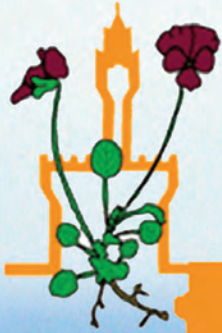


Riunioni scientifiche dei Gruppi di Lavoro
e delle Sezioni Regionali della



Società Botanica Italiana onlus

Report e Mini lavori della Riunione scientifica della

Sezione Regionale Pugliese

29 gennaio 2016, Lecce

In copertina: *Campanula versicolor*, Parco Naturale Regionale “Costa Otranto S.M. di Leuca e Bosco di Tricase”,
foto di A. Turco

Introduzione

L'ultimo venerdì del mese di gennaio, ogni anno, si svolge la riunione scientifica della Sezione Regionale Pugliese della Società Botanica Italiana. In tale occasione si incontrano studiosi del mondo accademico e operatori di orti e parchi e semplici appassionati.

Anche nel 2016 l'evento, tenutosi nel campus ECOTEKNE dell'Università del Salento, è stato molto ricco e ha offerto spazio sia agli aggiornamenti delle ricerche accademiche in corso che ad attività di valorizzazione naturalistica e del territorio. Il socio Francesco Tarantino ha presentato il risultato di un progetto di valorizzazione botanica di un'area privata "Il melting pot degli habitat", mentre Francesco Minonne, membro del Comitato Esecutivo del Parco Naturale Regionale "Costa Otranto S.M. di Leuca e Bosco di Tricase", in rappresentanza di un folto numero di co-autori, ha presentato un complesso studio "Per una sintesi e aggiornamento delle conoscenze floristiche del Parco Naturale Regionale Costa Otranto - Santa Maria di Leuca e Bosco di Tricase".

La riunione ha offerto l'occasione per un aggiornamento sui numerosi studi in ambito accademico che ben rappresentano l'ampiezza degli interessi botanici. Vista la diversità dei temi, si può solo proporre un elenco. Tre contributi, Bruno, Depergola e Fumarola, sono qui proposti nella forma estesa di mini lavori per il Notiziario. Qui di seguito è possibile scorrere l'elenco degli altri argomenti presentati alla riunione:

"Nuove «note» sull'anatomia e le proprietà sonore di *Arundo donax* L." Szymanowska-Pułka J., Acquafredda P., De Tullio M.C.;

"Reintroduzione di *Juncus acutus* L. per il recupero della tradizionale lavorazione del giunco in Acquarica del Capo (LE)" Medagli P., Accogli R., Turco A., Albano A.;

"L'estratto lipidico dell'alga bruna *Undaria pinnatifida* (Laminariales Phaeophyceae): una fonte di composti ad azione antibatterica" Rizzo L., Acquaviva M.I., Cavallo R.A., Cecere E., Narracci M., Petrocelli A., Stabili L.;

"Flavonoidi antiossidanti da *Passiflora loefgrenii* Vitta" Argentieri M.P., Avato P.;

"Realizzazione di un prototipo di biosensore a trasduzione ottica (SPR/LSPR) per rilevare la presenza di alleli correlati alla qualità in grano duro" Galati C., De Pascali M., Lenucci M.S., Rampino P., Piro G., De Bellis L., Perrotta C.;

"Un biosensore a cellula intera per rilevare la contaminazione da ioni metallici in alimenti di derivazione vegetale" De Pascali M., Galati C., De Caroli M., Rampino P., G., Piro G., De Bellis L., Perrotta C.;

"*Centaurea sonchifolia* L. Greuter, specie nuova per la flora pugliese nel Parco Naturale Regionale Isola di S. Andrea-Litorale di Punta Pizzo (Gallipoli - LE)" Gennaio R., Medagli P.;

"PSR 2007/2013 della Regione Puglia: Valutazione e valorizzazione della biodiversità agraria del Salento" Accogli R., Turco A., Medagli P., Albano A., De Bellis L.;

"Corinoli comune (*Smyrniolum olusatrum* L.): una pianta tutta da riscoprire" Montefusco A., Quarta L., Marrese P.P., Piro P., Dalessandro G., Lenucci M.S.;

"Pasta funzionale arricchita in isoprenoidi: valutazione delle caratteristiche biochimiche e sensoriali" Marrese P.P., Durante M., Montefusco A., Piro G., Dalessandro G., Perrotta C., De Bellis L., Mita G., Pasqualone A., Lenucci M.S.

La prossima riunione scientifica della Sezione Regionale Pugliese è fissata per il 27 gennaio 2017 con appuntamento a Bari.

a cura di Gian Pietro Di Sansebastiano

Caratterizzazione di endofiti in *Nephrolepis cordifolia* (L.) C. Presl. Studi preliminari

G.L. Bruno, F. De Siati, D. Mondelli, D. Malerba, A. Campanile, D. Denticò, F. Tommasi

Riassunto - *Nephrolepis cordifolia* accumula piombo ed alluminio, mentre tollera lantanio e cerio. Radici, tuberi e porzioni basali di questa felce ospitano specie diverse di *Trichoderma*. La presente nota riassume le risposte dell'isolato Th1 di *T. harzianum* Rifai, endofita di *N. cordifolia*, a concentrazioni di 0,1 a 1,0 mM di NaAsO_2 e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ in colture liquide su substrato di Potato-Dextrose-Broth. Dopo 7 giorni di incubazione fino al 50% dell'arsenico e del piombo iniziali sono incorporati nel micelio dell'isolato Th1. Questi risultati apportano nuovi contributi all'eco-fisiologia di *N. cordifolia* in associazione con *T. harzianum* e suggeriscono che questo micete possa avere capacità di biorimediazione verso elementi "tossici" quali arsenico e piombo.

Parole chiave: arsenico, endofiti, piombo, *Trichoderma harzianum*

Introduzione

Nephrolepis cordifolia L. (C. Presl) è una felce coltivata e commercializzata come pianta ornamentale. Alcuni studi riportano la tolleranza di questa specie a metalli di transizione quali lantanio e cerio (Fasciano et al. 2010), la produzione di sostanze ad azione antimicrobica da parte delle fronde (Basile et al. 1997), la capacità di accumulare piombo e alluminio e quella di stabilizzare i suoli (Cornara et al. 2007, Kashenko et al. 2007, Olivares et al. 2009). *Trichoderma viride* Pers. e *T. harzianum* Rifai sono stati segnalati nei tuberi, nelle radici e nelle porzioni basali delle fronde di questa felce (Bruno et al. 2008, 2014, Fasciano et al. 2011). L'associazione della felce con endofiti fungini potrebbe essere correlata alla tolleranza di questa specie a elementi "tossici". Sono noti, infatti, ceppi di *Trichoderma* capaci di detossificare il cianuro (Ezzi, Lynch 2002, Harman et al. 2004), di tollerare il rame (Vinale et al. 2004), di produrre enzimi in grado di degradare idrocarburi policromatici (Harman et al. 2004). Il presente lavoro ha lo scopo di verificare l'azione "detossificante" di *T. harzianum* endofita di *N. cordifolia* nei confronti del piombo e dell'arsenico.

Materiali e Metodi

Le prove descritte di seguito sono state condotte utilizzando l'isolato Th1 di *T. harzianum* ottenuto, nel 2013, da stolone di *N. cordifolia* coltivata presso l'Orto botanico dell'Università di Bari Aldo Moro. L'isolato è conservato presso la Micoteca della sezione di Patologia Vegetale del Di.S.S.P.A. dell'Università di Bari in flaconi in vetro su substrato di Potatoes-Dextrose-Agar (PDA, Oxoid), a 4°C.

Interazione con il piombo e l'arsenico

L'effetto del piombo dinitrato [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, Sigma-Aldrich] e del sodio arsenito (NaAsO_2 , Sigma-Aldrich) sull'isolato Th1 è stato saggiato in colture liquide (130 rpm, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, al buio) in substrato di Potato-Dextrose-Broth (PDB, Oxoid). Colture su PDB sono state allestite come controllo. $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e NaAsO_2 sono stati saggiati a concentrazioni 0,1 e 1 mM. Dopo la sterilizzazione (in autoclave, 121°C , 1 atm, 20 min) i substrati sono stati raffreddati e addizionati, sotto cappa, delle opportune quantità di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ o NaAsO_2 prelevate da soluzioni 25 mM sterilizzate per filtrazione. I substrati così preparati hanno pH di $5,1 \pm 0,2$. Colonie di Th1 cresciute per 13 giorni su substrato di PDA ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, al buio) sono state utilizzate per ottenere una sospensione acquosa di 2×10^5 conidi per μl . Ciascun matraccio (50 ml di PDB) è stato inoculato con 10^8 conidi. I matracci di controllo hanno ricevuto 500 μl di acqua distillata sterile. Dopo 7 giorni di incubazione, si è provveduto a separare il micelio dal filtrato colturale (FC) per filtrazione sotto vuoto su carta Whatman n. 1. Per ogni matraccio sono stati annotati il volume finale (in ml) e il pH. Ciascun FC è stato conservato a -20°C . Il micelio raccolto è stato congelato (-20°C), liofilizzato e pesato per la determinazione del peso secco. Per ciascuna tesi sono stati preparati tre matracci. L'esperimento è stato ripetuto tre volte. Il confronto tra le medie è stato realizzato con l'analisi ANOVA utilizzando il software *Statgraphics*. Le medie sono state separate usando la minima differenza significativa (MDS) a $P=0,05$.

Estrazione e quantificazione del piombo e dell'arsenico

I campioni di FC e micelio sono stati sottoposti a mineralizzazione acida prima di essere analizzati mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma presso i laboratori della sezione di Chimica e Biochimica del Di.S.S.P.A. Per ciascuna tesi analizzata, la distribuzione del Pb e dell'As nelle due facies (solida e liquida) è stata espressa come percentuale rispetto alla concentrazione presente nel substrato iniziale (non inoculato).

Risultati e Discussione

L'isolato Th1 ben si è adattato alle condizioni colturali delle diverse prove eseguite. Nelle colture su PDA, Th1

mostrava crescita veloce e in 4-5 giorni riempiva completamente la piastra. Il micelio aereo, inizialmente ialino, assumeva, dopo due giorni, aspetto fioccoso e formava anelli concentrici di colore verde.

L'aggiunta di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ o di NaAsO_2 nel substrato PDB ha permesso di evidenziare effetti diversi a seconda dell'inquinante considerato e della concentrazione saggiata. Dopo filtrazione su carta Whatman sono state raccolte le quantità di FC riportate in Tab. 1. Nelle condizioni di coltura adottate, l'isolato Th1 ha utilizzato aliquote diverse di substrato: 6,5 ml nelle tesi di controllo e quantità variabili da 2,5 a 3,9 ml nei terreni addizionati con As, rispettivamente alla concentrazione 0,1 o 1,0 mM. Alla presenza di Pb, i ml utilizzati variano da 2,5, quando saggiato a 1,0 mM, a 4,5 con 0,1 mM di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Il pH varia solo in presenza di piombo. Infatti, rispetto al substrato di controllo, all'aumentare della concentrazione di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ saggiata, il valore del pH si sposta verso valori meno acidi.

Tab. 1

Volume finale (ml) e pH dei filtrati colturali ottenuti dopo sette giorni di coltura liquida nel substrato di Potato-Dextrose-Broth addizionato con concentrazioni differenti di arsenico o piombo.

Substrato	ml	pH
PDB (Controllo)	43,5±3 ^a	4,9±0,2 ^a
PDB + NaAsO ₂ 0,1 mM	46,1±3 ^b	4,9±0,2 ^a
PDB + NaAsO ₂ 1,0 mM	47,5±3 ^b	4,9±0,2 ^a
PDB + Pb(NO ₃) ₂ 0,1 mM	45,5±3 ^b	4,5±0,2 ^b
PDB + Pb(NO ₃) ₂ 1,0 mM	47,5±3 ^b	4,2±0,2 ^c

Ciascun valore rappresenta la media di nove repliche ± ds.

Per ciascuna colonna, valori seguiti da lettere diverse sono significativamente differenti a P=0,05.

Come riportato in Fig. 1, diverso è l'effetto di As e Pb sulle quantità di micelio raccolto. Rispetto alle beute di controllo, solo il $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ saggiato a concentrazione di 0,1 mM, porta ad una riduzione (21%) del micelio raccolto rispetto alle beute di controllo. Per contro, le due concentrazioni di NaAsO_2 saggiate (0,1 e 1,0 mM) e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1,0 mM determinano un generale incremento (dal 7 al 28%) delle quantità di micelio raccolto.

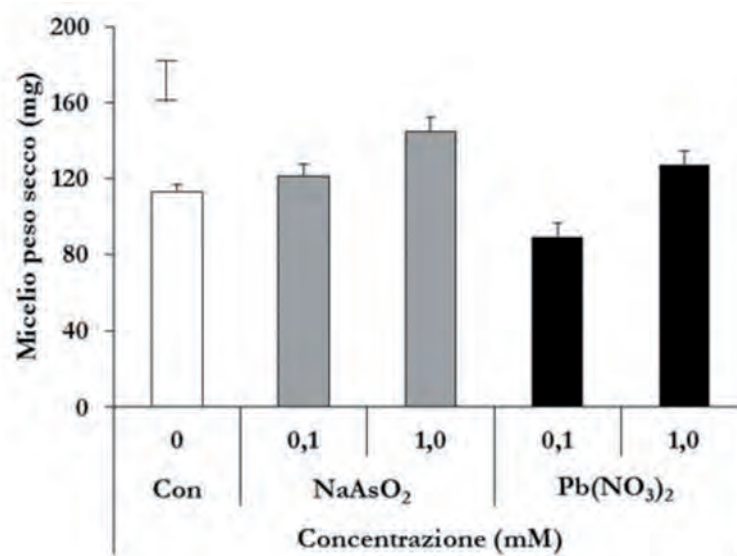


Fig. 1

Micelio (espresso come peso secco) prodotto dall'isolato Th1 di *T. harzianum* dopo 7 giorni di coltura liquida (130 rpm, 25±2°C, al buio) nel substrato di Potato-Dextrose-Broth con l'aggiunta di arsenico o piombo a differenti concentrazioni. Ciascun istogramma rappresenta la media di nove repliche ± ds. La barra verticale indica la MDS a P=0,05.

La distribuzione dei due inquinanti nei campioni analizzati, è riportata in Fig. 2.

Arsenico e Piombo, indipendentemente dal substrato considerato, sono presenti, seppur in concentrazioni diverse, nel filtrato colturale e nel micelio. Circa il 50% dell'As è rimasto nel liquido di coltura, mentre la parte restante è incorporata nel micelio dell'isolato Th1. Per il Pb, nelle beute contenenti la maggiore concentrazione (1,0 mM), il 50,8 % è presente nel liquido di coltura e il 49,2 % nel micelio. Nelle beute dove il Pb è presente a concentrazione 0,1 mM solo 16,4 % è incorporato nel micelio dell'isolato Th1, mentre alla concentrazione 1 mM

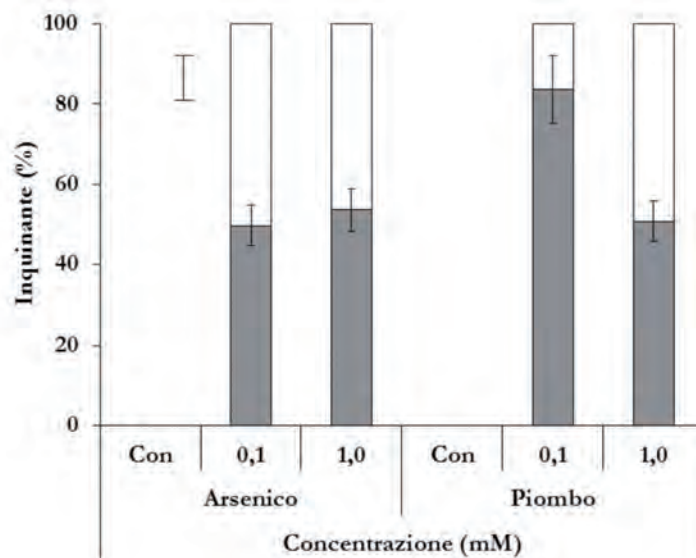


Fig. 2

Distribuzione percentuale dell'arsenico e del piombo tra micelio (□) e filtrato culturale (■) nel substrato Potato-Dextrose-Broth (PDB, Con) o PDB modificato con l'aggiunta di Arsenico (10 o 100 ppm) o piombo (20,7 o 207 ppm) dopo 7 giorni di cultura liquida (130 rpm, al buio) con l'isolato Th1 di *T. harzianum*. Ciascun istogramma rappresenta la media di nove repliche \pm ds.

circa il 50 % dell'elemento è presente sia nel micelio che nel liquido di cultura.

I risultati qui riportati mostrano che l'isolato Th1 di *T. harzianum* si accresce in presenza di Pb e As e riduce il contenuto di entrambi gli elementi nel substrato. Tali dati apportano nuovi contributi utili a caratterizzare aspetti eco-fisiologici di *N. cordifolia* in associazione con *T. harzianum*. La capacità del fungo di tollerare e accumulare As e Pb potrebbe spiegare la tolleranza di questa specie di felce ai due elementi "tossici" considerati.

Alcuni dati di letteratura riportano che *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg ha dimostrato buone capacità nella biotrasformazione dell'arsenico (Su et al. 2011), mentre specie non identificate di *Trichoderma* sono in grado di rimuovere questo elemento da suoli contaminati (Srivastava et al. 2011). Per quanto riguarda il Pb, *T. viride* ha dimostrato buone capacità nell'accumulare questo inquinante da matrici acquose (Sahu et al. 2012). Per *T. harzianum* i dati qui riportati sembrano essere la prima segnalazione della capacità del fungo di accumulare As e Pb. Ulteriori studi sono necessari per valutare il ruolo fisiologico di *Trichoderma* in associazione con *N. cordifolia* e l'eventuale contributo del fungo nell'interazione della pianta con As e Pb. Tuttavia i dati riportati suggeriscono di considerare l'associazione *N. cordifolia* e *T. harzianum* un possibile strumento nel processo di biorimediazione dei suoli contaminati da arsenico e piombo.

Letteratura citata

- Basile A, Spagnuolo V, Giordano S, Sorrentino C, Lavitola A, Castaldo-Cobianchi R (1997) Induction of antibiotic activity by α -D-oligogalacturonides in *Nephrolepis* sp. (Pteridophyta). *International Journal of Antimicrobiology Agents* 8: 131-134.
- Bruno GL, d'Aquino L, Fasciano C, Zicari MA, Tommasi F (2014) *Nephrolepis cordifolia* (L.) C. Presl: molto più di una pianta ornamentale. *Informatore Botanico Italiano* 46: 325-327.
- Bruno GL, Tommasi F, Sparapano L, d'Aquino L (2008) Endophytes in the fern *Nephrolepis cordifolia*. *Journal of Plant Pathology* 90(Suppl. 2): S2.289-S2.290.
- Cornara L, Roccotiello E, Minganti V, Drava G, De Pellegrini R, Mariotti MG (2007) Level of trace elements in Pteridophytes growing on serpentines and metalliferous soils. *Journal of Plant Nutrition Soil Science* 170: 781-787.
- Ezzi MI, Lynch JM (2002) Cyanide catabolising enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 1042-1047.
- Fasciano C, Ippolito MP, d'Aquino L, Tommasi F (2010) Effetto dei Lantanidi sui sistemi antiossidanti in *Nephrolepis cordifolia* L. (C. Presl.). *Informatore Botanico Italiano* 43(Suppl. 1): 28-29.
- Fasciano C, Bruno G, d'Aquino L, Tommasi F (2011) Caratterizzazione istologica e biochimica di tuberi di *Nephrolepis cordifolia* (L.) C. Presl. *Informatore Botanico Italiano* 43(Suppl. 1): 13-14.
- Kachenko AG, Singh B, Bhatia NP (2007) Heavy metal tolerance in common fern species. *Australian Journal of Botany* 55: 63-73.
- Harman GE, Lorito M, Lynch JM (2004) Uses of *Trichoderma* spp. to remediate soil and water pollution. *Advances in Applied Microbiology* 56: 313-330.
- Olivares E, Peña E, Marcano E, Mostacero J, Aguiar G, Benítez M, Rengifo E (2009) Aluminium accumulation and its relationship with mineral plant nutrients in 12 pteridophytes from Venezuela. *Environmental and Experimental Botany* 65: 132-141.
- Su S, Zeng X, Bai L, Li L, Duan R (2011) Arsenic biotransformation by arsenic-resistant fungi *Trichoderma asperellum* SM-

12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1. *Science of the Total Environment* 409: 5057-5062.

Srivastava PK, Vaish A, Dwivedi S, Chakrabarty D, Singh N, Tripathi RD (2011) Biological removal of arsenic pollution by soil fungi. *Science of the Total Environment* 409: 2430-2442.

Sahu A, Mandal A, Thakur J, Manna MC (2012) Exploring bioaccumulation efficacy of *Trichoderma viride*: an alternative bioremediation of cadmium and lead. *National Academy Science Letters* 35: 299-302.

Vinale F, D'Ambrosio G, Abadi K, Scala F, Marra R, Turra D, Woo SL, Lorito M (2004) Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *Journal of Zhejiang University - Science A: Applied Physics & Engineering* 30: 2-8.

AUTORI

Giovanni Luigi Bruno (giovanniluigi.bruno@uniba.it), Donato Mondelli (donato.mondelli@uniba.it), Daniela Malerba (daniela.malerba@uniba.it), Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.), Università di Bari Aldo Moro, via G. Amendola 165/A, 70126 Bari

Francesca Desiati (francesca.desiati@libero.it), Antonella Campanile (antonella.campanile@alice.it), Debora Dentico (deborade88@gmail.com), Franca Tommasi (franca.tommasi@uniba.it), Dipartimento di Biologia, Università di Bari Aldo Moro, via Orabona 4, 70125 Bari

Autore di riferimento: Franca Tommasi

Attività perossidasi e lignificazione in ipocotili di plantule (*Lupinus albus* L.) cresciute al buio e alla luce

F. Depergola, C. Paciolla, S. De Leonardis, L. Mastropasqua

Riassunto - La deposizione della lignina nella parete cellulare è un processo altamente organizzato, che coinvolge le perossidasi apoplastiche del fluido intercellulare e di quelle legate ionicamente e covalentemente alla parete cellulare. Lo studio ha analizzato l'influenza della luce sul contenuto di lignina e sull'attività delle perossidasi. In plantule di lupino la lignificazione dell'ipocotile è stimolata dall'esposizione alla luce e le perossidasi apoplastiche maggiormente coinvolte nel processo di polimerizzazione della lignina sono quelle del fluido intercellulare e quelle legate covalentemente alla parete.

Parole chiave: lignina, luce, *Lupinus albus* L.

Introduzione

La deposizione della lignina nella parete cellulare è un processo altamente organizzato, nel quale i fenoli, i polisaccaridi e le proteine della parete svolgono un ruolo importantissimo di supporto. La lignificazione viene considerata come un evento che compare tardi nel processo di differenziamento della parete cellulare ed è temporalmente correlato con la deposizione di strati di parete secondaria in particolari tessuti come lo xilema e lo sclerenchima (Iiyama et al. 1993). Il processo di lignificazione si svolge in tre tappe principali: la biosintesi dei monolignoli nel citosol, il trasporto di essi attraverso la parete cellulare e la loro successiva deidrogenazione ossidativa e polimerizzazione che porta alla formazione di macromolecole eterogenee. In quest'ultima tappa un ruolo molto importante è giocato dalle perossidasi (Welinder 1992, Siegel 1993), enzimi bifunzionali capaci di ossidare vari substrati fenolici in presenza di H_2O_2 e di catalizzare la formazione delle ROS attraverso l'ossidazione del NADH (Otter, Polle 1994). Le perossidasi vegetali sono glicoproteine classificate in due gruppi sulla base del loro pI: perossidasi anioniche (acide) e cationiche (basiche) (Chen et al. 2001). Mentre le perossidasi basiche sono presenti sia nella parete cellulare che nei vacuoli, le perossidasi acide si trovano principalmente nella parete cellulare. Il processo di lignificazione e di espansione cellulare sono strettamente associati e l'allentamento o irrigidimento della parete cellulare può essere controllato con precisione dalle attività antagoniste di perossidasi apoplastiche appartenenti alla classe III. Le perossidasi di classe III coinvolte nella lignificazione sono principalmente localizzate nell'apoplasto e sono proteine frazionate solubili e proteine legate ionicamente e covalentemente alla parete cellulare (Araújo et al. 2014). Durante la germinazione dei semi e la formazione delle plantule, fattori ambientali come la luce possono influenzare la sintesi e la deposizione della lignina; è stato dimostrato che l'irradiazione luminosa aumenta l'attività delle POD e la lignina in ipocotili di fagiolo (Chen et al. 2001) e che piantine di *Ebenus cretica* L. cresciute alla luce hanno più lignina delle piantine cresciute al buio (Syros et al. 2005). Nel nostro studio è stata analizzata l'influenza della luce sul contenuto di lignina e sull'attività delle perossidasi di classe III di parete in ipocotili di lupino.

Materiale e Metodi

Semi di lupino, *Lupinus albus* L., sono stati imbibiti in acqua per 24 ore, posti a germinare in segatura inumidita con acqua di fonte e collocati in una camera termostata a 24 ± 1 °C, UR del 70-80%, al buio (D) per 6 giorni. Alcune plantule sono state trasferite alla luce bianca (W) per 48h con un fotoperiodo luce-buio 16/8 e un flusso di fotoni pari a $110 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$. In seguito, segmenti d'ipocotile di 1 cm sono stati tagliati subito sotto l'inserzione dei cotiledoni ed utilizzati per le analisi. Il contenuto di lignina è stato dosato con un metodo spettrofotometrico che misura l'assorbanza a 280 nm di lignina tioglicolata (Bruce, West 1989). Dal materiale raccolto sono state estratte e separate le frazioni proteiche del fluido intercellulare, ionicamente e covalentemente legate alla parete (De Pinto, De Gara 2004). Il dosaggio dell'attività specifica delle perossidasi (POD) extracellulari è stata eseguita usando l'alcool coniferilico come donatore di elettroni. Le isoforme di perossidasi sono state separate mediante elettroforesi nativa dei campioni proteici seguita dalla rivelazione dell'attività enzimatica su gel mediante colorazione specifica (Ferrer et al. 1990).

Risultati e Discussione

La crescita dell'ipocotile è guidata dall'espansione cellulare ed è soppressa dall'esposizione alla luce. Infatti le piantine di lupino esposte per 48 ore alla luce hanno subito un arresto della crescita (Fig. 1).

Durante il processo di distensione cellulare si esplica anche il differenziamento degli elementi istologici deputati alla conduzione ed al sostegno, elementi le cui pareti cellulari sono parzialmente o totalmente lignificate. Nel nostro lavoro, l'analisi del contenuto di lignina ha messo in evidenza come la luce bianca sia efficace nel determinarne il suo accumulo (Fig. 2). Nel lupino, durante il processo di allungamento dell'ipocotile e di lignificazione, le perossidasi maggiormente coinvolte sembrano essere quelle del fluido intercellulare e covalentemente legate (Fig. 3); inoltre, l'esposizione alla luce determina un incremento della loro attività specifica. Le POD ionicamente

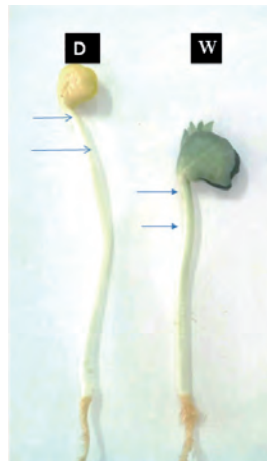


Fig. 1
 Plantule di lupino cresciute al buio per 8 giorni (D) e plantule di lupino cresciute al buio per 6 giorni e poi trasferite per 48 ore alla luce (W).

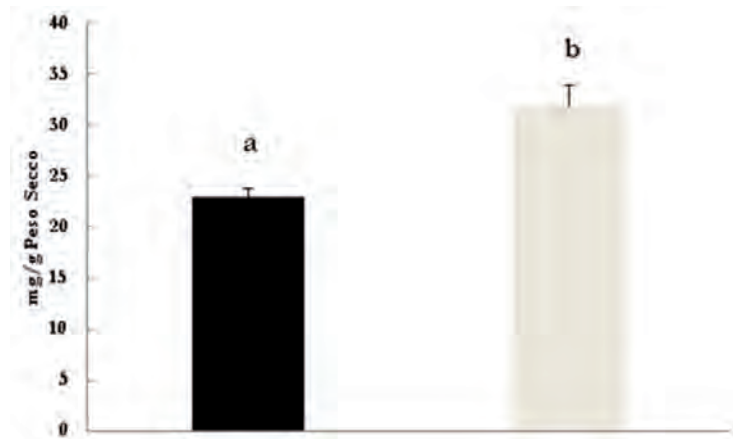


Fig. 2
 Contenuto di lignina in plantule di lupino cresciute al buio per 8 giorni (■) e plantule di lupino cresciute al buio per 6 giorni e poi trasferite per 48 ore alla luce (□). Lettere differenti identificano variazioni statisticamente significative ($p < 0,05$).

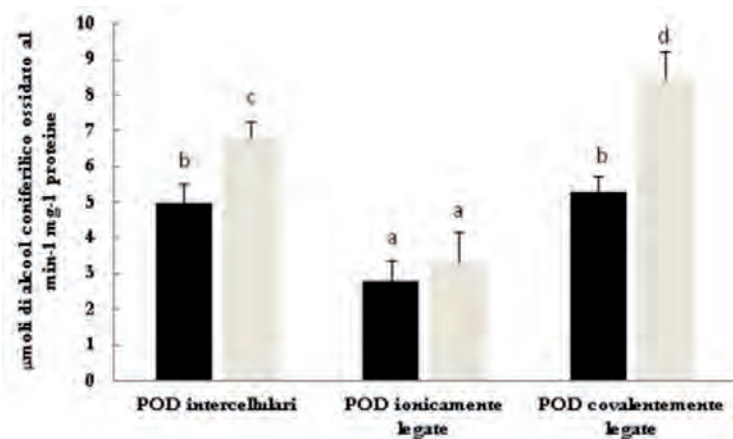


Fig. 3
 Attività specifica delle POD intercellulari, ionicamente e covalentemente legate, in ipocotili di plantule di lupino cresciute al buio per 8 giorni (■) e cresciute al buio per 6 giorni e poi trasferite per 48 ore alla luce (□). Lettere differenti identificano variazioni statisticamente significative ($p < 0,05$).

legate sono quelle meno attive e meno influenzate dalla luce. Le isoforme delle perossidasi apoplastiche sono state separate mediante elettroforesi nativa dei campioni proteici, seguita dalla rivelazione dell'attività enzimatica su gel mediante colorazione specifica.

Numerose isoforme di perossidasi sono presenti in tutti i patterns elettroforetici delle frazioni proteiche estratte dalla parete cellulare di ipocotili di lupino. Nel caso delle perossidasi intercellulari (Fig. 4a), sono ben visibili 4 isoforme anioniche (2-3-4-5) maggiormente marcate nel trattamento alla luce e una isoforma cationica (1). Nelle perossidasi ionicamente legate (Fig. 4b) le isoforme sono soltanto due e spostate nel range cationico, mentre il pattern elettroforetico relativo alle perossidasi covalentemente legate (Fig. 4c) presenta lo stesso pattern elettroforetico delle POD intercellulari.

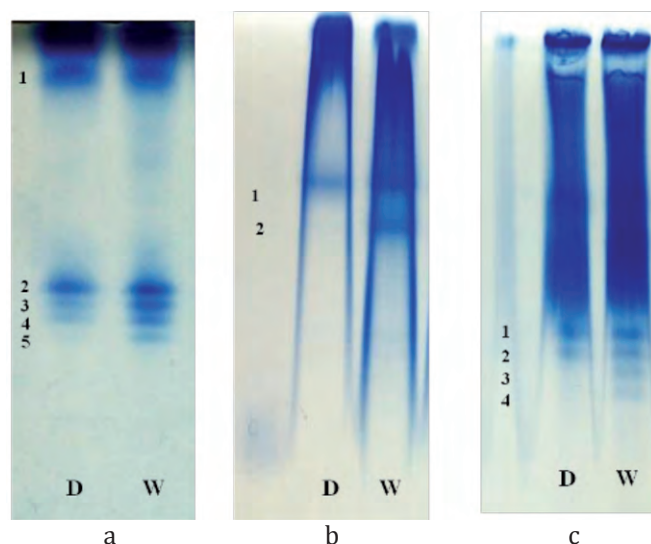


Fig. 4
Patterns elettroforetici delle POD intercellulari (a), ionicamente legate (b) e covalentemente legate (c) di ipocotili di lupino dopo 8 giorni di crescita al buio (D) e dopo 6 giorni al buio e 48 ore alla luce bianca (W).

Durante la germinazione dei semi e la formazione delle plantule fattori ambientali come la luce possono influenzare la sintesi e la deposizione della lignina. In plantule di lupino la lignificazione dell'ipocotile è stimolata dall'esposizione alla luce e le perossidasi apoplastiche maggiormente coinvolte nel processo di polimerizzazione della lignina sono quelle del fluido intercellulare e quelle legate covalentemente alla parete.

Letteratura citata

- Araújo P, Cesarino I, Mayer JLS, Ferrari IF, Kiyota E, Sawaya ACHF, Leme AFP, Mazzafera P (2014) A model system to study the lignification process in *Eucalyptus globulus*. *Physiologia Plantarum* 152: 17-31.
- Bruce RJ, West CJ (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by peptic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology* 91: 889-898.
- Chen YA, Shin JW, Liu ZH (2001) Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. *Plant Physiology Biochemistry* 40: 33-39.
- De Pinto MC, De Gara L (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany* 55 (408): 2559-2569.
- Ferrer MA, Calderon AA, Munoz R, Ros Barcelo A (1990) 4-Methoxy-a-naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochemical Analysis* 1: 63-69.
- Iiyama K, Lam TBT, Meikle PJ, Ng K, Rhodes DI, Stones BA (1993) Cell wall biosynthesis and its regulation. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J (eds) *Forage cell wall structure and digestibility*. American Society of Agronomy, Madison: 621-683.
- Otter T, Polle A (1994) The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Cell Physiology* 35: 1231-1238.
- Siegel BZ (1993) Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regulation* 12: 303-312.
- Su G, An Z, Zhang W, Liu Y (2005) Light promotes the synthesis of lignin through the production of H₂O₂ mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology* 162: 1297-1303.
- Syros TD, Yupsanis TA, Economou AS (2005) Expression of peroxidases during seedling growth in *Ebenus cretica* L. as affected by light and temperature treatments. *Plant Growth Regulation* 46: 143-151.
- Welinder KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 388-393.

AUTORI

Francesca Depergola (francy_dep@libero.it), Costantino Paciolla (costantino.paciolla@uniba.it), Silvana De Leonardis (silvana.deleonardis@uniba.it), Linda Mastropasqua (linda.mastropasqua@uniba.it), Dipartimento di Biologia, Università di Bari "Aldo Moro", via Orabona 4, 70125 Bari

Autore di riferimento: Linda Mastropasqua

Analisi di alcuni parametri di qualità in germogli di *Glicine max* (L.) Merr. e *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, cresciuti al buio e in condizioni di luce bianca e blu

C. Fumarola, N. Dipierro, C. Paciolla, L. Mastropasqua

Riassunto – I germogli sono alimenti vegetali sempre più utilizzati nella dieta. In questo lavoro, differenti condizioni di illuminazione sono state utilizzate per valutare gli effetti su alcuni parametri di qualità in germogli di *Glicine max* (L.) Merr. e *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. Al buio, il peso secco e gli zuccheri solubili erano più elevati rispetto alle condizioni di luce in entrambi i germogli. La luce blu ha determinato il più alto contenuto di antociani e lignina nei germogli di Soia gialla, mentre la Soia verde ha mostrato il maggior contenuto di antociani, amido, proteine e acido ascorbico.

Parole chiave: germogli, luce, *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek

Introduzione

L'utilizzo dei germogli come costituenti della dieta risale a molti secoli prima della civiltà romana. Negli anni, con i progressi apportati nel campo dell'agricoltura, si è cancellata quasi del tutto la pratica del consumo dei germogli. Negli ultimi decenni, parallelamente al modello di dieta mediterranea, ha nuovamente suscitato interesse il consumo di germogli anche in quelle che conosciamo con il nome di dieta vegetariana e vegana. Un germoglio tradizionalmente utilizzato a questo scopo è la Soia gialla (*Glicine max* (L.) Merr.). La Soia gialla e la Soia verde sono spesso intese, dai consumatori di germogli freschi, come leguminose appartenenti alla stessa specie. La Soia gialla (*G. max*), ricca di proteine e povera di grassi, è carente in amminoacidi solforati, quali cisteina, metionina e triptofano, ma ricca in lisina. Numerosi studi sono stati condotti sulla Soia gialla, per verificare l'effetto della germinazione su componenti antinutrizionali, sul contenuto di proteine e amminoacidi. I germogli di Soia sono facili da digerire e sono una buona fonte di proteine e minerali (Xu et al. 2005); inoltre sono una fonte naturale di vitamine. In alcuni studi è stato osservato che l'acido ascorbico (AsA) non presente nei semi di Soia, aumenta significativamente nei germogli. Questo indica che la Soia è in grado di accumulare questa vitamina durante la germinazione (Ginter 1989, Jimenez 1997). La così detta Soia verde (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) è nativa dell'India-Birmania e viene coltivata estensivamente in Asia e utilizzata come alimento umano (come fagioli secchi o germogli freschi), come sovescio e come foraggio per il bestiame. I semi di Soia verde rappresentano, in particolare nei paesi in via di sviluppo, un'ottima fonte di proteine vegetali (19,1-28,3%), minerali (0,18 a 0,21%), e vitamine. I germogli possono pertanto diventare potenziale fonte di nutrienti e recenti studi hanno dimostrato che, in alcune crucifere (Zielinski et al. 2005), dopo quattro giorni di germinazione, si aveva una quantità appropriata di composti bioattivi come l'acido L-ascorbico, glutatione ridotto, inositolo fosfato e composti fenolici. La luce è fondamentale per la crescita e lo sviluppo della pianta sin dalle prime fasi della germinazione dei semi, e la sua presenza o assenza determina differenze morfogenetiche che sono mediate da fotorecettori quali il Fitocromo, che assorbe luce rossa tra 600-750 nm, Criptocromo e Fototropine che assorbono luce blu tra 320-500 nm. Le principali risposte delle plantule eziolate alla luce blu sono: l'inibizione dell'allungamento dell'ipocotile, l'espansione dei cotiledoni, il fototropismo, i movimenti stomatici, l'inverdimento dei cloroplasti e la produzione di antocianine. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare e comparare la biosintesi di alcuni parametri di qualità durante la germinazione al buio e a luce bianca e blu.

Materiale e Metodi

Sono stati utilizzati semi di Soia gialla (*G. max*) e Soia verde (*V. radiata*) imbibiti per circa due ore. Successivamente sono stati posti a germinare in capsule Petri su carta bibula imbevuta di acqua. Le capsule sono state esposte alla luce bianca, blu e al buio in una camera di crescita, a una intensità luminosa di $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Il fotoperiodo della camera di crescita è stato di 16 ore di luce e 8 ore di buio, mentre la temperatura è stata mantenuta costante a 25 °C con umidità relativa del 78%. Lotti di germogli, prelevati dopo 5 giorni di crescita, sono stati utilizzati per le analisi.

Risultati e Discussione

Dopo 5 giorni di crescita al buio e alla luce bianca e blu, i germogli presentano diversa dimensione, diverso sviluppo e colore. Solitamente la Soia gialla viene fatta germinare al buio ottenendo germogli gialli per il consumo alimentare (No et al. 2003) e l'inverdimento dei cotiledoni, derivante dall'illuminazione, diminuisce la commerciabilità dei germogli (Lee et al. 2007). La Soia verde presenta un maggior contenuto di acqua rispetto alla Soia gialla, la quale ha una più alta percentuale di peso secco (Tabb. 1, 2). È noto che la luce, e soprattutto la luce blu, stimola la sintesi di Antociani (Konczak, Zhang 2004) e nelle nostre condizioni di crescita è particolarmente evi-

dente nella Soia verde (Tab. 2). L'inverdimento dei germogli, in alcuni casi non gradito ai consumatori e dovuto alla sintesi di Clorofille, è maggiore nella Soia gialla a luce bianca e blu. Anche il contenuto di AsA risulta essere correlato alla presenza di luce; quantità e qualità della luce possono influenzare la sua sintesi (Mastropasqua et al. 2012) e nei germogli l'AsA è presente soprattutto nella sua forma ridotta. I germogli di Soia verde, cresciuti a luce blu e bianca, presentano un maggior contenuto di AsA (Tab. 2). Un altro fattore importante per le sue funzioni biologiche e che condiziona la qualità dei germogli, è la lignina. Sia nella Soia gialla che nella Soia verde il minor contenuto di lignina si rileva in presenza di luce bianca (Tab. 1, 2). La maggior quantità di lignina al buio è da correlarsi ad un maggiore sviluppo della radichetta, dell'ipocotile e quindi dell'apparato di conduzione. La quantità degli zuccheri solubili e dell'amido determina l'indice glicemico degli alimenti. La Soia verde ha un contenuto di amido da 4 a 5 volte maggiore rispetto alla Soia gialla e anche la quantità di proteine solubili risulta maggiore nella Soia verde.

Tab. 1

Contenuto dei metaboliti in germogli di Soia gialla (*Glycine max* (L.) Merr). I valori indicano la media di 3 indipendenti esperimenti \pm ES.

	<i>Soia gialla</i>		
	<i>LUCE BIANCA</i>	<i>LUCE BLU</i>	<i>BUIO</i>
Peso secco (mg/g PF)	260 \pm 13	270 \pm 13,5	310 \pm 15,5
Antociani (Abs/g PF)	0,43 \pm 0,02	0,61 \pm 0,02	0,29 \pm 0,06
Chl totale (μ g/g PF)	327 \pm 20	333,68 \pm 25	3,1 \pm 0,19
Proteine totali (mg/g PF)	9,33 \pm 0,9	11,85 \pm 1	8,8 \pm 0,7
AsA totale (μ g/g PF)	258 \pm 12,3	284 \pm 6,5	179,7 \pm 5,4
Lignina (mg/g PS)	26 \pm 1,5	45 \pm 1,1	40 \pm 0,6
Zuccheri solubili (mg/g PF)	5,5 \pm 0,44	6,35 \pm 0,38	11,24 \pm 0,8
Amido (mg/g PF)	2,46 \pm 0,42	3,1 \pm 0,3	3,4 \pm 0,34

Tab. 2

Contenuto dei metaboliti in germogli di Soia verde (*Vigna mungo* (L.) Hepper). I valori indicano la media di 3 indipendenti esperimenti \pm ES.

	<i>Soia verde</i>		
	<i>LUCE BIANCA</i>	<i>LUCE BLU</i>	<i>BUIO</i>
Peso Secco (mg/g PF)	110 \pm 5,5	112 \pm 5,6	180 \pm 9
Antociani (Abs/g PF)	0,8 \pm 0,05	1,02 \pm 0,07	0,32 \pm 0,033
Chl totale (μ g/g PF)	150,35 \pm 12	192,55 \pm 9	23,8 \pm 3
Proteine totali (mg/g PF)	13,47 \pm 0,7	10,16 \pm 0,8	13,32 \pm 0,9
AsA totale (μ g/g PF)	398,4 \pm 7,5	451,86 \pm 5,5	267,9 \pm 6
Lignina (mg/g PS)	23,75 \pm 1,4	29,74 \pm 2	30,87 \pm 1,5
Zuccheri solubili (mg/g PF)	7,8 \pm 0,24	9,18 \pm 0,19	11,2 \pm 0,54
Amido (mg/g PF)	10,5 \pm 0,45	15 \pm 0,55	15,5 \pm 1

L'analisi del contenuto dei vari metaboliti ha messo in evidenza che la Soia verde ha un maggior contenuto di antociani, amido, proteine e acido ascorbico e che la luce blu può incrementare il contenuto di alcuni nutrienti.

Letteratura citata

- Ginter E (1989) Ascorbic acid in cholesterol metabolism and in detoxification of xenobiotic substances: problem of optimum vitamin C intake. *Nutrition* 5: 369-374.
- Jimenez A, Hernandez JA, Ros Barcelo Arr., Sandalio LM, Del Rio LA, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaf. *Physiologia Plantarum* 104: 689-692.
- Konczak I, Zhang W (2004) Anthocyanins – More than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5: 239-240.
- Lee SJ, Ahn JK, Khanh TD, Chun SC, Kim SL, Ro HM, Song HK, Chung IM (2007) Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrell) sprouts grown under two different light conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9415-21.
- Mastropasqua L, Borraccino G, Bianco L, Paciolla C (2012) Light qualities and dose influence ascorbate pool size in detached oat leaves. *Plant Science* 183: 57-64.
- No HK, Lee KS, Kim ID, Park MJ, Kim SD, Meyers SP (2003) Chitosan treatment affects yield, ascorbic acid content, and hardness of soybean sprouts. *Journal of Food Science* 68: 680-5.
- Xu MJ, Dong JF, Zhu MY (2005) Effects of germination conditions on ascorbic acid level and yield of soybean sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 943-947.
- Zielinski H, Frias J, Piskula MK, Kozłowska H (2005) Vitamin B1 and B2, dietary fiber and mineral content of cruciferae sprouts. *European Food Research and Technology* 221: 78-83.

AUTORI

Claudia Fumarola (fumarola.c@gmail.com), Nunzio Dipierro (nunzio.dipierro@uniba.it), Costantino Paciolla (costantino.paciolla@uniba.it), Linda Mastropasqua (linda.mastropasqua@uniba.it), Dipartimento di Biologia, Università di Bari "Aldo Moro", via Orabona 4, 70125 Bari

Autore di riferimento: Linda Mastropasqua
