luciano Cappellozza, per avere ottenuto, dalla Provincia di Padova, una nuova e più adatta sede per la banca genetica e al Dott. Aleandri, direttore del Dipartimento di Biologia e Produzioni animali e "ad interim" del Dipartimento di Trasformazione e Valorizzazione dei Prodotti Agro-industriali del CRA, che ha permesso il trasferimento delle razze francesi a Padova ed ha contribuito a reperire i fondi per il loro mantenimento fino ad oggi.

1.9 Bibliografia

Arzone A., Dolci M., Marletto F., 1989. Rilevamenti di fenoxycarb su foglia di gelso. Apicoltura Moderna, 80: 147-152.

- Astaurov B.L., Golysheva M.D., Rovinskaya I.S., 1959. Chromosome complex of Ussuri geographical race of *Bombyx mandarina* M. with special reference to the problem of the origin of domesticated silkworm, *Bombyx mori*. Cytology 1: 327-332.
- Autori vari, 2002. Mulberry for Animal Production (M. Sánchez ed.). FAO Animal Production and Health Paper 147, Rome.
- Bapat V.A., Mhatre M., Rao P.S., 1987. Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. Plant Cell Reports: 6, 393-395.
- Bellini E., Giordani E., Roger J.P., 2000. Il gelso da frutto. L'informatore Agrario, 7: 89-93.
- Bettelli Bergamaschi M.B., 1989. Morarii et celsi: la gelsicoltura in Italia nell'alto Medio Evo. Nuova rivista storica, 73: 1-22.
- Botton A., Barcaccia G., Cappelozza S., Da Tos R., Bonghi C., Ramina A., 2005. DNA fingerprintings sheds light on the origin of introduced mulberry (*Morus* spp.) accessions in Italy. Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 181-192.
- Brambilla A., Lo Scalzo R., Bertolo G., Torreggiani D. (2008) Steam-blanching highbush blueberry (*Vaccinium corymbosus* L.) juice: phenolic profile and antioxidant capacity in relation to cultivar selection. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 56, 2643-2648.
- Cappelozza L., Burlini F., 1992. Inquinamento da fenoxycarb e influenze sulla sindrome del "mancato imbozzolamento del baco da seta" nel Nord Italia. Ambiente Risorse Salute, 10 (9):14-16.
- Cappelozza L., Cappelozza S., 1996. Gelsibachicoltura: tradizione e futuro a confronto. In: Zanetti P.G. (ed.) L'agricoltura veneta dalla tradizione alla sperimentazione attraverso le scuole agrarie e le istituzioni agrarie padovane, pp. 160-182. CLEUP, Padova.
- Cappelozza L., Cappelozza S., Miotto F., 1992. Ulteriore verifica sperimentale da fenoxycarb sui bachi da seta. L'Informatore Agrario, XLVIII (14): 41-45.
- Cappelozza L., Cappelozza S., Saviane A., Sbrenna G., 2005. Artificial diet rearing system for the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae): effect of vitamin C deprivation on larval growth and cocoon production. Applied Entomology and Zoology, 40 (3): 405-412.
- Cappelozza L., Dradi G., 1993. Commercial "in vitro" propagation of *Morus alba* L. (mulberry). First International Symposium on the Biology of Adventitious Root Formation, Dallas, Texas, 18-22 Aprile.
- Cappelozza L., Giulini P., Morellato R., 1990 Rhizogenese induite chez *Morus alba* L. Sericologia, 30 (1):11-31.
- Cappelozza L., Miotto F., Moretto E., 1990. Effetti del fenoxycarb a basse concentrazioni sulle larve di *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae). Redia LXXIII (2):517-529.
- Chand P.K., Sahoo Y., Pattnaik S.K., 1994. Artificial seeds: a novel approach to mulberry propagation. Indian Silk, 10: 33-38.
- Chiang T.C., Hsiang C.H., Wu H.L., Yang S.T., 1979. The study of crossing between mulberry wild silkworm, *Bombyx mandarina* and silkworm, *Bombyx mori*. Department of Sericulture, South West College of Agriculture, Chungching, China.
- Chikushi H., 1972. Genes and genetic stocks of the silkworm. Keigaku Publisher, Tokyo.
- International Silkworm Genome Consortium, 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38:1036-1045.
- Dandin S.B., Jolly M.S., 1986 Mulberry descriptor. Sericologia, 26(4): 465-475.
- Ercisli S, Orhan E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. Food Chemistry, 103: 1380-1384.
- Hirano H., 1982. Varietal differences of leaf protein profiles in mulberry. Phytochemistry, 21: 1513-1518.
- Hotta T., 1954. Fundamentals of *Morus* plants classification (in Japanese) Kinugasa Sanpo, 390: 13-21.
- Ipek M., Pirlak L., Kafkas S., 2012. Molecular characterization of mulberry (*Morus* spp.) genotypes via RAPD and ISSR. Journal of the Science of Food and Agriculture.
- Jain A.K., Dandin S.B., Sengupta K., 1990. *In vitro* micropropagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell Reports, 8: 737-740.
- Kar P.S., Srivastava P.P., Awasthi A.K. and Raje Urs S., 2008. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available India. Tree Genetics and Genomes, 4:75-83.

- Kato T., Kajikawa M., Maenaka K., Park E.Y., 2010. Silkworm expression system as platform technology in life science. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (3): 459-470.
- Katsumata F., 1972 Relationship between the length of styles and the shape of idioblasts in mulberry leaves, with special reference to the classification of mulberry trees. *Journal of Sericultural Sciences Japan*, 41: 387-395.
- Katsumata F., 1979. Chromosomes of *Morus nigra* L. from Java and hybridization affinity between this species and some mulberry species in Japan. *Journal of Sericultural Sciences Japan*, 48: 418-422.
- Kawaguchi E., 1928. Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. I. Gametogenese von *Bombyx mori* L. und *B. mandarina* M. und ihrer Bastarde. *Cell and Tissue Research*, 7(4): 519-552.
- Kazutoshi O., Kazuto S., Takao N., Makoto K., 2004. Plant genetic resources in Japan: platforms and destinations to conserve and utilize plant genetic diversity. *JARQ* 39, 231-237.
- Koidzumi G., 1917. Taxonomical discussion on *Morus* plants (in Japanese). *Bulletin of Imperial Sericulture Experiment Stations*, 3: 1-62.
- Lombardi P.L., 1964. Cultivar di *Morus alba* e *Morus nigra* esistenti nella Stazione Agraria Sperimentale di Ascoli Piceno. *Annuario della Stazione Bacologica Sperimentale "E. Verson" di Padova*, 52: 387-394.
- Lombardi P.L., 1964. Patrimonio nazionale di razze di *B. mori* non più in uso nell'industria (conservazioni-selezioni). *Annuario della Stazione Bacologica Sperimentale "E. Verson" di Padova*, 52: 235-261.
- Machii H., Koyama A., Yamanouchi H, Katagiri K., 1997. Manual for the characterization and evaluation of mulberry genetic resources. *Miscellaneous Publication of the National Institute of Sericultural and Entomological Science*, 22: 105-124.
- Machii H., Koyama A., Yamanouchi H., 1999. Fruit traits of genetic mulberry resources. *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 68: 46-155.
- Machii H., Koyama A., Yamanouchi H., 2000. Mulberry breeding, cultivation and utilization in Japan. *FAO electronic conference on mulberry for animal production*. [Http://www.fao.org/livestck/agap/frg/mulberry/Papers/HTML/Intro.htm](http://www.fao.org/livestck/agap/frg/mulberry/Papers/HTML/Intro.htm)
- Matsubara F., 1997. A new year-round sericulture system incorporating aseptic rearing technique of silkworms on an artificial diet. *Kinugasa Textile Research Institute, Kyoto, Japan*.
- Meneghini A., Cappelozza L., Miotto F., 1986 (a) La moltiplicazione del gelso per talea legnosa. *L'Informatore Agrario*, XLII (19): 67-72.
- Meneghini A., Cappelozza L., Miotto F., 1986 (b) Costituzione di gelseti specializzati utilizzando gelsi riprodotti per talea. *L'Informatore Agrario*, XLII (40): 41-43.
- Micheletto M., 2005. Le foglie di gelso nell'alimentazione dei monogastrici: studio delle caratteristiche nutrizionali. Tesi di laurea della Facoltà di Medicina e Veterinaria dell'Università di Padova, relatore Lucia Bailoni, co-relatore Silvia Cappelozza, 85 pp.
- Mochida Y., Takemura Y., Ohnuma A., Kanekatsu R., Kiguchi K., 2007. Fertilization of eggs developed from the cryopreserved and transplanted ovaries by artificial insemination with cryopreserved semen into the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 76 (2): 97-100.
- Nagaraju J.G., Klimenko V., Couble P., 2000. The silkworm, *Bombyx mori*: a model genetic system. In: Reeve E. C.R. (ed.) *Encyclopedia of Genetics*, Fitzroy Deaborn Publishers, London, Chicago, pp. 219-239.
- Naik, V.G., Mukherjee, P., 1997. An exploration to Andaman and Nicobar islands for wild mulberry germplasm. *Journal of Environmental Resources*, 5: 17-19
- Narayan P., Chakroborti S.P., Roy B.N., Sinha S.S., 1993. *In vitro* regeneration of plant from internodal callus of *Morus alba* L. and isolation of genetic variant. *Seminar on Plant Cytogenetics in India*, University of Calcutta, pp. 188-192.
- Niino T., 1995. Cryopreservation of germplasm of mulberry (*Morus* spp.). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer-Verlag, Berlin, 32.
- Niino T., Koyama A., Shirata K., Ohuchi S., Suguli M., Sakai A., 1993. Long term storage of mulberry winter buds by cryopreservation. *Journal of Sericultural Science Japan*, 62: 431-434.

- Niino T., Sakai A., Enomoto S., Magoshi J., Kato S., 1992(b). Cryopreservation of in-vitro grown shoot tips of mulberry by vitrification. *CryoLetters* 13, 303–312.
- Niino T., Sakai A., Yakuwa H., 1992 (a). Cryopreservation of dried shoot tips of mulberry winter buds and subsequent plant regeneration. *CryoLetters* 13, 51–58.
- Pattanaik S.K., Sahoo Y., Chand P.K., 1996. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. *Scientia Horticulturae*, 42: 61–67.
- Pigorini Luciano, 1918. I laboratori scientifici nazionali: la Regia Stazione Sperimentale di Padova. *La Scienza per tutti*, 5: 1-16.
- Plantevin G., Granier S., Chavancy G., 1991. Effects d'un régulateur de croissance d'insectes, le Fénoxycarbe, sur le développement postembryonnaire de *Bombyx mori* (*Lepidoptera Bombycidae*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 313 (III):513-539.
- Ponchia G., Fila G., Gardiman M., Cappelozza S., 1994. Ambientamento di piante micropropagate di gelso e loro utilizzazione nell'alimentazione del baco da seta. *Atti II Giornate Scientifiche S.O.I., S. Benedetto del Tronto*, 22-24 Giugno: 105-106.
- Premuda M.P., 2007. Ricerca e spionaggio bacologico fra Italia e Giappone. Parte 1. *La seta*, 59 (3): 34-41.
- Premuda M.P., 2008. Ricerca e spionaggio bacologico fra Italia e Giappone. Parte 2. *La seta*, 60 (1): 26-31.
- Ramesh C., Ibraheem Basha K., Lakshmi H., Seshagiri S.V., Phani Kiran Kumar K., 2003. Mulberry – An ideal resource for biotechnological products. *Indian Silk*, 3: 5-9.
- Rangaswamy G., Narasimhanna M.N., Kasiviswanathan K., Sastry C.R. and Jolly M.S., 1976. *Sericultural Manual, Mulberry cultivation*, FAO, Rome.
- Rao P.U., 1994. Chemical composition and nutritional evaluation of spent silkworm pupae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2201-2203.
- Rao A.A., Chaudhury R., Malik S.K., Kumar S., Ramachandra R., Qadri, S.M.H., 2009. Mulberry biodiversity conservation through cryopreservation *in vitro* cell. *In vitro Cellular and Developmental Biology -Plant*, 45: 639–649.
- Reali G., Meneghini A., Trevisan M., 1985. *Bachicoltura moderna*. Edagricole, Bologna, Italy.
- Sanchez M.D., 2000. World distribution and utilization of mulberry, potential for animal feeding. FAO electronic conference on mulberry for animal production. [Http://www.fao.org/livestck/agap/frg/mulberry/Papers/HTML/Intro.htm](http://www.fao.org/livestck/agap/frg/mulberry/Papers/HTML/Intro.htm)
- Sharma A., Sharma R., Machii H., 2000. Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers. *Theoretic and Applied Genetics*, 101: 1049-1055.
- Sharma K.K., Thorpe T.A., 1990. *In vitro* propagation of mulberry (*Morus alba* L.) through nodal segments. *Scientia Horticulturae*, 42, 307–320.
- Shii C.T., Ma S.S., Huang P.L., Chin S.W., 1994. Current and future developments in clonal germplasm conservation of vegetatively propagated crops. In: *Plant Germplasm Conservation: Perspectives for the 2000*. Taiwan Agricultural Research Institute, Taiwan.
- Takeda S., 2013. New field of insect science: Research on the use of insect properties. *Entomological Science*, 16: 125-135.
- Talamucci P., Pardini A., 1993. Possibility of combined utilization of *Morus alba* and *Trifolium subterraneum* in Tuscan Maremma (Italy). VII meeting FAO sub-network on "Mediterranean Pastures and Fodder Crops", REUR Technical Series, 28:206-209.
- Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Komoto N., Thomas J.L., Mauchamp B., & others, 2000. Germ line transformation of the silkworm *Bombyx mori* L., using piggyback transposon-derived vector. *Nature Biotechnology*, 18: 81-84
- Tikader A., Dandin S.B., 2005. Biodiversity, geographical distribution, utilization and conservation of wild mulberry *Morus serrata* Roxb. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 3: 177–184.
- Tikader A., Rao A.A., Mukherjee P., 2000. Pollen morphological studies in mulberry germplasm (*Morus* spp.). *Indian Journal of Sericulture*, 39: 160–162.
- Viggiani G., Loia M., 1991. I rischi della lotta agli insetti dannosi con i regolatori di crescita. *L'Informatore Agrario*, XLVLII (47):67-69.
- Vijayan K., Chatterjee S.N., 2003. ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs. *Euphytica* 131:53–63.
- Vijayan K., Saratchandra B., Jaime Teixeira da Silva A., 2011. Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). *Scientia Horticulturae*, 128: 371–379

- Vijayan K., Srivastava P.P. and Awasthi A.K., 2004 (a). Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. *Genome* 47:439–448.
- Vijayan K., Tikader A., Kar P.K., Srivastava P.P., Awasthi A.K., Thangavelu K., *et al.*, 2006 Assessment of genetic relationships between wild and cultivated mulberry (*Morus*) species using PCR based markers. *Genetic Research and Crop Evolution*, 53:873 – 882.
- Vijayan K., Tikader A., Kar P.K., Srivastava P.P., Awasthi A.K., Thangavelu K., *et al.*, 2004 (b) Molecular evaluation of genetic variability in wild populations of mulberry (*Morus serrata* Roxb.). *Plant Breeding*, 123:568–572 .
- Yadav V., Madan L., Jaiswal V.S., 1990. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. *Scientia Horticulturae*, 44: 61–67.
- Yoshitake N., 1968. Phylogenetic aspects on the origin of Japanese race of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Sericultural Sciences, Japan*, 37: 83-87.
- Zanier C., 1998. La sericoltura europea di fronte alla sfida asiatica: la ricerca di tecniche e pratiche estremo-orientali (1825-1550) *Società e Storia*, 11: 23-52.
- Zhao W., Wang Y., Chen T., Jia G., Wang X., Qi J., *et al.*, 2007 (b). Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSRs in China: implications for conservation of local mulberry varieties. *Scientia Horticulturae*, 115:47–55.
- Zhao W., Zhihua Z., Xuexia Z., Yong M., Sibao Z., Jianhua W., *et al.*, 2007 (a). A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* species (Moraceae: *Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers. *Biodiversity Conservation*, 16:275–290.
- Zhao W., Zhou Z.H., Miao X.X., Wang Lin Zhang S.B., Pan Y.L., Huang Y.P., 2006. Genetic relatedness among cultivated and wild mulberry (Moraceae: *Morus*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis in China. *Canadian Journal of Plant Science*, 86:251–257.
- Zimian D., Yonghua Z., Xiwu G., 2005. Medicinal terrestrial arthropods in China. In: Paoletti M.G. (ed.) *Ecological implications of minilivestocks. Potential of Insects, Rodents, Frogs and Snails*, pp. 481-489. Science Publishers, Enfield N.H., USA.

**Finito di stampare nel dicembre 2013
con tecnologia *print on demand*
presso il Centro Stampa "Nuova Cultura"
p.le Aldo Moro, 5 - 00185 Roma
www.nuovacultura.it**

Per ordini: ordini@nuovacultura.it

[Int_9788868120986_v2_A4col_04]