



Università degli Studi  
di Roma "Tor Vergata"



REGIONE  
LAZIO

## PROGETTO PRAL 2003/04

IDENTIFICAZIONE, CARATTERIZZAZIONE NUTRIZIONALE ED EFFETTO  
PROTETTIVO SULLA SALUTE DELL'UOMO DI ECOTIPIDI LEGUMINOSE  
DI PARTICOLARE INTERESSE (FAGIOLO CANNELLINO, CICERCHIA,  
LENTICCHIA) COLTIVATI NEL LAZIO.

Acronimo: FA.CI.LE.

RESPONSABILE SCIENTIFICO  
Prof. ANTONELLA CANINI,  
DIPARTIMENTO BIOLOGIA  
UNIVERSITA' ROMA  
"TOR VERGATA"



**Unità Operative e Responsabili scientifici del Progetto PRAL**  
**(Programma Triennale di Ricerca Agricola, Agroambientale, Agroalimentare ed**  
**Agroindustriale della Regione Lazio) 2003/04**

**Unità Operativa 1.** Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata",  
Responsabile scientifico: Prof. Antonella Canini

**Unità Operativa 2.** Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"  
Responsabile scientifico: Dr. Paolo Di Nardo

**Unità Operativa 3.** Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN)  
Responsabile scientifico: Dr. Stefania Ruggeri

**Unità Operativa 4.** CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura  
Responsabile scientifico: Dr. Ignazio Verde

**Unità Operativa 5.** Dipartimento di Produzione Vegetale, Università degli Studi della Tuscia  
Responsabile scientifico: Dr. Olindo Temperini

**Progetto Finanziato dal Dipartimento Economico e Occupazionale,**  
**Direzione Regionale Agricoltura**  
**REGIONE LAZIO**

## **Presentazione del Progetto**

*Antonella Canini, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*

Il progetto denominato PRAL "FACILE" finanziato dalla Regione Lazio è stato attuato per due anni dall'Università di Roma "Tor Vergata in collaborazione con l'Università della Tuscia, l'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN) e il CRA – Centro di Ricerca per la Frutticoltura, nelle province di Frosinone e Latina attraverso un processo di recupero e valorizzazione di ecotipi autoctoni di leguminose e la conseguente creazione di una rete di agricoltori custodi del patrimonio recuperato. Le antiche varietà sono il frutto di selezione operata sia dall'uomo che dalla natura nel tempo ed evolute in ecotipi, che rivestono spesso un ruolo centrale nel paesaggio naturale locale, con caratteristiche genetiche tali da permettere alle piante di resistere e di adattarsi ai cambiamenti climatici.

Su tali ecotipi si è proceduto all'identificazione, alla caratterizzazione nutrizionale (composizione chimica, caratteristiche di elementi minerali, nutrizionali, antiossidanti, fattori antinutrizionali) e alla stima del valore potenziale per la salute dell'uomo in correlazione con le caratteristiche dei siti di coltivazione.

In dettaglio il progetto ha conseguito i seguenti risultati:

- a) incremento della produttività degli ecotipi nei rispettivi territori;
- b) caratterizzazione proteine di riserva in riferimento alle varie accessioni dei tre ecotipi;
- c) caratterizzazione nutrizionale (composizione chimica di base) con particolare rilievo allo studio di composti benefici per la salute (es. folati, amido, fibra, minerali);
- d) confronto delle proprietà dei tre diversi ecotipi cresciuti nei rispettivi suoli ciascuno con varietà commerciali;
- e) determinazione del contenuto di flavonoidi, antiossidanti e tannini;
- f) Localizzazione ultrastrutturale di proteine di riserva, carboidrati e fitina;
- g) Valutazione dei parametri tecnologici di preparazione alimentare ai fini della conservazione e utilizzazione del prodotto (es. cinetiche di idratazione, cottura, inscatolamento);
- h) Identificazione degli ecotipi mediante marcatori molecolari;
- i) Studio della variabilità esistente entro ecotipo per determinare le strutture genetiche dell'ecotipo stesso e stabilire le strategie più opportune per la conservazione ed utilizzazione;

- j) Analisi dell'effetto cardioprotettivo su linee cellulari cardiache al fine di poter contribuire alla terapia delle patologie cardiovascolari;
- k) Costituzione di una rete di agricoltori per il mantenimento e la conservazione “*in situ*” degli ecotipi ed “*ex situ*” attraverso la realizzazione di un padiglione dimostrativo permanente dell'Orto Botanico di Roma ‘Tor Vergata’ con “Leguminose alimentari del Lazio” contenente le specie esaminate.

Il presente progetto ha visto la partecipazione e il coinvolgimento dei Sindaci dei Comuni di Atina, Campodimele e Ventotene che hanno creduto nel progetto e che usufruiranno dei risultati ottenuti attraverso la valorizzazione e il turismo gastronomico. L'ampia variabilità riscontrata nella granella potrà costituire infatti un'opportunità per differenziare il prodotto da quello di massa al fine di soddisfare una più ampia platea di consumatori.

Il materiale selezionato sarà moltiplicato per poi essere distribuito agli agricoltori come materiale di base per la propagazione di linee fenotipicamente rispondenti all'ecotipo (definito sulla base della descrizione degli agricoltori stessi) di provenienza. Per tutte le linee selezionate e caratterizzate dalle varie unità operative il giudizio complessivo è da ritenersi estremamente positivo.

Il presente lavoro di ricerca rappresenta un punto di partenza ed un valido aiuto per tutti coloro che siano interessati alla conservazione ed alla valorizzazione del germoplasma di fagiolo, lenticchia e cicerchia. Per quanto riguarda il fagiolo è stata accertata la variabilità esistente tra le popolazioni laziali autoctone, informazione utile per eventuali programmi di miglioramento genetico delle varietà coltivate, ed è stata verificata la possibilità che ecotipi d'*elite*, quali il cannellino di Atina, possano essere tipizzati geneticamente al fine ultimo di recuperarne e mantenerne il germoplasma originario attraverso l'attribuzione di eventuali marchi di tipicità.

Per quanto riguarda la cicerchia, le analisi molecolari hanno messo in evidenza il ristretto grado di variabilità genetica esistente tra tutti gli ecotipi analizzati. Dallo studio delle componenti nutrizionali è emerso che le cicerchie sono caratterizzate da contenuti particolarmente elevati in fibra, minerali e folati e quindi sarebbe necessario un ulteriore approfondimento sulle proprietà nutrizionali di questo legume ancora poco oggetto di studio e conosciuto.

La linea LTE Ventotene è risultata estremamente valida in quanto oltre ad attestarsi sugli stessi livelli produttivi della cv Eston è risultata possedere le tipiche caratteristiche dell'ecotipo di provenienza.



# Potenzialità produttiva di linee di fagiolo a sviluppo determinato da granella secca selezionate nel Lazio

O. Temperini\*, S. De Santis\*, F. Rossini\*, G. Colla\*, F. Saccardo\*, M.T. Costanza\*\*, R. Rea\*\*.

\*) Università degli Studi della Tuscia, via S. Camillo De Lellis., Viterbo, e-mail: [temperini@unitus.it](mailto:temperini@unitus.it); \*\*) ARSIAL – Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione dell’Agricoltura del Lazio. Via R. Lanciani 37, Roma.

## Riassunto

Nel 2007, è stata condotta una prova di confronto varietale in fagiolo, al fine di valutare la produttività in granella secca di alcune linee selezionate all’interno di popolazioni rappresentanti alcuni ecotipi di fagiolo coltivati nel Lazio. La maggior parte delle linee si sono caratterizzate per ottimi livelli produttivi e per un *habitus* vegetativo (altezza del primo legume e delle piante) che ben si adatta alla raccolta meccanica integrale del prodotto.

L’ampia variabilità riscontrata nella granella (colore, forma, ecc.) potrà costituire un’opportunità per differenziare il prodotto da quello di massa al fine di soddisfare una più ampia platea di consumatori.

**Parole chiave:** fagiolo, ecotipi, produzione, granella secca, Lazio

## Introduzione.

Come risposta alla perdita di biodiversità, alla globalizzazione del mercato e alla standardizzazione delle produzioni agricole, si sta sempre più affermando la necessità di riscoprire, salvaguardare e, soprattutto, valorizzare le caratteristiche produttive, nutrizionali, salutistiche, e organolettiche dei numerosi ecotipi presenti nel nostro Paese.

Per tali motivi, la Facoltà di Agraria di Viterbo, in collaborazione con l’Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione dell’Agricoltura del Lazio, è impegnata da oltre un decennio in attività di recupero, selezione, caratterizzazione e di messa a punto della tecnica agronomica per numerosi ecotipi di specie ortive (sedano, carciofo, peperone, finocchio da grumolo, pomodoro da mensa, zucca da zucchini, aglio e fagiolo) presenti nella regione Lazio (Temperini *et al.*, 2002 e Temperini, 2004).



**Figura 1** – Semi di fagiolo di forma e colore differente.

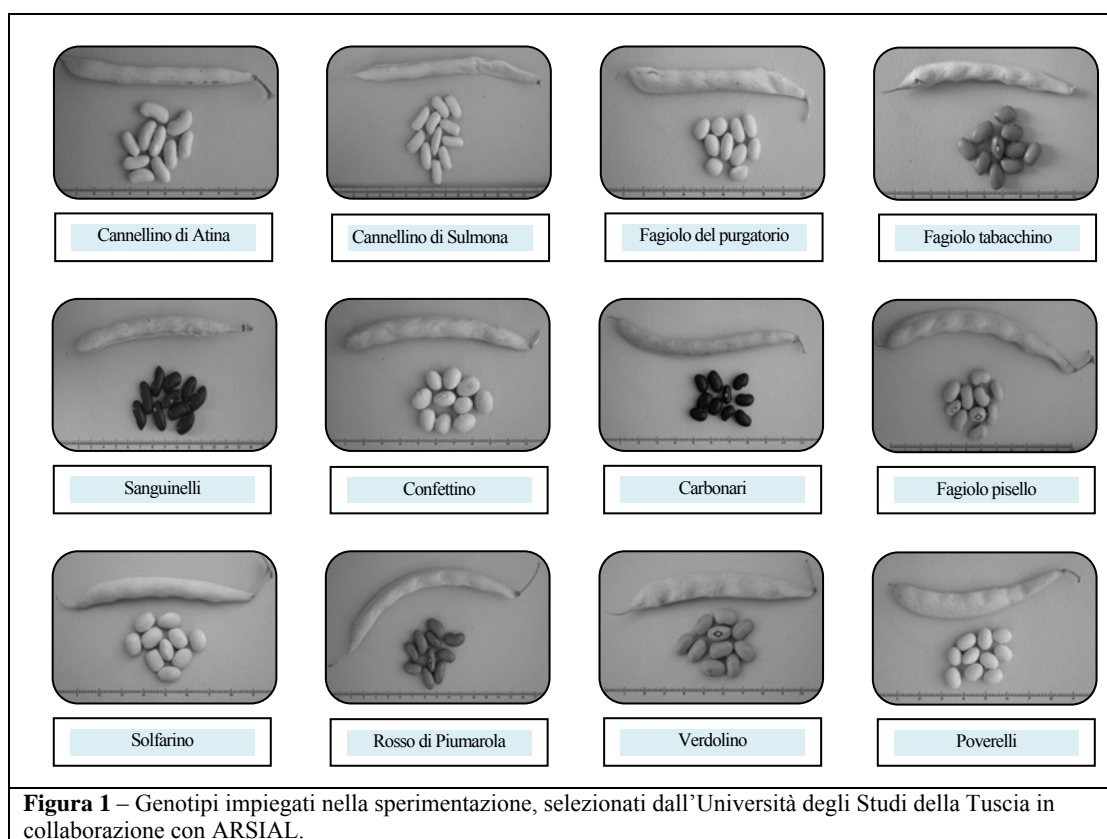
Tale attività ha permesso di selezionare linee stabili in fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) a sviluppo determinato per la produzione di granella secca, in popolazioni rappresentanti ecotipi coltivati nelle province di Viterbo, Frosinone e Rieti (De Santis, 2007). Le linee selezionate sono state denominate mantenendo il nome dell'ecotipo di provenienza seguito dalla sigla TA (Tuscia, ARSIAL) per indicare le istituzioni che hanno collaborato nel lavoro di selezione.

### Materiali e metodi

Nel 2007, è stata condotta una prova di confronto varietale al fine di valutare la produttività di 12 linee di fagiolo, selezionate all'interno di popolazioni rappresentanti altrettanti ecotipi di fagiolo coltivati nel Lazio per la produzione di granella secca (fig.1). La sperimentazione è avvenuta presso l'azienda agraria della Facoltà di Agraria di Viterbo ed è stata articolata in 12 tesi distribuite secondo lo schema sperimentale a blocco randomizzato con tre repliche. Ciascuna parcella elementare era lunga 3 m e larga 2,1 m. È stata adottata una densità colturale di 35,7 piante m<sup>-2</sup>, ottenuta disponendo i semi alla distanza di 8 cm lungo la fila e 35 cm tra le file.

La semina è avvenuta l'11 giugno ed è stata preceduta dalla distribuzione di fosfato biammonico per complessive 45 kg ha<sup>-1</sup> di N e 115 di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Le esigenze idriche della coltura sono state soddisfatte attraverso un sistema di irrigazione localizzato a goccia. Il contenimento delle infestanti è stato effettuato attraverso ripetuti interventi di scerbatura manuale.



Sotto l'aspetto fitopatologico, durante l'intera fase vegetativa è stata riscontrata la sola presenza di ragnetto rosso che è stato agevolmente controllato intervenendo due volte (18 luglio e 10 agosto) con un prodotto a base di acrinatrina.

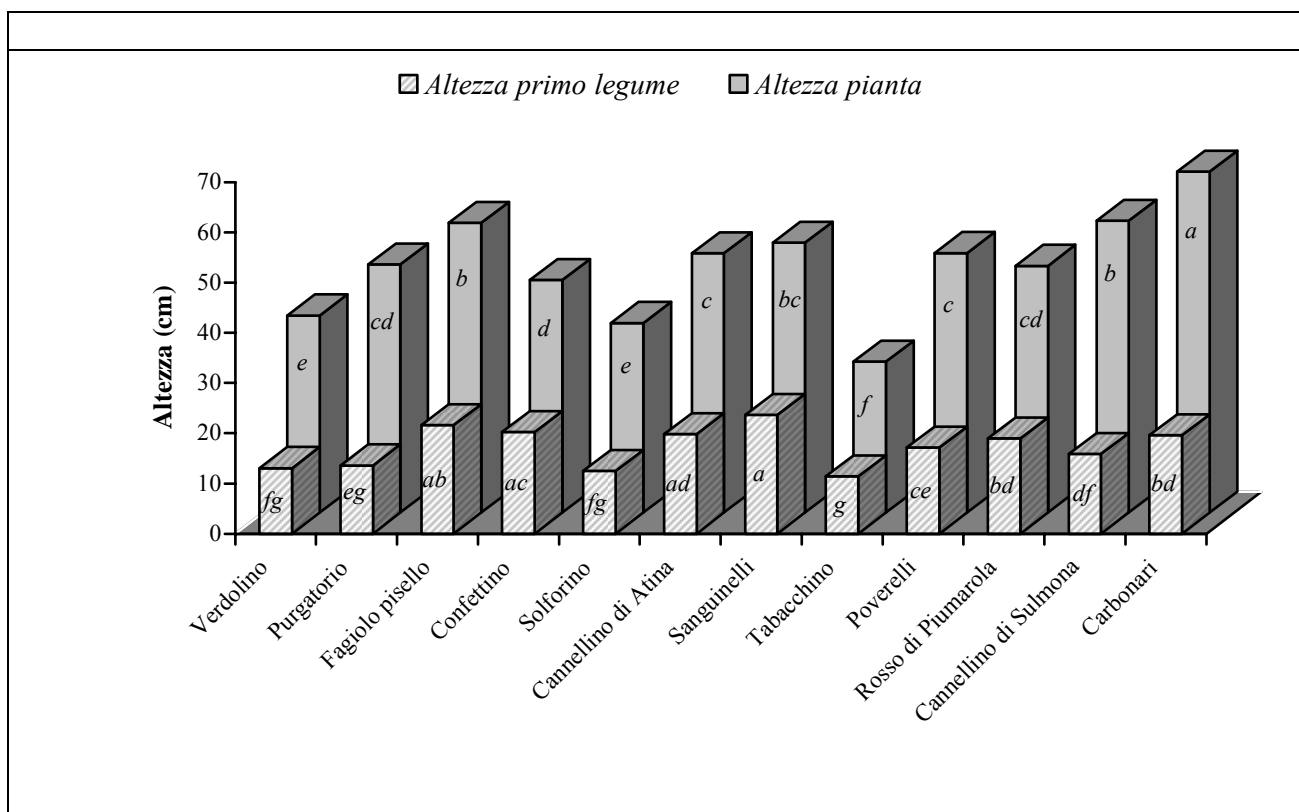
Nel corso della prova sono stati eseguiti rilievi che hanno riguardato alcuni parametri morfo-fisiologici (colore del fiore, epoca di fioritura, forma, altezza del primo baccello, ecc.) e produttivi (peso medio dei semi, resa unitaria, ecc.).

La raccolta è avvenuta quando il 90% dei legumi aveva raggiunto la completa maturazione: le piante sono state estirpate, legate in mazzi e quindi trasferite in un tunnel per ultimare l'essiccazione del prodotto. In seguito, dopo aver completato il rilevamento dei dati previsti per la pianta intera, i legumi sono stati separati manualmente dalle piante e quindi sgranati.

### Risultati e discussione

La maggior parte delle linee sono caratterizzate da un *habitus* vegetativo (altezza del primo legume e altezza delle piante) che ben si adatta alla raccolta meccanica integrale del prodotto. Infatti, per tutte le linee l'altezza del punto di inserzione del primo legume è risultato superiore a 11 cm e l'altezza delle piante contenuta (inferiore a 70 cm).

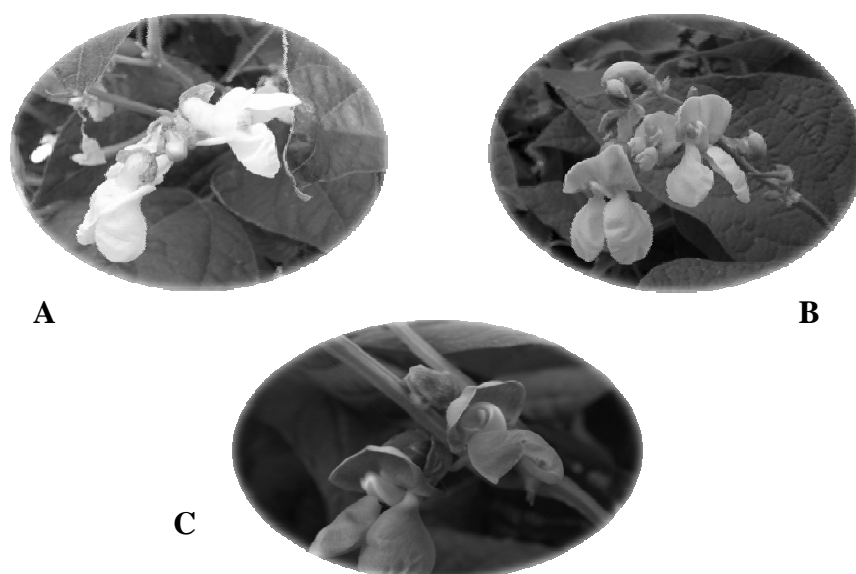
Il portamento delle piante è risultato eretto o semi-eretto ad eccezione del fagiolo tabacchino TA e del Verdolino TA che hanno evidenziato un portamento semi-prostrato.



**Figura 1** - Altezza del primo legume e della pianta delle linee (TA) in prova (lettere diverse indicano valori che differiscono tra loro per  $P \leq 0,05$  secondo il test di Duncan).

Le dimensioni delle foglie sono state minime in termini di lunghezza nella linea Fagiolo del Purgatorio TA ( $8,70 \pm 0,83$  cm) e massime in Fagiolo Tabacchino TA ( $12,14 \pm 0,87$  cm); invece, la larghezza è risultata minima nella linea Poverelli TA ( $6,03 \pm 0,36$  cm) e massima nel Cannellino di Sulmona TA ( $9,38 \pm 0,59$  cm).

Il colore dei fiori (fig. 2) è risultato bianco con sfumature rosa per la linea Sanguinelli TA, rosa per le linee Rosso di Piumarola TA e Fagiolo pisello TA, viola per la linea Carbonari TA e bianco per tutte le altre linee (tab. 1).



**Figura 2** – Fiori di colore bianco (A), rosa (B) e viola (C).

**Tabella 1** - Caratteristiche descrittive delle linee (TA) e relativi areali di coltivazione degli ecotipi di provenienza.

Linee (TA)	Colore fiore	Foglia		Portamento della pianta	Aree di coltivazione
		Lunghezza (cm)	Larghezza (cm)		
Fagiolo del Purgatorio	Bianco	8,70 ± 0,83	7,40 ± 0,55	Semi-eretto	Viterbese
Fagiolo Tabacchino	Bianco	12,14 ± 0,87	8,82 ± 0,93	Semi-prostrato	Viterbese
Solfarino	Bianco	9,75 ± 0,86	6,58 ± 0,72	Eretto	Viterbese
Verdolino	Bianco	9,46 ± 1,05	7,58 ± 0,37	Semi-prostrato	Viterbese
Cannellino di Atina	Bianco	11,62 ± 0,72	8,50 ± 0,53	Eretto	Frusinate
Cannellino di Sulmona	Bianco	11,35 ± 0,56	9,38 ± 0,59	Eretto	Frusinate
Confettino	Bianco	11,15 ± 0,59	8,27 ± 0,46	Semi-eretto	Frusinate
Rosso di Piumarola	Rosa	11,00 ± 1,43	9,05 ± 1,02	Semi-eretto	Frusinate
Carbonari	Viola	10,99 ± 1,14	7,84 ± 0,63	Eretto	Reatino
Fagiolo pisello	Rosa	10,77 ± 0,56	8,23 ± 0,44	Semi-eretto	Reatino
Poverelli	Bianco	9,35 ± 0,59	6,03 ± 0,36	Semi-eretto	Reatino
Sanguinelli	Bianco striato rosa	11,23 ± 0,49	7,40 ± 0,40	Semi-eretto	Reatino

*A lettere differenti corrispondono valori diversi per  $P \leq 0,05$  (test di Duncan)*

Il colore del seme (tab. 2) è variato notevolmente passando dal bianco sino al nero così come la forma che è risultata da rotonda ad allungata.

**Tabella 2** – Parametri morfologici e biometrici dei semi

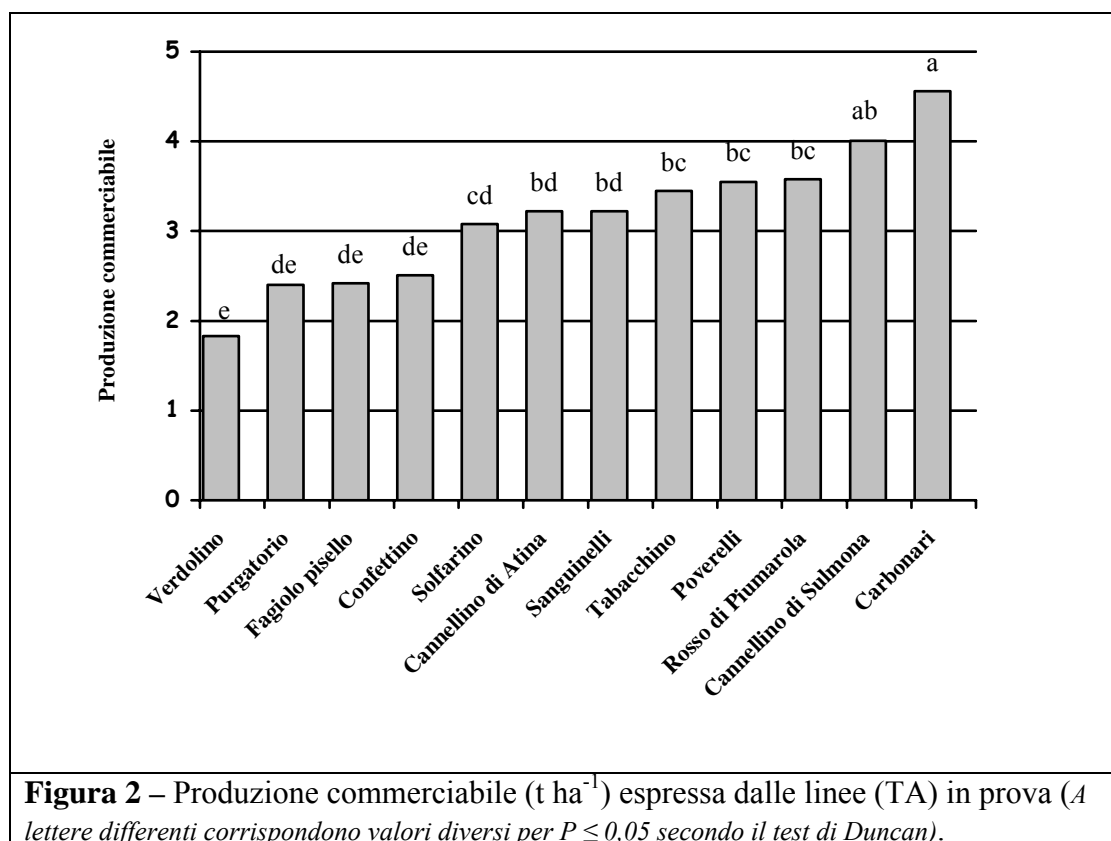
Linee (TA)	Lunghezza		Larghezza		Peso medio		Colore	Forma
	(mm)		(mm)		(g)			
Fagiolo de Purgatorio	7,69	f	5,24	df	0,20	e	Bianco	Rotonda
Fagiolo Tabacchino	11,33	d	5,57	de	0,41	c	Giallo-arancione	Allungata-troncata
Solfarino	10,04	e	5,65	de	0,29	d	Giallo-verdastro	Allungata-troncata
Verdolino	10,98	d	6,35	c	0,41	c	Verdastro	Ovale
Cannellino di Atina	13,38	b	5,49	df	0,45	bc	Bianco	Reniforme
Cannellino di Sulmona	14,95	b	5,82	cd	0,51	a	Bianco	Cubica
Confettino	11,20	d	7,84	a	0,48	ab	Bianco	Rotonda
Rosso di Piumarola	14,05	b	5,77	cd	0,44	bc	Marrone chiaro	Reniforme



Carbonari	9,32	e	4,88	f	0,20	e	Nero	Ovale
Fagiolo pisello	10,98	d	7,00	b	0,47	ab	Giallo-verdastro	Ovale
Poverelli	7,74	f	5,03	ef	0,19	e	Bianco	Rotonda
Sanguinelli	16,18	a	5,62	de	0,51	a	Rosso scuro	Reniforme

*A lettere differenti corrispondono valori diversi per  $P \leq 0,05$  (test di Duncan)*

La linea Sanguinelli TA si è distinta per la maggiore lunghezza dei semi e, unitamente alle linee Cannellino di Sulmona TA, Confettino TA e Fagiolo pisello TA anche per il maggior peso medio. La linea Confettino TA si è distinta, inoltre, per la maggior larghezza del seme (7,74 mm) e con “Fagiolo pisello TA”, “Cannellino di Atina TA”, “Rosso di Piumarola TA”, “Cannellino di Sulmona TA” e “Fagiolo tabacchino TA”, anche per il basso numero di semi per legume (2,82). La produttività delle linee, opportunamente rapportata alla superficie di un ettaro tenendo conto delle densità colturali rilevate al momento della raccolta, si è attestata su ottimi livelli (3,15 t ha<sup>-1</sup>), paragonabili a quelli espressi dalle migliori cultivar commerciali (Ranalli *et al.*, 2001); tale risposta è probabilmente da associare al favorevole andamento stagionale che ha accompagnato la coltura per tutto il periodo di coltivazione unitamente all’impiego dell’irrigazione localizzata a goccia, rispetto a quella a pioggia o a scorrimento praticata nel Lazio dai coltivatori di questa leguminosa, e al controllo delle infestanti effettuato con sistematici interventi manuali per tutto il ciclo colturale (Marzi, 2001.).



Sulla base delle produzioni fornite dalle diverse linee (Fig. 2), possiamo riunire i genotipi in quattro gruppi: al primo posto della scala di merito vi appartengono le linee Carbonari TA (4,57 t ha<sup>-1</sup>) e Cannellino di Sulmona TA (4,01 t ha<sup>-1</sup>); al secondo le linee Rosso di Piumarola TA (3,58 t ha<sup>-1</sup>), Poverelli TA (3,55 t ha<sup>-1</sup>) e Tabacchino TA (3,45 t ha<sup>-1</sup>). Le linee Verdolino TA (1,83 t ha<sup>-1</sup>), Fagiolo del Purgatorio TA (2,40 t ha<sup>-1</sup>), Fagiolo Pisello TA (2,42 t ha<sup>-1</sup>) e Confettino TA (2,51 t ha<sup>-1</sup>) sono risultate le meno produttive. Tutte gli altri genotipi hanno mostrato valori intermedi tra il secondo e il quarto gruppo.

## Conclusioni

L'elevata differenza riscontrata nelle linee in prova in termine di colore, dimensioni, e forma del seme, offre una grande opportunità per differenziare le produzioni locali da quelle di massa e quindi raggiungere una vasta platea di consumatori con possibili ripercussioni positive anche sul prezzo del prodotto. Particolare interesse potrebbe manifestarsi anche da parte della ristorazione non solo per una maggiore scelta nell'abbinamento con altri cibi in cucina ma, soprattutto, per realizzare i numerosi piatti tipici locali a base di fagioli.

La maggior parte delle linee hanno presentato un habitus vegetativo (altezza dei primo legume superiore agli 11 cm e altezza delle piante contenuta) che ben si adatta alla raccolta meccanica integrale del prodotto.

Le linee in prova oltre a risultare interessanti per le rese unitarie in granella secca, hanno evidenziato anche una ottima uniformità sia in termini di sviluppo delle piante che di colore, forma e peso della granella; pertanto, il materiale selezionato sarà moltiplicato per poi essere distribuito agli agricoltori come materiale di base per la propagazione di linee fenotipicamente rispondenti all'ecotipo (definito sulla base della descrizione degli agricoltori stessi) di provenienza.

Tenuto conto non solo della risposta agronomica ma anche dell'unicità della granella secca (forma, colore, peso medio, dimensioni, ecc.) prodotta dalle singole linee, il giudizio complessivo è da ritenersi positivo per tutte le linee selezionate.

## Bibliografia

De Santis S., 2007. Valutazione morfo-fisiologica e produttiva di ecotipi di fagiolo del Lazio. Tesi di Laurea in Scienze e Tecnologie Agraria, Università degli Studi della Tuscia, a.a. 2006-2007.

Marzi V., 2001. Itinerari tecnici per il recupero di aree marginali, in "Leguminose e agricoltura sostenibile, Specie da granella e cover crops". Bologna, Edizioni Calderini edagricole.

Ranalli P., Parisi B., Soressi G.P., Habashy A.A., Santangelo E., 2001. Fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.), in "Leguminose e agricoltura sostenibile, Specie da granella e cover crops". Bologna, Edizioni Calderini edagricole.

Temperini O., 2002. Recupero e valorizzazione di ecotipi di specie ortive nel Lazio. Atti convegno SOI "Sedano da coste", 11-26

Temperini O., Mariotti R., Minischetti P., Saccardo F., Graifenberg A., 2004. Confronto varietale su 5 cultivar di Carciofo Romanesco nel Lazio. Supplemento a L'Informatore Agrario n. 52: 25-27

**\* Il lavoro è in corso di pubblicazione su Italus Hortus.**

# Caratteristiche vegeto-produttive di linee di lenticchia selezionate nel centro-Italia

F. Rossini\*, O. Temperini\*, P. Crinò\*\*, R. Mariotti\*\*\*, A. Temperini, F. Saccardo\*

\*) Università degli Studi della Tuscia, via S. Camillo De Lellis., Viterbo, e-mail:

[temperini@unitus.it](mailto:temperini@unitus.it); \*\*) ENEA C.R. Casaccia - Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e

Protezione della Salute, Roma; \*\*\*) ARSIAL – Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione dell’Agricoltura del Lazio, Roma.

## Riassunto

La sperimentazione ha riguardato la caratterizzazione vegeto-produttiva di tre linee di lenticchia: LTE Castelluccio, Onano e Ventotene, selezionate da ecotipi locali coltivati nel centro-Italia. Allo scopo le suddette linee sono state poste a confronto con la cultivar Eston (testimone) e le migliori 5 selezioni (LTE 1,2,3,4 e 5) valutate nel 2006.

Le linee Ventotene e Onano si sono distinte per l’epoca di raccolta che è risultata rispettivamente la più precoce e la più tardiva. La linea Ventotene ha fornito produzioni equiparabili alla cultivar di riferimento mentre le linee Onano e Castelluccio si sono attestate su livelli statisticamente inferiori.

**Parole chiave:** lenticchia, ecotipi, produzione, miglioramento genetico, biodiversità

## Introduzione

La lenticchia (*Lens esculenta* Moench), rappresenta una delle leguminose più importanti e diffuse nel mondo per l’alimentazione umana. Nel 2006 la produzione mondiale è stata di circa 3,5 milioni di tonnellate di cui ben il 65% ottenuto nei Paesi asiatici, dove ha interessato una superficie di 2.759.869 ha (Fonte FAO). Il successo di questa leguminosa è essenzialmente da ricercare nell’alto valore biologico e nell’elevata conservabilità dei suoi semi. Come per la maggior parte delle produzioni agricole, anche la lenticchia ha risentito dell’effetto “globalizzazione del mercato”; infatti, attualmente la cultivar Eston, di importazione canadese, è quella maggiormente presente sulle mense degli italiani. Lo scopo principale del presente lavoro è stato quello di valutare alcune caratteristiche morfo-bio-agronomiche di linee stabili e produttive, rispondenti all’ecotipo originario descritto dagli agricoltori. Tali linee, sono state selezionate all’interno di popolazioni che costituiscono alcuni ecotipi di lenticchia del centro Italia; ecotipi che, pur presentando caratteristiche agronomiche di pregio (Piergiovanni, 2000; Fiocchetti *et al.*, 2005), sono coltivati quasi esclusivamente in aree marginali per lo più di collina e di montagna.

## Materiali e metodi

La sperimentazione si è svolta nel 2007, presso il Centro Appenninico del Terminillo dell'Università di Perugia, in collaborazione con ARSIAL. Sono state valutate tre linee di ecotipi: LTE Castelluccio, LTE Onano e LTE Ventotene e le migliori 5 selezioni (LTE 1, 2, 3, 4 e 5) valutate nel corso del 2006 presso l'Azienda Didattico-Sperimentale dell'Università della Tuscia, a confronto con la cultivar Eston (testimone).



**Figura 1** – Genotipi impiegati nella sperimentazione

La semina è stata effettuata il 12 marzo con una dose di semina di 150 semi germinabili m<sup>-2</sup>. La raccolta è avvenuta il 7 agosto, quando le piante erano giunte a completa maturazione (fig. 2) mediante mietitrebbia parcellare (fig. 3).



**Figura 2** – Panoramica del campo sperimentale al momento della raccolta

Su ogni linea sono stati effettuati i seguenti rilievi: altezza pianta, altezza primo legume, numero dei baccelli pieni, numero dei semi per pianta, peso medio del seme e angolo di inserzione delle ramificazioni principali.



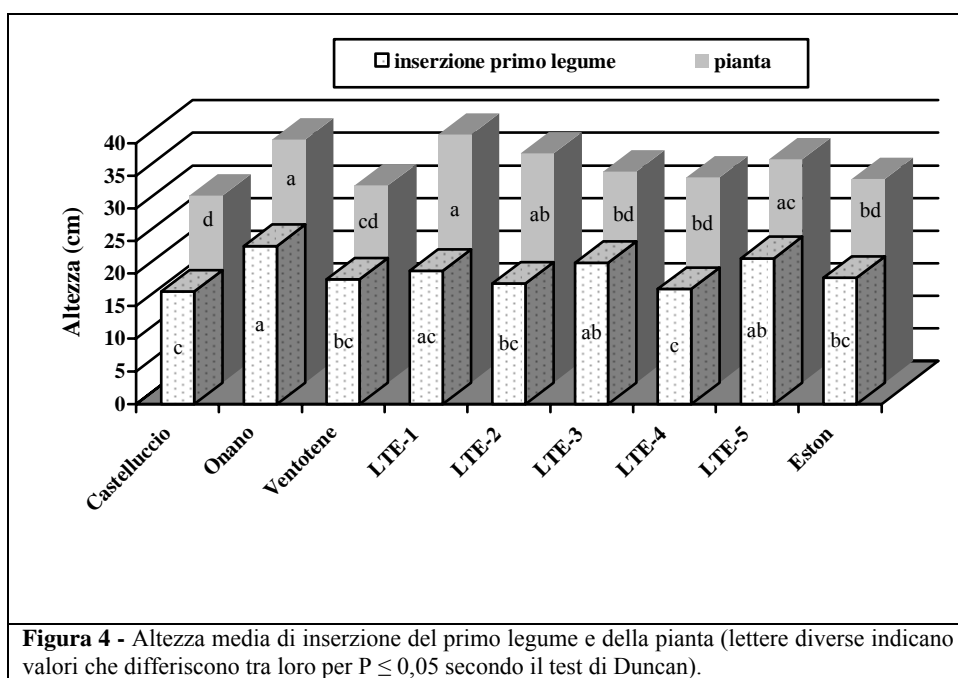
**Figura 3** – Raccolta meccanica con mietitrebbia parcellare



Inoltre, per ogni linea è stato determinato il colore esterno dei semi, il colore dei cotiledoni e misurato il diametro del seme. I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi della varianza.

## Risultati e discussione

Le linee in prova hanno mostrato caratteristiche morfo-fenologiche nettamente distinte. In particolare per quanto riguarda la lunghezza del ciclo colturale, la linea LTE Ventotene è risultata la più precoce con una durata degli intervalli emergenza-fioritura di 60 giorni e fioritura-maturazione di 50 giorni. mentre LTE Onano è stata la più tardiva essendo risultati tali intervalli rispettivamente di 65 e 52 giorni. Anche la taglia della pianta ed il portamento hanno caratterizzato significativamente le singole linee. In figura 4 dove sono riportate le altezze della pianta e del primo legume si osserva che le linee LTE Onano, e LTE 1 hanno raggiunto una taglia maggiore alla cv Eston; per tutte le rimanenti linee non sono state notate differenze statisticamente significative dalla cultivar di riferimento.



L'altezza del primo legume è risultata fortemente correlata con l'altezza della pianta secondo la seguente equazione:  $\text{altezza primo legume} = 0,81 \times \text{altezza pianta} + 5,64$ ,  $r^2=0,95^{**}$  per tutte le linee tranne che per LTE 1, 2 e 4, per le quali è stato osservato un minore coefficiente angolare. In queste ultime tre linee, la produzione è risultata distribuita su uno strato del manto vegetale (46%), maggiore rispetto a quello degli altri genotipi (36%).

Relativamente al portamento, la linea LTE Ventotene si è distinta per l'angolo di inserzione delle ramificazioni primarie particolarmente alto ( $25,0 \pm 2,1$ ) che ha determinato un portamento

particolarmente eretto e superiore a tutti gli altri genotipi, seguita dalle linee LTE 1, LTE 2, LTE 4, che hanno mantenuto un portamento semi-eretto. La cv Eston e la linea LTE 5, pur non mostrando un portamento prostrato, a fine ciclo sono risultate particolarmente sensibile all'allettamento.

La produzione media dei genotipi in prova è stata di 2,04 t ha<sup>-1</sup>, risultando così lievemente inferiore alle produzioni attese, in virtù della tardiva epoca di semina e di un andamento climatico particolarmente sfavorevole (alte temperature durante la fase di fioritura e scarse precipitazioni per l'intero ciclo colturale). Come emerge dalla tab. 1, le Linee LTE Onano, LTE Castelluccio, LTE 1 e LTE 5 hanno fornito una produzione inferiore alla cv Eston, mentre le linee LTE Ventotene e LTE 3 si sono attestate sugli stessi valori. Produzioni maggiori della cultivar di riferimento sono stati riscontrati, invece, nelle linee LTE 2 e LTE 4. La produzione di seme è risultata fortemente correlata con l'Harvest Index ( $r^2=0,80$ ), che è risultato variabile da 31,34% per la linea LTE 1 a 51,79% della linea LTE 2.

<b>Tabella 1 - Produzione di seme e sue componenti.</b>				
<b>Linee</b>	<b>N. legumi per pianta</b>	<b>N. semi per legume</b>	<b>Harvest index (%)</b>	<b>Produzione (t ha<sup>-1</sup>)</b>
<b>LTE Castelluccio</b>	30,33 c	1,37 a	37,32 c	1,386 c
<b>LTE Onano</b>	20,21 d	1,09 c	35,14 c	1,507 c
<b>LTE Ventotene</b>	28,13 c	1,31 a	43,92 b	2,096 b
<b>LTE 1</b>	27,31 c	1,29 a	31,34 d	1,369 c
<b>LTE 2</b>	36,14 b	1,11 c	51,79 a	2,945 a
<b>LTE 3</b>	22,11 d	0,82 d	37,47 c	2,252 b
<b>LTE 4</b>	47,20 a	1,18 b	50,05 a	3,119 a
<b>LTE 5</b>	28,16 c	1,20 b	35,08 c	1,386 c
<b>Eston</b>	37,17 b	1,21 b	38,17 c	2,304 b
I valori in colonna non aventi lettere in comune sono significativamente diversi per P = 0,05 secondo il test di Duncan.				

Il numero di legumi per pianta, componente di rilievo nella determinazione della produzione, ha fatto rilevare differenze significative tra le linee in prova variando in un range abbastanza ampio da un minimo di 20,21 per la LTE Onano ad un massimo di 47,2 per la LTE 4. Meno ampie ma comunque significative sono state le differenze emerse tra il numero di semi per legume rilevate nelle differenti linee, che è risultato più basso nelle linee macrosperma (LTE Onano, LTE 2 e LTE 3).

Le linee in prova si sono distinte anche per le caratteristiche del seme riportate in tabella 2. Il peso medio della granella secca è risultato maggiore nelle linee LTE 3, LTE Onano e LTE 2 e minore

per le linee LTE Castelluccio e LTE 1. Tale parametro è risultato negativamente correlato con il numero di semi per legume ( $r^2=0,91^{**}$ ) e non direttamente correlato con le potenzialità produttive delle linee in prova. Per queste linee non sembra confermata la superiorità produttiva delle cv macrosperma a cotiledoni verdi-gialli rispetto a quelle microsperma a cotiledoni arancioni (Tullu *et al.*, 2000).

**Tabella 2** - Caratteristiche morfologiche del seme.

Linee	Peso medio del seme (mg)	Diametro del seme (mm)	Colore cotiledoni	Colore epidermide
<b>LTE Castelluccio</b>	23,1 d	4,28 de	verde chiaro	variabile
<b>LTE Onano</b>	48,2 b	5,98 b	verde chiaro	verde chiaro
<b>LTE Ventotene</b>	30,3 c	4,38 de	arancione	marrone-grigio
<b>LTE 1</b>	23,1 d	3,96 e	arancione	marrone grigio
<b>LTE 2</b>	42,1 b	4,68 cd	arancione	marrone chiaro
<b>LTE 3</b>	69,3 a	6,56 a	verde chiaro	verde chiaro
<b>LTE 4</b>	32,1 c	4,20 e	arancione	marrone chiaro
<b>LTE 5</b>	28,4 cd	4,70 cd	verde chiaro	verde chiaro
<b>Eston</b>	27,2 cd	4,92 c	verde chiaro	verde chiaro

I valori in colonna non aventi lettere in comune sono significativamente diversi per  $P = 0,05$  secondo il test di Duncan.

Differenze significative sono state rilevate anche per quanto riguarda il diametro e la pigmentazione del seme, caratteri questi che condizionano fortemente la scelta del consumatore. In base a tali parametri possiamo dividere le linee in:

- macrosperme a superficie chiara (LTE Onano e LTE 3) o scura (LTE 2);
- microsperme a superficie verde chiara (Eston e LTE 5), marrone chiara (LTE 4) o scura (LTE Ventotene e LTE 1);
- microsperme a superficie di colore variabile (LTE Castelluccio).

L'estrema variabilità della colorazione della superficie del seme riscontrata nella linea LTE Castelluccio è determinata dalla presenza di più genotipi che costituiscono, così come nell'ecotipo originario, la linea selezionata.

## Conclusioni

La possibilità di rilancio della coltivazione della lenticchia in Italia è legata alla tipicizzazione del prodotto che distinguendosi da quello estero può occupare delle nicchie di mercato con un prezzo di vendita molto superiore a quello di importazione (Tallarico *et al.*, 2002). A ciò è legata la riscoperta degli ecotipi locali che nei secoli si sono caratterizzati per alcune peculiarità e sono entrati nella

tradizione e nella cultura di alcuni areali del nostro Paese. Chiaramente questi ecotipi per avere le potenzialità necessarie alla loro diffusione devono garantire oltre ad adeguate caratteristiche produttive anche l'attitudine alla meccanizzazione e la resistenza-tolleranza alle principali fitopatie. In particolare l'habitus eretto e una elevata resistenza all'allettamento sono sicuramente caratteristiche di estremo interesse per le nuove varietà. Le prime indicazioni della valutazione agronomica dei genotipi in prova hanno evidenziato le buone performance delle linee LTE 2 e LTE 4 che oltre ad essere molto produttive presentano caratteristiche del seme apprezzate sul mercato. La linea LTE Ventotene è risultata estremamente valida in quanto oltre ad attestarsi sugli stessi livelli produttivi della cv Eston è risultata possedere le tipiche caratteristiche dell'ecotipo di provenienza. I genotipi LTE Onano, LTE 1, LTE 2 e LTE 5 sono risultati i più adatti alla raccolta meccanica in virtù della maggiore altezza della pianta e del livello di inserzione del primo baccello.

## **Bibliografia**

Faostat: <http://faostat.fao.org> (06\11\2007)

Fiocchetti F., Roselli M., Lucretti S., De Mastro G., Saccardo F., Crinò P., 2005. *Recovery and characterization of typical Italian lentils*. In Proceedings of the XLIX Italian Society of Agricultural Genetics, Potenza, 12-15 September.

Piergiovanni A.R., 2003. The evolution of lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivation in Italy and its effects on the survival of autochthonous population. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47: 305-314.

Tallarico R., Ghiselli L., Pardini A., 2002. *Contributo agli aggiornamenti agrotecnici della lenticchia (*Lens esculenta* Moench.) in Toscana*. *Agricoltura e Ricerca*, 188: 23-30.

Tullu A., Kusmenoglu I., MeePhee K.E., Muehlbauer F.J., 2000. *Characterization of core collection of lentil germplasm for phenology, morphology, seed and straw yields*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 143-152.

**\* Il lavoro è in corso di pubblicazione su Italus Hortus.**

## **Caratterizzazione vegeto-produttiva di ecotipi e linee di cicerchia.**

*O. Temperini\**, *F. Rossini\**, *L. Parrano\**, *A. Temperini\**, *F. Saccardo\**, *R. Mariotti\*\**

*\*) Università degli Studi della Tuscia, via S. Camillo De Lellis., Viterbo, e-mail: [temperini@unitus.it](mailto:temperini@unitus.it); \*\*\*) ARSIAL – Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione dell’Agricoltura del Lazio, Roma.*

### **Riassunto**

Nella primavera-estate del 2007, in località Campodimele, sono state condotte delle prove sperimentali al fine di contribuire al rilancio della coltivazione della cicerchia in tale comprensorio. In particolare è stata effettuata una prova agronomica che ha visto il confronto di due accessioni dell’ecotipo “Cicerchia di Campodimele” con alcune linee selezionate dall’Università degli Studi della Tuscia in collaborazione con l’ENEA. Contestualmente è stata eseguita una prova di concimazione per valutare l’effetto del fosforo e potassio sulle potenzialità produttive della coltura.

**Parole chiave:** cicerchia, ecotipi, concimazione, Lazio.

### **Introduzione.**

La sperimentazione realizzata presso l’azienda agricola “Capirchio Fioravante”, sita nel comune di Campodimele provincia di Latina ed ha previsto 2 prove:

- confronto varietale, per caratterizzare sotto il profilo agronomico e morfologico due ecotipi di cicerchia coltivati nel comprensorio di Campodimele;
- fertilizzazione, per valutare l’effetto dell’apporto di fosforo e potassio sulla produttività della cicerchia nelle condizioni pedoclimatiche di Campodimele.

### **Materiali e metodi**

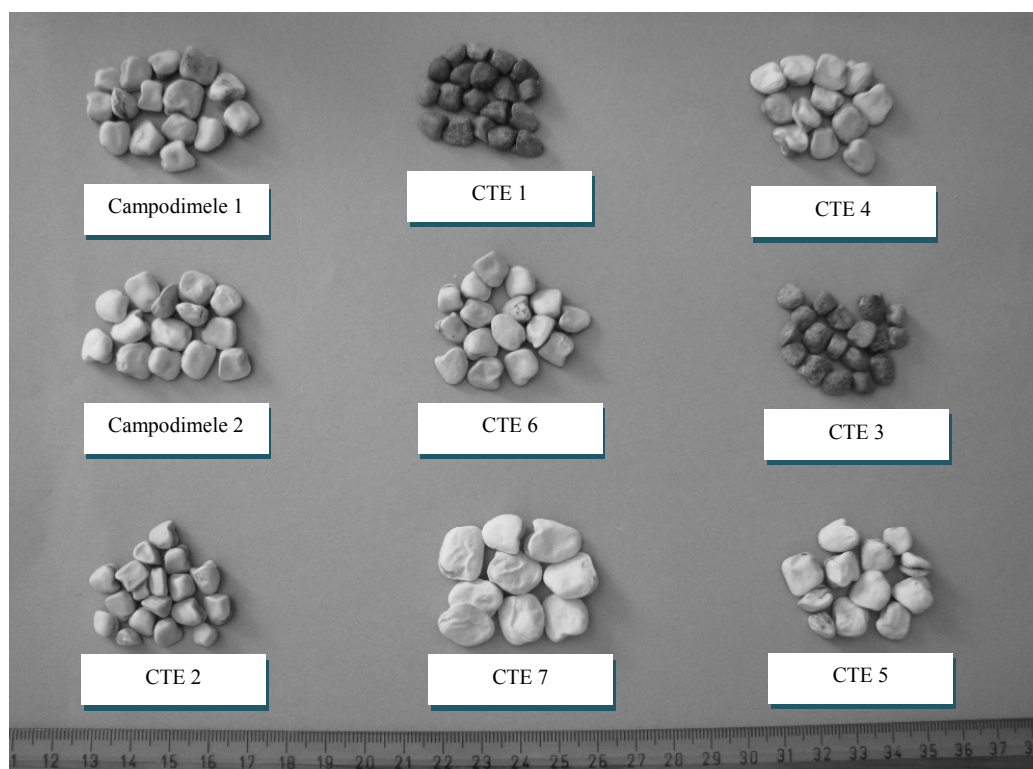
#### *Confronto varietale*

Il confronto varietale è stato condotto in asciutto utilizzando la tecnica colturale ordinariamente utilizzata nell’areale di coltivazione. Questa prevede la preparazione del terreno per la semina con un’aratura seguita da erpicature e l’apporto di 54 kg ha<sup>-1</sup> di azoto sotto forma di nitrato ammonico. La sperimentazione è stata impostata secondo uno schema sperimentale a blocco randomizzato con tre ripetizioni (*Fig. 1*) ed ha permesso il confronto di due accessioni di cicerchia, provenienti da altrettanti agricoltori e denominate Campodimele 1 (Azienda Dibrotto Romilda) e Campodimele 2 (Azienda Capirchio Fioravante), e sette linee selezionate dall’Università degli Studi della Tuscia in collaborazione con l’ENEA: CTE 1, CTE 2, CT4, CTE 3, CTE 5, CTE 6, CTE 7 (*Fig.2*).





**Figura 1** – Panoramica dei campi sperimentali



**Figura 2** – Accessioni e Linee di cicerchia impiegate nella sperimentazione

Complessivamente sono state realizzate 27 parcelle elementari delle dimensioni di 15 m<sup>2</sup> (5,00 x 3,00 m). La semina è stata effettuata il 29 marzo 2007, adottando una densità culturale di 60 piante m<sup>-2</sup> ottenuta disponendo 8-10 semi in postarelle, distanti 30 cm sulla fila e 50 cm tra le file. L'area di saggio, su cui sono stati prelevati i campioni da analizzare ed effettuati i rilievi di campo, presentava una superficie di 2 m<sup>2</sup>.

In copertura non è stata effettuata alcuna concimazione ed il controllo delle infestanti è avvenuto mediante scerbatura manuale.

Per caratterizzare morfologicamente le accessioni e le linee alla raccolta sono stati effettuati una serie di rilievi sulle piante prelevate dall'area di saggio (15 piante a parcella, per un totale di 45 piante valutate per cultivar). La raccolta è stata effettuata meccanicamente il 02 agosto 2007

L'essiccamento dei campioni è avvenuto in stufa a ventilazione forzata, mantenendo la temperatura a 70 °C sino al raggiungimento del peso costante (mediamente 72 ore).

Successivamente i dati rilevati sono stati sottoposti all'analisi della varianza, impiegando il programma di statistica SPSS.

### *Fertilizzazione minerale*

La prova di fertilizzazione ha previsto il confronto tra tre modalità di concimazione utilizzando l'accessione Campodimele 2 seminata il 29 marzo 2007. Le modalità di concimazioni messe a confronto sono state:

**A** apporto di 54 kg ha<sup>-1</sup> di azoto in presemina (concimazione ordinariamente utilizzata dagli agricoltori della zona;

**B** apporto di 54 kg ha<sup>-1</sup> di azoto e 138 kg ha<sup>-1</sup> di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>;

**C** apporto di 54 kg ha<sup>-1</sup> di azoto, 138 kg ha<sup>-1</sup> di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 50 kg ha<sup>-1</sup> di K<sub>2</sub>O.

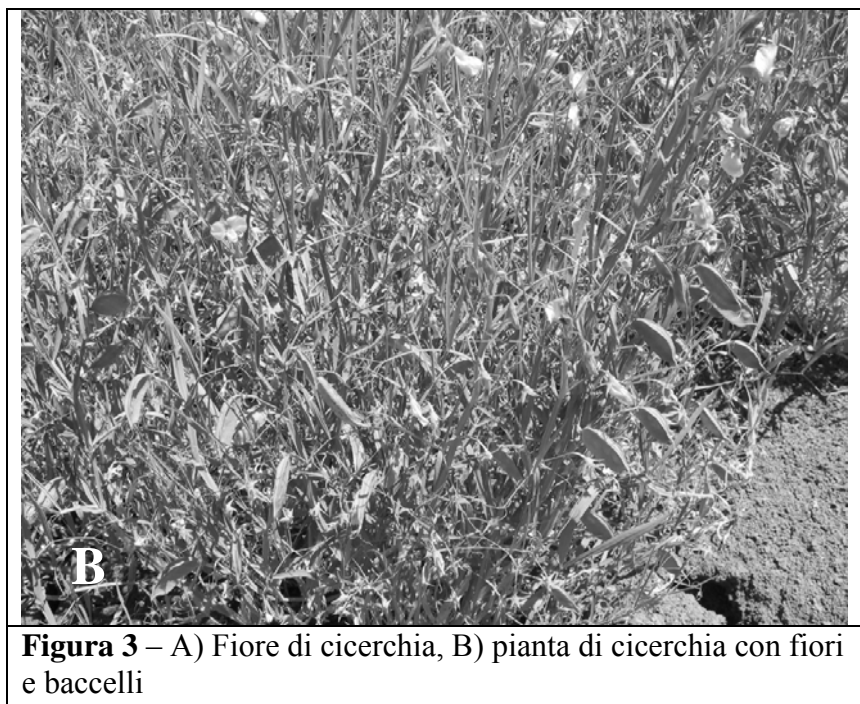
La prova ha previsto 9 parcella dalle dimensioni di 40 m<sup>2</sup> (4,00 x 10,00 m) disposte secondo lo schema sperimentale a blocco randomizzato con tre repliche. La preparazione del terreno per la semina, la modalità di impianto, la densità colturale, l'area di saggio ed i parametri rilevati sono stati gli stessi della prova precedente.

## **Risultati e discussione**

### *Confronto varietale*

Le accessioni in prova non si sono differenziate da punto di vista del portamento e delle dimensioni della pianta mostrando un'altezza media della pianta intorno agli 81 cm e un'altezza del primo legume di 25 cm.





Tutte le parcelle alla raccolta si presentavano con piante allettate, ma, data la sufficiente altezza da terra del primo legume, non hanno generato problemi di raccolta.

Le linee in prova hanno dimostrato una buona potenzialità produttiva e una ampia differenziazione delle tipologie della granella prodotta sia per quanto riguarda le dimensioni sia relativamente alla colorazione del seme. Dalla Tabella 1 emerge infatti l'elevata produttività di alcune linee CT4, CTE7, CTE6 la cui produzione ha superato le 2,5 t ha<sup>-1</sup> e il suo scarso legame con il peso medio del seme, che insieme al colore riveste particolare importanza per la sua caratterizzazione merceologica. Altro aspetto di estremo interesse, è la percentuale di semi attaccati dal tonchio. Questo carattere è risultato fortemente dipendente dalla varietà con percentuali variabili dal 8%.

**Tabella 1.** Produzione di granella e sue caratteristiche

<b>Accessione</b>	<b>Produzione di granella (t ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Peso medio del seme (g)</b>	<b>Colore del seme</b>	<b>Semi tonchiati (%)</b>
<b>Campodimele 1</b>	1,96 ad	0,21 c	Avana scuro	14,83 b
<b>Campodimele 2</b>	1,53 cd	0,17 ce	Avana medio	30,64 a
<b>CTE 1</b>	1,88 bd	0,18 cd	Marrone scuro	27,50 a
<b>CTE 2</b>	1,10 d	0,15 de	Avana scuro	15,97 ab
<b>CTE 3</b>	2,08 ad	0,14 e	Marrone scuro	8,12 b
<b>CT 4</b>	3,31a	0,26 b	Avana medio	19,78 ab
<b>CTE 5</b>	2,17 ad	0,26 b	Avana chiaro	23,29 ab
<b>CTE 6</b>	2,60 ac	0,16 de	Avana medio	20,13 ab
<b>CTE 7</b>	3,25 ab	0,30 a	Avana chiaro	10,85 b

Le medie seguite da lettere uguali non differiscono significativamente per P<0.05 al 30% .

### **Fertilizzazione chimica**

L'apporto di fosforo (trattamento B e C), come del resto abbastanza prevedibile, ha determinato una forte influenza sulla coltura determinando oltre che una aumento dello sviluppo vegetativo (altezza) anche una maggiore fertilità della pianta (n. legumi per pianta), che ha determinato una elevata produttività di granella. Dalla tabella 2 emerge infatti come per tutti i caratteri presentati gli

incrementi significativi si siano verificati solo con l'aggiunta di fosforo alla concimazione tradizionale solo azotata. All'incremento della taglia della pianta non è corrisposto un significativo aumento dell'altezza del primo legume, che in media è stata di 24,4 cm, né una diminuzione del grado di allettamento della coltura al momento della raccolta. Rilevante è da considerarsi, anche, l'incremento dell'Harvest index, che è variato dal 30% al 50%.

Di nessun rilievo è apparsa l'aggiunta di potassio dovuta probabilmente alla buona dotazione dei terreni in cui è stata svolta la prova (>150 ppm).

**Tabella 2.** Caratteristiche morfo-produttive della pianta.

<i>Trattamento</i>	<i>Altezza pianta (cm)</i>	<i>Legumi pianta<sup>-1</sup> (n)</i>	<i>Semi pianta<sup>-1</sup> (n.)</i>	<i>Produzione di granella (t ha<sup>-1</sup>)</i>
<b>A</b>	78,33 b	85,00 b	14,53 b	1,76 b
<b>B</b>	90,33 a	120,33 a	21,47 a	2,54 a
<b>C</b>	82,00 b	111,0 ab	18,80 a	2,28 a

Le medie seguite da lettere uguali non differiscono significativamente per  $P < 0.05$

### **Conclusioni.**

I risultati delle prove hanno evidenziato le buone potenzialità produttive della cicerchia nel comprensorio di Campodimele. Le accessioni e le linee provate hanno dimostrato una buona differenziazione delle caratteristiche merceologiche della granella prodotta. L'aggiunta di fosforo alla concimazione tradizionale, solo azotata, consente un netto miglioramento della produttività della coltura. La diffusione della coltivazione di questa leguminosa è senz'altro legata oltre all'ottimizzazione della tecnica colturale, anche ad una caratterizzazione delle caratteristiche morfo-organolettiche della granella, al basso contenuto di ODAP e ad un efficiente controllo del tonchio.

### **Bibliografia**

Casarini B., 2001. Difesa da avversità biotiche e abiotiche, in "Leguminose e agricoltura sostenibile, Specie da granella e cover crops". Bologna, Edizioni Calderini edagricole.

Avola G., Barbera A., Frenza A.S., Trapani P., 2001. Valutazione di varietà di lenticchia e cicerchia. L'Informatore Agrario n. 39: 67-75

Abate V., 2001 – Rilanciamo le leguminose da granella secca. L'Informatore Agrario n. 39: 61-64

Regione Lazio, Assessorato all'Agricoltura - Area A - Servizio 1, 2003. I prodotti tipici del Lazio. Lazio informazione, Supplemento al n. 23: 36-37.

## Caratterizzazione di ecotipi di leguminose

Daniela Alesiani, Raffaella Perazzini, Lorena Canuti, Donatella Leonardi and Antonella Canini,

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica snc, 00133 Roma [canini@uniroma2.it](mailto:canini@uniroma2.it)

### 1. Introduzione

#### 1.1. Le caratteristiche organolettiche e nutrizionali

L'uso dei legumi come alimento di base risale a più di 20.000 anni fa: notizie sulla coltivazione, preparazione e consumo dei legumi sono presenti nell'Iliade di Omero e persino nell'Antico Testamento. I legumi fanno parte della tradizione gastronomica italiana e nell'Italia contadina, fino agli anni Cinquanta, sono stati un elemento predominante dell'alimentazione giornaliera: le specie più diffuse nel nostro paese e di maggior uso alimentare sono *Phaseolus vulgaris* L., il fagiolo; *Cicer arietinum* L., il cece; *Lens culinaris* M., la lenticchia; *Pisum sativus* L., il pisello e *Vicia faba* L., la fava..

Per quanto riguarda la composizione chimica dei legumi, i carboidrati costituiscono il 66% del loro peso secco e sono rappresentati da amido, pectina e cellulosa (quest'ultima soprattutto nel pericarpo). Le proteine e i lipidi sono presenti con una percentuale, rispettivamente, del 23% e del 3%; nella frazione degli oligoelementi, ci sono sali minerali (fosforo, ferro e calcio) e vitamine (B1, B2, niacina e C) con una percentuale del 4% (Sathe *et al.*, 1984). I legumi freschi, ma soprattutto secchi, sono ottime fonti di proteine: infatti, quelli secchi ne contengono una quantità all'incirca pari, o anche superiore, a quella della carne (anche se la qualità è inferiore) e doppia rispetto a quella dei cereali (Rochfort & Panozzo, 2007). Sebbene di origine vegetale, le proteine dei legumi apportano alcuni aminoacidi essenziali (come lisina, treonina, valina e triptofano) in discreta quantità, superiore a quella delle proteine dei cereali, del frumento, del mais e del riso che invece contengono buone dosi di aminoacidi solforati, scarsi nei legumi. Quindi l'associazione di cereali o loro derivati (pane, pasta, riso, ecc.) con i semi di leguminose garantisce all'organismo un apporto proteico il cui valore biologico è paragonabile a quello delle proteine animali (Rochfort & Panozzo, 2007).



## 1.2 Distribuzione geografica dei legumi

Con più di 650 generi e 18000 specie, le Fabaceae rappresentano la terza famiglia più vasta di piante superiori (Young *et al.*, 2003). Nell'ultimo secolo, in particolare dopo la seconda guerra mondiale, si è realizzata una profonda trasformazione dei sistemi agricoli, sempre più orientati verso modelli intensivi basati sulla coltivazione di un esiguo numero di varietà che garantissero la maggiore resa (ICNCP, International Code for Nomenclature for Cultivated Plants). Tutto ciò ha portato al processo conosciuto come erosione genetica, cioè la perdita di singoli geni, combinazioni geniche o ecotipi localmente adattati di piante o animali (Hobohm, 2000). È stato calcolato, tra gli anni '50 e gli anni '80, il tasso di erosione genetica annuale di diverse colture nel nostro paese: i legumi presentano quello più basso, con un tasso totale annuale medio per tutte le specie studiate pari a 3,79% (Hammer & Laghetti, 2005). Attualmente, le zone agricole si caratterizzano per un'agricoltura di tipo intensivo ad elevata meccanizzazione e solo nelle valli interne a ridosso degli Appennini sono ancora presenti forme di agricoltura tradizionale. L'elevata variabilità orografica del territorio ha creato in queste zone interne una varietà di microclimi, in cui è stata possibile la selezione di numerosi agroecotipi appartenenti a varie specie.

## 1.3 Proprietà dei legumi

I legumi sono composti da carboidrati per il 58.0-74.4%, da proteine per il 17.5-28.7%, da fibre per il 3-5%, da oligoelementi per il 2.9-4.5%, mentre i grassi sono inferiori al 5% del peso secco (Sathe *et al.*, 1984). Nella piramide alimentare, i legumi vengono inclusi nel secondo gruppo di alimenti che dovrebbero essere consumati giornalmente insieme a frutta e verdura, subito al di sopra dei cereali. La valenza nutrizionale delle leguminose è legata alla loro capacità di accumulare nei semi una elevata quantità di proteine, distinte in proteine metaboliche e di riserva. Le prime sono responsabili delle normali attività cellulari e comprendono sia proteine enzimatiche che strutturali. Le seconde, sintetizzate durante lo sviluppo del seme, costituiscono una fonte di azoto e di carbonio per la germinazione. Quest'ultime si trovano all'interno della cellula sotto forma di corpi proteici, strutture opache agli elettroni del diametro variabile di 2-22 $\mu$  circondate da una membrana lipoproteica (Sgarbieri, 1989). La classificazione delle proteine di riserva, ancora maggiormente seguita e usata per tutte le leguminose, si basa sulla diversa solubilità delle varie frazioni (Osborne, 1924) e distingue quattro diversi gruppi: le globuline, le albumine, le gluteline e le prolamine. Le globuline sono le proteine di riserva maggiormente diffuse (circa il 60%), sono solubili in soluzioni saline (Templeman *et al.*, 1987) e vengono distinte in funzione del coefficiente di sedimentazione in 11S e 7S (Wright, 1987). Le albumine rappresentano un gruppo eterogeneo di proteine globulari e

sono circa il 30% delle proteine di riserva; sono solubili in acqua a pH neutro o debolmente acido, inizialmente definite come gruppo sulla base del loro coefficiente di sedimentazione pari a 2S (Youle & Huang, 1981). Le gluteline e le prolamine rappresentano la frazione proteica minore delle proteine totali dei semi dei legumi; il loro contenuto è variabile, possono essere presenti in tracce o arrivare al 2-4% (Padhye & Salunkhe, 1979). Le prime sono solubili in soluzioni basiche o acide mentre le seconde in miscele di alcol e acqua.

Circa il 50% dei carboidrati presenti nei legumi è costituito dall'amido, un polisaccaride formato da due tipi di polimeri del glucosio, l'amilosio e l'amilopectina. L'amido costituisce un prodotto di riserva, si trova negli amiloplasti cellulari sotto forma di granuli liberi la cui forma e dimensioni sono spesso caratteristici della varietà o dello stadio di sviluppo della pianta. In letteratura vengono riportate varie descrizioni morfologiche dei granuli: tondeggianti, reniformi, ellissoidali, irregolari e con dimensioni comprese tra 5 e 60  $\mu\text{m}$  (Asp *et al.*, 1992).

Gli altri carboidrati, sia polisaccaridi che oligosaccaridi, diversi dall'amido vengono classificati come fibra (Englyst *et al.*, 1995), e hanno la caratteristica di raggiungere il colon senza essere assorbiti nel tratto superiore dell'intestino. La fibra alimentare, in base alla solubilità in acqua dei suoi componenti, viene distinta in fibra solubile e fibra insolubile (Guillon & Champ, 2002).

I semi dei legumi contengono un numero di composti antinutrizionali (ANCs) di natura proteica, quali gli inibitori delle idrolasi e lectine, e di natura non proteica. Il loro effetto antinutrizionale consiste nell'inibizione di vari enzimi digestivi tra cui la tripsina, la chimotripsina e l'amilasi. La presenza di ANCs è spesso il risultato di un adattamento evolutivo che consente alla pianta di sopravvivere e di completare il suo ciclo di vita in condizioni naturali. Infatti, a causa delle loro proprietà antinutrizionali o addirittura tossiche, alcuni composti dei semi hanno dimostrato di svolgere un ruolo di protezione contro insetti, funghi, predatori e condizioni di stress. Tuttavia, il loro effetto si manifesta solo se i semi o la farina sono consumati crudi poiché la cottura, inattiva queste proteine, denaturandole (Duranti, 2006).

I legumi sono noti non solo per le loro proprietà nutritive, ma anche per quelle nutraceutiche. Il termine nutraceutico venne coniato nel 1979, da Stephen De Felice, presidente della Fondazione per l'Innovazione in Medicina (FIM, New York) come risultato della fusione di due aggettivi, nutriente e farmaceutico. Egli definì nutraceutici "tutti quei cibi o parti delle sostanze alimentari che si ritiene abbiano dei benefici sulla salute, inclusi la prevenzione e il trattamento delle malattie". Le leguminose, in generale, non vengono considerate come agenti terapeutici nella medicina tradizionale; le uniche informazioni a riguardo si riferiscono a specie locali dell'India e della Cina (Duranti, 2006). Comunque, nella regione mediterranea varie specie di legumi vengono consumate da secoli e costituiscono un elemento importante del regime alimentare; la dieta mediterranea è

considerata il fattore principale che determina i più bassi tassi di malattie cardiovascolari e le più alte aspettative di vita al mondo (Leterme, 2002). Per ridurre il rischio di queste malattie, è importante il consumo costante di acidi grassi insaturi che mantengano bassi i livelli di colesterolo nel sangue; di fibre, che rallentano lo sviluppo dell'aterogenesi in modelli animali; e di molecole antiossidanti, come i metaboliti secondari presenti in tutti i tessuti vegetali. Inoltre, i legumi vengano considerati un cibo essenziale per la prevenzione del cancro; ci sono prove sostanziali che cambiamenti nella dieta possano contare per circa un terzo nella variazione dell'incidenza mondiale di cancro e che regimi alimentari basati su cibi di origine vegetale sono associati a un ridotto rischio di cancro. Diversi studi sono stati effettuati nell'ambito della chemoprevenzione: ad esempio, trattando ratti F344 con un potente carcinogenico per indurre tumore al colon e nutrendoli con *Phaseolus vulgaris*, è stato ottenuto come risultato un numero significativamente minore di animali con tumore del colon e ridotta molteplicità del tumore (Hughes, 1997).

Tra le molecole antiossidanti presenti nei vegetali ci sono i metaboliti secondari, coinvolti nella sopravvivenza e nella propagazione della pianta che li produce. Molti di essi agiscono come un segnale chimico che permette alla pianta di rispondere agli attacchi dell'ambiente; altri agiscono come sostanze di difesa contro gli erbivori, i patogeni e i competitori. Inoltre, vi sono metaboliti che forniscono protezione alla pianta contro le radiazioni solari e, infine, altri che la aiutano nella dispersione del polline e dei semi. Vi sono tre classi principali di composti secondari presenti nelle piante: gli alcaloidi, i terpenoidi e i composti fenolici. Il gruppo dei fenoli comprende una ampia gamma di composti, caratterizzati da un gruppo ossidrilico legato ad un anello aromatico. Essi sono presenti in quasi tutte le piante e si possono accumulare in ogni loro parte (radici, fusti, foglie, fiori frutti e semi). I composti fenolici comprendono i flavonoidi, i tannini, le lignine e l'acido salicilico (Raven, 2002): i flavonoidi rappresentano il gruppo di fenoli più comune e ampiamente distribuito nelle piante (Harborne, 1990). Essi si formano dagli amminoacidi fenilalanina e tirosina (Pietta, 2000); la struttura base è il flavone, composto da 15 atomi di carbonio disposti in 3 anelli. I flavonoidi agiscono nelle piante come antiossidanti, antimicrobici, fotorecettori e attrattori visivi. Molti studi hanno suggerito che essi hanno attività biologiche tra cui antiallergeniche, antivirali, antinfiammatorie e vasodilatatrici. Tuttavia, la maggior parte dell'interesse è stata dedicata alla loro attività antiossidante, dovuta alla capacità di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Xu and Chang, 2007), contribuendo quindi a ridurre la formazione dei radicali liberi, contrastandone l'attività.

In questo lavoro di caratterizzazione chimica e morfologica, abbiamo scelto semi di varietà delle specie *Phaseolus vulgaris* L., *Lathyrus sativus* L. e *Lens culinaris* Medik. diffuse nella regione Lazio. Queste varietà rappresentano agroecotipi che ormai stanno scomparendo a causa

dell'incessante estendersi delle colture di varietà commerciali, nella maggior parte dei casi derivate da popolazioni alloctone, anche estere. La coltivazione di questi ecotipi è relegata ad aree marginali del territorio e viene effettuata principalmente da agricoltori anziani, che si sono tramandati i semi di generazione in generazione e che non garantiscono una continuità negli anni a venire. Questo potrebbe causare una irrimediabile perdita di *pool genici* estremamente adattati alle locali condizioni, fondamentali nel caso in cui bruschi cambiamenti ambientali possano ledere le cultivar commerciali. Inoltre, queste varietà stanno suscitando un interesse crescente in aziende agricole che hanno come obiettivo la produzione di qualità riservate ad un mercato 'di nicchia', ad un pubblico disposto ad una spesa maggiore pur di consumare un alimento con una filiera di produzione garantita e coltivato secondo le tecniche dell'agricoltura biologica. Fino ad oggi su queste varietà non è stato effettuato nessuno studio di caratterizzazione chimica, delle proprietà nutrizionali o organolettiche. In quest'ambito risiede lo scopo di questo lavoro, mirato a: 1) quantificare e confrontare il contenuto proteico totale ed analizzare i differenti pattern proteici delle principali proteine di riserva presenti nei semi delle varietà selezionate; 2) caratterizzare morfologicamente, attraverso microscopio elettronico a scansione, la struttura dei granuli di amido per evidenziare eventuali differenze relative ai differenti ecotipi; 3) identificare e quantificare, attraverso analisi HPLC-UV-VIS, i metaboliti secondari presenti negli estratti dei semi.

La caratterizzazione, sia del valore nutrizionale che nutraceutico, di varietà a rischio di erosione genetica può mettere in luce la necessità di adottare specifiche strategie di tutela e conservazione della agrobiodiversità (Legge Regionale n. 15 del 2000 e DM 5/3/2001), nonché evidenziare possibili effetti benefici sulla salute derivanti dal loro consumo. Questo potrebbe portare ad una valorizzazione in ambito commerciale ed essere alla base per un riconoscimento europeo attraverso specifici marchi di origine e qualità.

## **2. Materiali e metodi**

### **2.1. Semi di legumi**

In questo studio sono stati considerati semi secchi appartenente a otto diverse varietà di *Phaseolus vulgaris* L. tipiche della regione Lazio: fagioli cannellini di Atina, fagioli del purgatorio, fagioli cocco, fagioli ciavattoni, fagioli solfarini, fagioli verdolini, fagioli gialli e fagioli regina; ed alcuni ecotipi di *Lathyrus sativus* L. e *Lens culinaris* Medik. tipici della Regione Lazio. Per la specie *L. sativus*, abbiamo scelto quattro diverse accessioni dell'ecotipo Campodimele, mentre per *L. culinaris* è stata scelta un'accessione per l'ecotipo Onano e una per quello Ventotene. I campioni sono

pervenuti all'Università di Tor Vergata a partire dal mese di marzo del 2007 fino a ottobre 2008.

## **2.2 Analisi del profilo elettroforetico**

### **2.2.1 Purificazione di albumine e globuline**

I campioni sono stati privati del tegumento ed omogenati; per ogni campione, 2 grammi della farina così ottenuta sono stati mescolati a 20 ml di esano e lasciati in agitazione *overnight* per eliminare i grassi presenti. Sono stati quindi effettuati 2 lavaggi da 20 minuti ciascuno utilizzando 20 ml di dietil-etero; alla fine, il solvente è stato rimosso e i campioni sono stati essiccati a temperatura ambiente. Quindi, ogni campione è stato risospeso in 20 ml di tampone borato pH 7.6 e lasciato in agitazione per 2 ore a 4°C; gli estratti sono stati poi centrifugati per 30 min a 30000 rpm con ultracentrifuga (BECKMAN L7) ed il surnatante è stato recuperato. Questo è stato dializzato, utilizzando cassette per dialisi (Pierce, Illinois), per 3 giorni a 4°C in tampone Na-acetato 0.033 M pH 5 per far sedimentare le globuline. I sedimenti sono stati poi lavati con il tampone di dialisi, risospesi in ddH<sub>2</sub>O ed essiccati a freddo. I surnatanti, contenenti le albumine, sono stati dializzati *overnight* in ddH<sub>2</sub>O a 4°C ed essiccati a freddo.

### **2.2.2 Purificazione della faseolina**

L'estrazione della faseolina è stata effettuata secondo il metodo di Sathe (2002). I fagioli secchi sono stati privati del tegumento e quindi omogenati; quindi, a 3 grammi di farina è stata aggiunta una soluzione 0.5 M di cloruro di sodio in 0.025 N di acido cloridrico in rapporto 1:20, lasciando in agitazione per 2 ore. La faseolina è poi precipitata attraverso diluizioni successive di ddH<sub>2</sub>O a 4°C di un volume pari a 5-10 volte il volume della soluzione proteica. Il precipitato è stato recuperato, disciolto in una soluzione 0.5 M di cloruro di sodio e dializzato *overnight*; l'estratto finale è stato quindi essiccato a 4°C.

### **2.2.3 Purificazione di prolamine e gluteline**

I campioni sono stati privati del tegumento ed omogenati; la farina è stata quindi setacciata per eliminare le parti più grossolane. Per ogni campione, 2 grammi di farina sono stati mescolati a 20 ml di esano e lasciati in agitazione *overnight*. Il giorno successivo sono stati effettuati 2 lavaggi da 20 minuti ciascuno utilizzando per ognuno 20 ml di dietil-etero. Quindi, il solvente è stato rimosso e i campioni sono stati essiccati a temperatura ambiente per almeno 1 ora.

Le prolamine sono state estratte a 4° C con una soluzione al 70% di etanolo; le gluteline sono state estratte a 4° C con una soluzione allo 0,2% di idrossido di sodio.



#### **2.2.4 SDS-PAGE**

Dopo aver dosato la quantità di proteine presenti nei vari estratti secondo il metodo descritto da Bradford (1976), aliquote contenenti 20 µg di proteine per ciascun estratto proteico sono state diluite nel rapporto 1:2 con il tampone di corsa, il Laemmli Sample Buffer (Biorad) con 2-mercaptoetanololo (rapporto 20:1), quindi bollite a 100° C per 4 minuti. Una soluzione contenente markers molecolari (Prestained SDS-PAGE Standards, Biorad) a peso noto (miosina 192,775 KDa, β-galattosidasi 117,905 KDa, BSA 99,261 KDa, ovalbumina 54,145 KDa, anidraasi carbonica 37,783 KDa, inibitore della tripsina 29,460 KDa, lisozima 20,198 KDa, aprotinina 7,441 KDa) è stata usata come riferimento. La separazione elettroforetica è stata ottenuta usando un gel di acrilammide al 12,5% in condizioni denaturanti con un dispositivo minigel BioRad. Le proteine separate sono state quindi colorate con Comassie Brilliant Blu.

### **2.3 Analisi dei metaboliti secondari**

#### **2.3.1 Estrazione dei metaboliti secondari**

I semi dei legumi sono stati ridotti in polvere attraverso un omogenizzatore. Successivamente, 3g di farina sono stati estratti per 2 ore e in agitazione con 30 ml di una soluzione di acetone al 70% contenente acido cloridrico (0.9%). E' stato recuperato il supernatante e ripetuta l'operazione per altre due volte. Il supernatante ottenuto con questa procedura di estrazione è stato filtrato e concentrato attraverso un evaporatore rotante (Büchi rotavapor EL130) per eliminare il solvente in eccesso. Inoltre, i semi di *Lathyrus sativus* e *Lens culinaris* sono stati sottoposti al processo di cottura, secondo la seguente procedura: sono stati lasciati per 24 ore in acqua tiepida e poi bolliti per 30 minuti alla temperatura di 100-150°C. Al termine della cottura sono stati eseguiti i protocolli di estrazione dei metaboliti secondari, come descritto nei paragrafi precedenti.

#### **2.3.2 Analisi dei polifenoli totali**

Per la valutazione dei fenoli totali, si è proceduto secondo il saggio di Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965); secondo tale saggio il contenuto in fenoli totali dei campioni viene espresso come contenuto equivalente totale di acido gallico, misurato mediante lettura spettrofotometrica. A 0,125 ml di estratto sono stati aggiunti 0,5 ml di ddH<sub>2</sub>O e 0,125 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu. Dopo 3 minuti si aggiungono 1,25 ml di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%); infine dopo 2 h di incubazione al buio i campioni e le soluzioni standard di acido gallico sono stati portati al volume di 3 ml con ddH<sub>2</sub>O. Il bianco è stato preparato allo stesso modo, con acqua al posto del campione. Lo strumento utilizzato è stato uno spettrofotometro UVIKON 860 e l'assorbanza è stata letta a 760 nm. La concentrazione dei

polifenoli totali è stata calcolata usando una retta di taratura costruita dall'analisi spettrofotometrica delle soluzioni di acido gallico a concentrazione nota.

### **2.3.3 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)**

I campioni sono stati analizzati mediante un HPLC Shimadzu interfacciato con un rivelatore ad assorbimento UV\Vis. Per ciascun campione e soluzione standard sono stati iniettati 20  $\mu$ L e ogni analisi è stata eseguita tre volte. La separazione cromatografica è stata effettuata con eluizioni a gradiente e la colonna usata è una C-18 (5  $\mu$ m, 4,6 mm x 150 mm). Per le analisi quantitative delle varie classi di metaboliti presenti negli estratti è stato usato il metodo dello standard esterno, attraverso il confronto dell'area del picco di quantità sconosciuta, ottenuto dall'analisi dell'estratto, con quella dei picchi di quantità nota dello stesso metabolita presente nelle soluzioni standard opportunamente preparate. Dall'analisi cromatografica delle soluzioni standard a concentrazione nota delle molecole di interesse sono state opportunamente costruite curve di calibrazione per ogni metabolita considerato, da identificare e quantificare negli estratti di legumi.

### **2.3.4 Percentuale di inibizione del DPPH' (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

Il radicale DPPH viene comunemente utilizzato per testare l'attività antiossidante di molecole ed estratti (Brand-Williams *et al.*, 1995). L'attività antiossidante viene misurata, mediante saggio spettrofotometrico, come riduzione dell'assorbanza di una soluzione di DPPH 100  $\mu$ M (0,004 g disciolti in 100 ml di metanolo) a  $\lambda = 517$  nm. L'attività antiossidante di un substrato viene espressa come IC<sub>50</sub>, cioè la concentrazione necessaria a dimezzare, rispetto al controllo, l'assorbanza del radicale DPPH; essa viene calcolata secondo la formula:  $IC_{50} = [Abs_{517} \text{ Controllo} - Abs_{517} \text{ Camp.}] \times 100 / Abs_{517} \text{ Controllo}$ . Sono state preparate 3 soluzioni a diversa concentrazione del campione contenenti radicale DPPH e, per ciascuna di esse, un bianco contenente metanolo e radicale DPPH.

## **2.4 Allestimento dei campioni per microscopia elettronica a scansione**

Porzioni dei cotiledoni dei semi delle diverse varietà di *Phaseolus vulgaris* sono state sezionate con una lametta e fissate in glutaraldeide 2.5% in tampone fosfato 0.1 M pH 7.2 per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi in lavaggi nel tampone, è stata effettuata la fissazione lasciando i campioni in tetrossido di osmio 1% in tampone fosfato 0.2 M, *overnight* a 4°C. Dopo la fissazione, i campioni sono stati disidratati in soluzioni di etanolo a concentrazione gradualmente crescente, dal 30 fino al 100%. Si è quindi proceduto con le fasi di essiccamento del campione con il “*Critical point drying*” e ricopertura con oro eseguita usando lo “*sputtering*”

device". I campioni così preparati sono stati osservati al microscopio elettronico a scansione Zeiss DSM 950.

### 3. Risultati

#### 3.1 Concentrazione delle frazioni proteiche

La concentrazione delle albumine, globuline, gluteline e prolamine è stata calcolata attraverso dosaggio Bradford, effettuato sulle frazioni proteiche delle diverse varietà analizzate. Per le diverse accessioni delle specie *L. sativus* e *L. culinaris* sono state considerate, fino a questo momento, solo le frazioni di gluteline e prolamine.

Nelle otto varietà di *P. vulgaris*, il contenuto di globuline e albumine è compreso rispettivamente tra 33.06-45.12% e 14.77-20.84% delle proteine totali; le gluteline hanno valori che vanno dal 12.84 al 41.16% delle proteine totali, mentre le prolamine solo in tre casi superano l'1%.

Per quanto riguarda la cicerchia di Campodimele, le gluteline hanno dei valori compresi tra 0.039 mg/100 mg e 0.086 mg/100 mg, mentre le prolamine non sono state rilevate. Nei due ecotipi della lenticchia la concentrazione delle gluteline è 0.056, per quello di Onano, e 0.087 mg/100mg, per quello di Ventotene, dove sono presenti anche le prolamine.

#### 3.2 Analisi del profilo elettroforetico di *P. vulgaris*

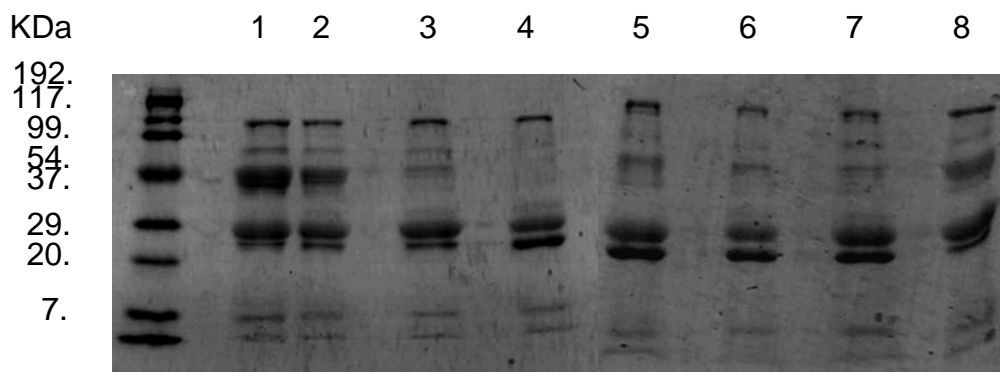


Figura 1. Pattern SDS-PAGE delle albumine delle varietà: 1) fagioli cocco; 2) fagioli verdolini; 3) fagioli del purgatorio; 4) fagioli gialli; 5) fagioli regina; 6) fagioli ciavattoni; 7) fagioli solfarini; 8) fagioli cannellini di Atina.

Il pattern SDS delle albumine (Figura 1) mostra in maniera predominante due subunità proteiche a basso peso molecolare, rispettivamente di 26.0 e 29.0 KDa, meno marcate nei campioni fagioli cocco, verdolini e purgatorio e più nelle varietà ciavattoni, solfarini e regina. Inoltre, le varietà cocco, verdolini e cannellini di Atina mostrano un pattern elettroforetico molto simile, con due ulteriori subunità di 36.8 e 49.3 KDa. Queste due bande sembrano mancare del tutto nella varietà

fagioli gialli, mentre sono presenti nelle altre varietà anche se il segnale è meno evidente. La frazione delle globuline non mostra differenze significative nelle otto varietà: le bande principali hanno un peso molecolare compreso tra 50.0 e 18.6 KDa; tra queste, una subunità di 33.5 KDa ha un segnale forte nelle varietà fagioli gialli e del purgatorio.

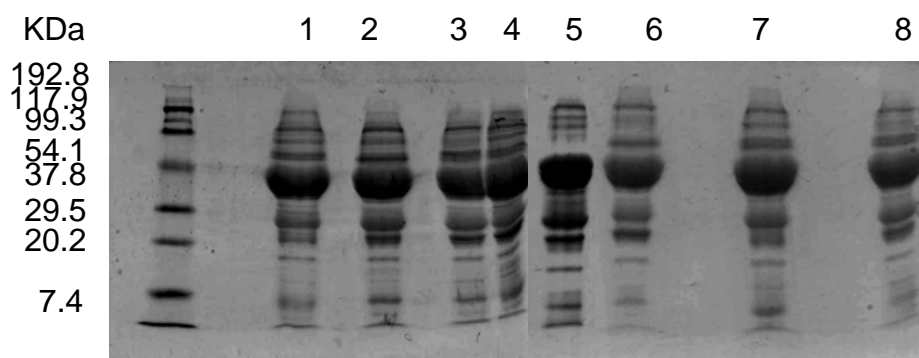


Figura 2. Pattern SDS-PAGE delle gluteline delle varietà: 1) fagioli cannellini di Atina; 2) fagioli del purgatorio; 3) fagioli solfarini; 4) fagioli regina; 5) fagioli gialli; 6) fagioli ciavattoni; 7) fagioli cocco; 8) fagioli verdolini.

Il profilo elettroforetico delle gluteline mostra alcune similitudini tra le diverse varietà (Figura 2). La principale subunità ha un peso molecolare di 30.2 KDa; altre subunità presenti in tutti i campioni hanno pesi molecolari di 22.6 e 15.8 KDa. Le bande a più alto peso molecolare mostrano delle differenze; confrontando i profili, si evidenziano due gruppi: cannellini di Atina, fagioli del purgatorio, solfarini e regina in un gruppo; fagioli gialli, cocco, verdolini e ciavattoni in un altro gruppo.

Nel caso delle prolamine, possono essere identificate cinque subunità principali del peso molecolare compreso tra 43.8 e 23.2 KDa presenti in tutti i campioni. Inoltre, abbiamo osservato che nella varietà cannellino di Atina la banda corrispondente a 43.8 KDa ha un segnale più forte rispetto agli altri campioni.

Dalla frazione delle globuline abbiamo purificato la faseolina, la principale globulina presente nei semi formata da subunità con peso compreso tra 43.0 e 53.0 KDa. Screenings effettuati con gels elettroforetici e analisi genetiche, hanno rivelato alcune varianti alleliche principali del gene codificante per la faseolina: i tipi S e B, maggiormente diffusi in varietà provenienti dall'America centrale; e i tipi T, C, H e A presenti nelle varietà di origine sudamericana. Nelle otto varietà da noi prese in esame, il profilo elettroforetico della faseolina è caratterizzato da bande con peso molecolare molto simile intorno ai 50 KDa (Figura 3); altre tre subunità principali pesano rispettivamente 77.0, 95.9 e 114.0 KDa. In base a questo pattern SDS possono essere distinti due

gruppi principali: i fagioli verdolini hanno un profilo elettroforetico corrispondente alla faseolina di tipo T, mentre le altre varietà hanno una faseolina di tipo S (Figura 4).

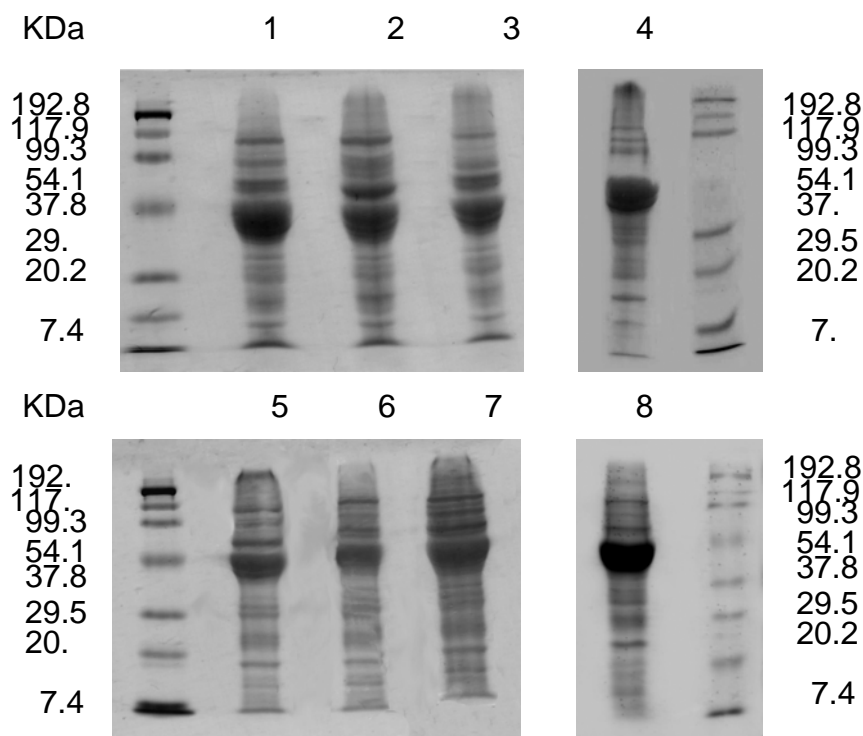


Figura 3. Pattern SDS-PAGE della faseolina delle varietà: 1) fagioli cocco; 2) fagioli ciavattoni; 3) fagioli solfarini; 4) fagioli gialli; 5) fagioli del purgatorio; 6) fagioli verdolini; 7) fagioli cannellini di Atina; 8) fagioli regina.

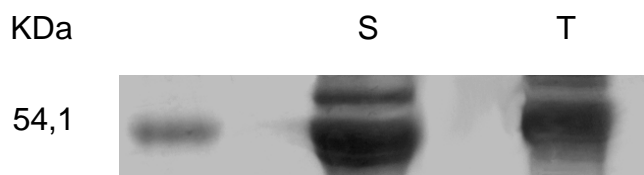


Figura 4. Particolare del profilo elettroforetico che mostra la faseolina di tipo S (fagioli del purgatorio) e quella di tipo T (fagioli verdolini).

### 3.3 Analisi del profilo elettroforetico di *L. sativus* e *L. culinaris*

I patterns elettroforetici della frazione di gluteline estratte da semi di ecotipi della specie *L. sativus* e *L. culinaris* hanno mostrato la separazione di 14-15 polipeptidi con un peso molecolare compreso tra i 7 e 125 KDa. Il profilo elettroforetico delle gluteline, per *L. sativus*, mostra delle similitudini:

sono infatti stati osservati due patterns elettroforetici distinti, il primo per le accessioni 1 e 2 e il secondo per quelle 3 e 4. Per *L. culinaris*, abbiamo osservato lo stesso pattern elettroforetico, tra gli ecotipi Ventotene e Onano, per la frazione delle gluteline.

La frazione delle prolamine è stata rivelata e poi separata solo nell'ecotipo Ventotene di *L. culinaris*. I patterns elettroforetici della frazione di prolamine estratte da semi di ecotipi di *Lens culinaris* hanno mostrato la separazione di 11 polipeptidi con un peso molecolare compreso tra 25 e 101 KDa.

### 3.4 Caratterizzazione morfologica dei granuli di amido attraverso microscopia elettronica a scansione

Le caratteristiche microstrutturali delle cellule dei cotiledoni delle varietà di *P. vulgaris* sono mostrate nelle Figure 5a e 5b. I granuli di amido hanno una forma ellittica o globulare e appaiono con dimensioni differenti, a seconda dell'ecotipo, comprese tra i 10x15  $\mu\text{m}$  nei fagioli cocco e i 25x25  $\mu\text{m}$  nei verdolini. Queste differenze ultrastrutturali nel parenchima e nelle cellule di cotiledone può corrispondere a differenti quantità di amido accumulato.

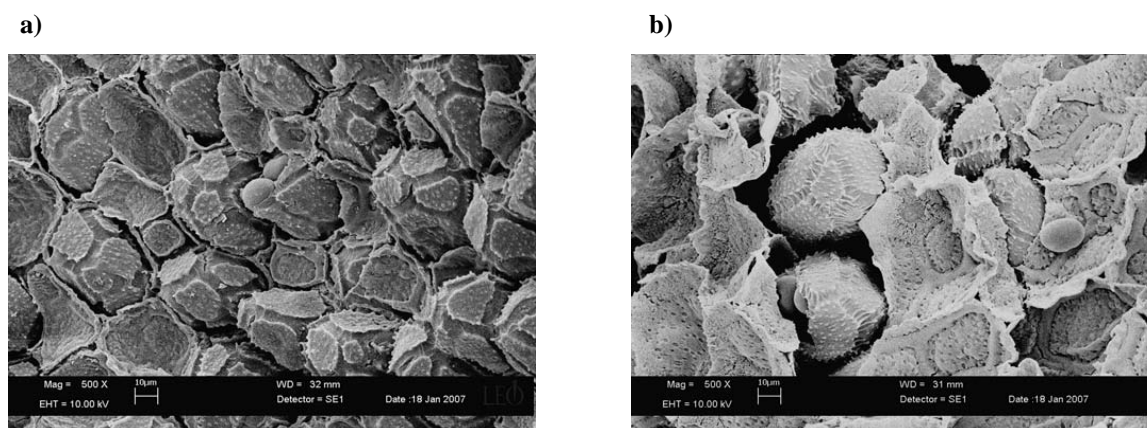


Figura 5. Parenchima di cotiledone di a) fagioli cocco e b) fagioli solfarini.

### 3.5 Analisi dei metaboliti secondari

#### 3.5.1 Analisi HPLC dei metaboliti secondari in *P. vulgaris*

I metaboliti secondari estratti dalle diverse specie di legumi sono stati identificati attraverso analisi HPLC-UV/Vis. I tempi di ritenzione hanno permesso di identificare i diversi metaboliti negli estratti preparati, mentre le aree dei picchi sono state usate per quantificarli come spiegato nella sezione dei materiali e metodi. Le molecole investigate e identificate sono: acido gallico, acido caffeico, acido *p*-cumarico per gli acidi fenolici; quercetina e campferolo per i flavonoidi; 5-7 dimetossicumarina per la classe delle cumarine. Sono riportati di seguito i risultati, riassunti in



tabella, delle analisi qualitativa e quantitativa degli estratti di *L. sativus* (Tabella 1) e *L. culinaris* (Tabella 2), delle quali è stato effettuato uno studio di confronto dei campioni prima e dopo la cottura.

Tabella 1. Concentrazione di composti fenolici identificati (mg/kg) in estratti delle quattro accessioni di *L. sativus*, prima e dopo cottura.

	<b>1 crudo</b>	<b>1 cotto</b>	<b>2 crudo</b>	<b>2 cotto</b>	<b>3 crudo</b>	<b>3 cotto</b>	<b>4 crudo</b>	<b>4 cotto</b>
acido gallico	738,02±36,90	163,60±8,12	506,6±25,3	171,65±8,6	281,12±14,05	160,9±8,04	242,8±12,14	0
acido caffeico	112,8±5,64	9,70±0,48	20,94±1,05	0	0	0	39,38±1,1	16,68±0,8
acido <i>p</i> -cumarico	10,4±0,52	0	15,42±0,8	0	8,95±0,45	0	0,88±0,04	0
quercetina	6,63±0,33	0	0	0	4,12±0,20	3,7±0,18	0	5,16±0,26
campferolo	0	18,71±0,94	0	3,32±0,20	0	6,93±0,35	0	2,92±0,15
5,7-dimetossicumarina	0	0	0	0	0	0	0	9,72±0,50

Tabella 2. Concentrazione di composti fenolici identificati (mg/kg) in estratti degli ecotipi Onano e Ventotene di *L. culinaris*, prima e dopo cottura.

	<b>Onano crudo</b>	<b>Onano cotto</b>	<b>Ventotene crudo</b>	<b>Ventotene cotto</b>
acido gallico	455,71±22,78	107,45±5,37	454,18±22,70	50,1±2,50
acido caffeico	12,57±0,63	4,66±0,23	135,12±6,8	47,02±2,35
acido <i>p</i> -cumarico	8,74±0,44	0	18,53±0,92	0
quercetina	0	6,6±0,33	0	13,34±0,67
campferolo	12,52±0,63	79,5±3,98	0	0
5,7-dimetossicumarina	0	0	0	0

### 3.5.2 Contenuto di polifenoli totali in *L. sativus* e *L. culinaris*

Nel saggio dei polifenoli totali, i risultati ottenuti per *L. sativus* sono compresi in un range di concentrazione pari a 0,745 – 2,63 g GAE/kg (GAE = acido gallico equivalenti) per quanto riguarda i campioni crudi, e in un intervallo di 0,47 – 1,45 g GAE/kg per i cotti. Nel caso di *L. culinaris*, la concentrazione di polifenoli è stimata in un range di 2,26 – 2,56 g GAE/kg per i campioni crudi e in un intervallo di 1,29 – 1,36 g GAE/kg per quelli cotti.

Nella specie *L. sativus*, l'accessione con il più alto contenuto in fenoli totali è la 2 che mantiene il più elevato contenuto anche in seguito alla cottura, pur subendo un depauperamento; tale

contenuto è mediamente circa il doppio del contenuto medio in fenoli totali degli altri ecotipi presi in esame. Per *L. culinaris*, le concentrazioni medie dei fenoli totali sono più alte rispetto a *L. sativus*, sebbene con la cottura il depauperamento subito dall' ecotipo Onano di *L. culinaris* è superiore a quello dell'accessione 2 di *L. sativus*.

### 3.6 Percentuale di inibizione del DPPH'

Tutti gli estratti degli ecotipi analizzati hanno mostrato un'attività antiossidante espressa come IC<sub>50</sub>, cioè come concentrazione di estratto richiesta per ridurre del 50% la concentrazione iniziale del radicale DPPH. I risultati ottenuti sono mostrati in Tabella 3.

Tabella 3. Risultati relativi al saggio del radicale DPPH effettuato sui campioni di *L. sativus* e di *L. culinaris*.

	<b>DPPH IC<sub>50</sub></b> <b>µg di metaboliti secondari/ml</b> <b>di estratto</b>
<i>L. sativus</i> 1	0,44 ± 0,02
<i>L. sativus</i> 2	0,96 ± 0,05
<i>L. sativus</i> 3	0,40 ± 0,02
<i>L. sativus</i> 4	0,31 ± 0,01
<i>L. culinaris</i> Onano	0,64 ± 0,03
<i>L. culinaris</i> Ventotene	0,66 ± 0,03

Dall'analisi della Tabella 3 si osserva come il potere antiossidante maggiore sia presente nell'accessione 4 per *L. sativus* fra tutti i campioni analizzati; nella specie *L. culinaris*, l'ecotipo Onano ha dimostrato maggiori proprietà antiossidanti.

## 4. Discussione

I gel di elettroforesi evidenziano che il metodo estrattivo utilizzato ha permesso una buona purificazione delle quattro diverse frazioni; questo è in parte dovuto al fatto che prima dell'estrazione tutti i semi sono stati privati del tegumento, eliminando quindi molecole che potrebbero interagire con le proteine, come ad esempio i tannini. Inoltre, nello studio elettroforetico delle varietà di *P. vulgaris*, non abbiamo visto alcuna contaminazione di albumine

nelle globuline e viceversa; questo risultato è stato principalmente ottenuto con i ripetuti processi di dialisi effettuati.

Per quanto riguarda la specie *P. vulgaris*, il pattern SDS-PAGE ha rivelato differenze presenti negli otto ecotipi. Le albumine sono la frazione in cui sono riscontrabili maggiori differenze: in tre campioni (fagioli cocco, fagioli verdolini e cannellini di Atina) sono presenti due subunità, tra cui una del peso molecolare di 36.8 KDa che rappresenta una delle bande principali del profilo elettroforetico non presente nelle altre varietà. Nel caso delle globuline e delle gluteline non sono osservate differenze significative; nelle prolamine, sempre nel campione di Atina, è presente una subunità dal peso molecolare di 43.8 KDa che ha un segnale molto più forte di quello presente nelle altre sette varietà. Nei campioni analizzati, il contenuto di albumine e globuline è, rispettivamente, superiore e comparabile ai dati presenti in letteratura. La faseolina, la maggior proteina di riserva di *P. vulgaris*, è considerato un marcatore molecolare (Lioi *et al.*, 2005); il suo profilo elettroforetico nei diversi ecotipi è stato confrontato con pattern di riferimento, presenti in letteratura, che ne identificano sei tipi principali (Perazzini *et al.* 2008). Dall'analisi è emerso che sette degli otto ecotipi mostrano una faseolina di tipo S che riconduce a un'origine centroamericana; i fagioli verdolini mostrano invece una faseolina di tipo T che riporta a un'origine sudamericana (Gepts & Bliss, 1988). La presenza di differenti tipi di faseolina evidenzia la variabilità genetica esistente tra gli otto ecotipi, che derivano da due distinti pool genici. Confrontando invece i profili elettroforetici ottenuti dalle quattro frazioni proteiche, le albumine sono quelle che hanno mostrato le maggiori differenze tra le otto varietà e possono essere quindi considerate, dopo la faseolina, il migliore marcatore molecolare. Ipotizzando un cluster basato su questa frazione proteica, possono essere identificati due gruppi distinti: uno che comprende i fagioli cocco, i cannellini di Atina e i fagioli verdolini; un altro che comprende fagioli regina, solfarini, del purgatorio, gialli e ciavattoni.

La caratterizzazione morfologica dei granuli di amido delle cellule dei cotiledoni ha mostrato alcune differenze tra i campioni, riguardanti soprattutto le dimensioni e il numero di granuli per cellula. I fagioli del purgatorio risultano essere il campione con granuli di dimensioni maggiori; i fagioli ciavattoni mostrano in assoluto il numero più alto di granuli per cellula. In alcuni casi è stato poi possibile osservare una differenza strutturale nelle cellule del parenchima che possono, nei differenti ecotipi, avere forma irregolare o presentare un aspetto caratteristico della parete cellulare. a fronte di questa analisi morfologica, sarebbe interessante sapere se tali differenze strutturali corrispondano a diversi contenuti di amido.

Nelle specie *L. sativus* e *L. culinaris*, l'analisi dei patterns elettroforetici della frazione di gluteline ha permesso di distinguere 2 sottopopolazioni nell'ecotipo Campodimele per la cicerchia e un unico pattern elettroforetico per gli ecotipi Ventotene e Onano di lenticchia. Inoltre, polipeptidi della frazione di glutamine dell'ecotipo Ventotene di *L. culinaris* hanno peso molecolare simile a ecotipi laziali di *P. vulgaris* (Alesiani et al, submitted). È da sottolineare l'importanza dei dati ottenuti con le frazioni di gluteline e prolamine; infatti, mancano in letteratura dati a riguardo. Per queste due specie, va approfondito lo studio proteomico sulle altre frazioni di interesse e le analisi morfologiche, al fine di rilevare analogie e/o differenze.

L'analisi dei metaboliti secondari ha dimostrato la presenza di composti fenolici -acidi fenolici, flavonoidi e cumarine- nei semi dei legumi presi in esame. Sono molti i dati presenti in letteratura riguardo l'attività antiossidante, antitumorale e chemopreventiva del cancro di queste sostanze naturali (Kampa *et al.*, 2004). In particolare la 5,7-dimetossicumarina, molecola appartenente alla classe delle cumarine e identificata in alcuni campioni presi in esame, è studiata nel nostro laboratorio per la sua attività antitumorale in linee cellulari di melanoma (Alesiani et al., 2008).

In questo studio abbiamo dimostrato l'importanza dei legumi nell'alimentazione giornaliera: è infatti chiara la presenza di composti fenolici in estratti opportunamente preparati, di cui poi è stata osservata una significativa attività antiossidante attraverso il saggio con radicale DPPH. Inoltre per la cicerchia e la lenticchia, abbiamo osservato come il contenuto di fenoli totali diminuisca in seguito a cottura; infatti, i metaboliti secondari vanno incontro a degradazione con la bollitura e comunque raggiungendo alte temperature. La cosa interessante è che in alcuni campioni e per alcuni composti, si verifica il fenomeno opposto, ossia un incremento della loro concentrazione: spieghiamo questo risultato considerando che i metaboliti secondari, come ad esempio i flavonoidi, sono presenti nei tessuti soprattutto nella forma glicosilata che viene poi convertita in quella non glicosilata con le alte temperature. La stessa cosa vale per le cumarine, come la 5,7-dimetossicumarina presente in alcuni campioni solo in seguito a cottura; queste molecole sono spesso inglobate nei tessuti della pianta in strutture tanniniche e vengono rilasciate solo in seguito a trattamenti termici (Naczki & Shahi, 2004). In questo ambito, sarebbe interessante proseguire con le analisi di caratterizzazione e identificazione di altri metaboliti secondari.

## 5. Bibliografia

- Alesiani, D., Cicconi, R., Mattei, M., Montesano, C., Bei, R., and Canini, A. (2008). Cell cycle arrest and differentiation induction by 5,7-dimethoxycoumarin in melanoma cell lines. *Int J Oncol* 32, 425-434.

- Alesiani, D., Perazzini R., Canuti L., Canini A. Characterization of *Lens culinaris* L. and *Lathyrus sativus* L. landraces cultivated in Central Italy. *Plant Foods Hum Nutr* (submitted)
- Asp, N. G., Tovar, J., and Bairoliya, S. (1992). Determination of resistant starch in vitro with three different methods, and in vivo with a rat model. *Eur J Clin Nutr* 46 *Suppl* 2, S117-119.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77, 67-82.
- Englyst, H. N., Quigley, M. E., Hudson, G. J., and Cummings, J. H. (1992). Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Analyst* 117, 1707-1714.
- Gepts, P., and Bliss, F.A. (1988). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Econ Bot* 42, 86-104.
- Guillon, F., and Champ, M. M. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr* 88 *Suppl* 3, S293-306.
- Hammer, K., and Laghetti, G. (2005). Genetic erosion-examples from Italy. *Genet Resour Crop Ev* 52, 629-634.
- Harborne, J. B. (1990). Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants. *Ciba Found Symp* 154, 126-134; discussion 135-129.
- Hobohm, C. (2000) Biodiversität. Quelle and Meyer, Wiebelsheim.
- Hughes, J. S., Ganthavorn, C., and Wilson-Sanders, S. (1997). Dry beans inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *J Nutr* 127, 2328-2333.
- Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., *et al.* (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 6, R63-74.
- Leterme, P. (2002). Recommendations by health organizations for pulse consumption. *Br J Nutr* 88 *Suppl* 3, S239-242.

- Lioi, L., Piergiovanni, A.R., Pignone, D., Pugliesi, S., Santantonio, M., and Sonnante, G. (2005). Genetic diversity of some surviving *on-farm* italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. *Plant Breeding* 124, 576-581.
- Naczka, M., and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 1054, 95-111.
- Osborne, T.B. (1924). *The vegetable proteins*. Longmans Green, London.
- Padhye, V.W., and Salunkhe, D.K. (1979). Biochemical studies on black gram (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: amino acid composition of fractions of the proteins. *J Food Sci* 44, 606-610.
- Perazzini R., Leonardi D., Ruggeri S., Alesiani D., D'Arcangelo G., Canini A. (2008). Characterization of *Phaseolus vulgaris* L., landraces cultivated in Central Italy. *Plant Foods Hum Nutr* 63, 211-218.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035-1042.
- Raven, P.H., Evert, R.F., and Eichorn, S.E. (2002) *Biologia delle piante*. Zanichelli.
- Rochfort, S., and Panozzo, J. (2007). Phytochemicals for health, the role of pulses. *J Agric Food Chem* 55, 7981-7994.
- Sathe, S. K. (2002). Dry bean protein functionality. *Crit Rev Biotechnol* 22, 175-223.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., and Salunkhe, D. K. (1984). Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 1. Chemical composition: proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 20, 1-46.
- Sgarbieri, V. C. (1989). Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Rev Nutr Diet* 60, 132-198.
- Singleton V. L., and Rossi J. A. Jr. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16, 144-158.
- Templeman, T. S., Demaggio, A. E., and Stetler, D. A. (1987). Biochemistry of Fern Spore Germination: Globulin Storage Proteins in *Matteuccia struthiopteris* L. *Plant Physiol* 85, 343-349.
- Wright, D.J. (1987). The seed globulins. – In: Hudson, B.J.F. (Ed.), *Developments in Food Protein* 5, pp. 81-157.
- Xu, B. J., and Chang, S. K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci* 72, S159-166.
- Youle, R.J., and Huang, A.H.C. (1981). Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseed of diverse species. *Am J Bot* 68, 44-48.
- Young, N. D., Mudge, J., and Ellis, T. H. (2003). Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol* 6, 199-204.

## **Effetti di estratti di leguminose su line cellulari cardiache**

G. Forte, M. Minieri, P. Di Nardo

Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

### **Introduzione**

Durante analisi biochimiche realizzate su campioni di *Lathirus sativus* L. di Campodimele e *Lens culinaris* Medik di Ventotene mediante cromatografia in fase liquida, e' stata dimostrata la presenza di vari metaboliti secondari in queste cultivar. I composti identificati appartenevano alle classi dei flavonoidi (kaempferol, quercetin e genistein), degli acidi fenolici (acido gallico, caffeico, cumarico) o dei derivati cumarinici. L'interesse per tali metaboliti secondari deriva dalla possibilita' che alcuni di essi possano trovare un'applicazione nella medicina come farmaci di derivazione naturale. Alcuni di essi sono stati proposti come adiuvanti nella chemioterapia (Mojžišová et al, 2008), oppure come fattori protettivi nella terapia delle patologie cardiovascolari (Kim et al, 2008). In particolare, alcuni derivati cumarinici vengono attualmente utilizzati come anti-coagulanti nella prevenzione delle complicanze trombo-emboliche in pazienti affetti da varie patologie cardiovascolari (Khuu et al, 2009). Inoltre, alcuni derivati cumarinici hanno mostrato la capacita' di bloccare la proliferazione di cellule tumorali in esperimenti in vitro (Alesiani et al, 2008). D'altro canto, alcuni di questi composti si sono dimostrati attivi nel favorire la proliferazione e la migrazione di fibroblasti derivanti da derma. Per questo motivo, e' stato suggerito che essi possano possedere attivita' cicatrizzante. Le patologie cardiache, che rappresentano la maggiore causa di morte nei Paesi industrializzati, sono generalmente caratterizzate, indipendentemente dalla causa che le scatena, da una fase infiammatoria che segue alla morte per ischemia di una porzione di tessuto contrattile. Tra le cellule che maggiormente subiscono i danni dovuti all'ischemia, vi sono i cardiomiociti, i fibroblasti cardiaci e le cellule staminali cardiache. La conservazione e/o la sostituzione di tali elementi cellulari e' l'obiettivo principale degli studi volti ad identificare nuovi approcci terapeutici per le patologie cardiache. In quest'ottica, l'identificazione di composti di derivazione naturale che possano favorire la sopravvivenza delle cellule cardiache risulta di straordinario interesse per la ricerca cardiovascolare.

### **Materiali e Metodi**

#### **Preparazione di fibroblasti cardiaci murini**

Fibroblasti cardiaci (cfibro) sono stati preparati da cuori di topi C3H/He di sei settimane. Gli esperimenti sono stati condotti secondo le normative italiane ed europee regolamentanti la salvaguardia e l'uso degli animali da laboratorio.

Gli animali sono stati anestetizzati e il cuore lavato ripetutamente in tampone fosfato sterile (PBS 1X: tampone fosfato salino, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4). Per favorire la formazione di una soluzione cellulare omogenea, in seguito a omogeneizzazione meccanica, i tessuti sono stati digeriti in tripsina 50 µg/ml per dodici ore a 4°C e successivamente collagenasi 100 U/ml per 30 minuti. La soluzione cellulare così ottenuta è stata filtrata utilizzando filtri con pori di 70 µm centrifugata per 10 minuti a 800xg e piastrata in presenza di terreno Leibovitz (Worthington) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS) precedentemente inattivato a 56° C per 30 minuti, streptomicina 100 µg/ml e penicillina 100 U/ml e incubata a 37°C in atmosfera umidificata contenente 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 48 ore, una popolazione di cellule aderenti alla superficie della piastra con caratteristiche fibroblastoidi è comparsa. I cardiomiociti presenti sono stati rimossi e i fibroblasti cardiaci seminati alla concentrazione di 0,5X10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> e cresciuti in RPMI addizionato con 10% FBS, streptomicina 100 µg/ml e penicillina 100 U/ml.

### **Conte cellulari**

Una volta raggiunta la confluenza, i fibroblasti sono stati lavati in PBS e incubati con una soluzione contenente Tripsina ed EDTA 0,05% per 4 minuti a 37°C, per favorire il distacco dalla superficie della piastra di coltura. Dopo aver bloccato la reazione enzimatica con RPMI contenente 10% di FBS, la sospensione cellulare è stata centrifugata per 10 minuti a 800xg e risospesa in terreno completo per la conta. Un'aliquota della sospensione è stata diluita con un volume di soluzione di Trypan blue, sostanza in grado di evidenziare la presenza di cellule morte. Il numero di cellule vive presenti in tre quadranti indipendenti su una camera da conta Neubauer è stato contato. Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 2X10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> in terreno contenente il 10% FBS, in presenza o assenza di concentrazioni scalari di 3,5-idrossicumarina. Dopo 24, 48, 72 e 96 ore la conta cellulare con Trypan blue è stata ripetuta in triplicato in tre differenti set di esperimenti.

### **Western blot**

Cellule cfibro sono state stimulate con 5,7-dimetossicumarina alle concentrazioni 1 e 10 nM per 10, 30 e 60 minuti nella piastra di coltura. Successivamente, le cellule sono state lisate con buffer RIPA per 30 minuti in ghiaccio. Dopo una centrifugazione a 13000 RPM per 10 minuti, alla fase superiore contenente le proteine e' stato aggiunto blu di bromofenolo e glicerolo ed e' stato caricato su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti. Dopo la corsa, il trasferimento delle proteine e' avvenuto in un sistema di trasferimento semidry per 1 ora. Infine i filtri ottenuti sono stati incubati per 30



minuti con PBS / TWEEN 1,5% / latte 7% e quindi con anticorpo primario diretto contro la forma fosforilata di p38 (p-p38) o la forma totale di p42/44. L'incubazione successiva con anticorpi secondari coniugati con perossidasi e la rivelazione con il metodo di chemiluminescenza ECL hanno permesso di evidenziare la presenza di bande specifiche per p-p38 e p42/44.

### **Saggio di chemotassi “TRANSWELL”**

Per testare la capacità del fattore di indurre un effetto chemotattico nei fibroblasti cardiaci, è stato utilizzato un test “Transwell” (Costar).  $1.5 \times 10^5$  cellule sono state risospese in 200  $\mu$ l di terreno a bassa concentrazione di siero e seminate su filtri con pori di 8  $\mu$ m, precedentemente trattati con gelatina 0,1% per favorire l'adesione cellulare. Tali filtri sono stati posizionati su pozzetti contenenti terreno con o senza gli stimoli appropriati e lasciati a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Dopo 6, 12 e 18 ore le cellule sulla parte superiore del filtro sono state rimosse meccanicamente e quelle migrate attraverso i pori nella camera inferiore colorate per 5 minuti con ematossilina ed eosina e fotografate con una fotocamera digitale.

### **Saggio di migrazione “WOUND HEALING”**

I fibroblasti cardiaci sono stati fatti crescere in terreno RPMI addizionato con FCS 10% in pozzetti 35X15 mm. Una volta raggiunta la confluenza, il terreno è stato rimosso e sostituito con RPMI addizionato con FCS 0,5%. Dopo 12 ore, sul monostrato cellulare è stata prodotta una ferita con un puntale in modo tale da creare una striscia priva di cellule. Le cellule in sospensione sono state rimosse e il fattore aggiunto per 6, 12 e 18 ore. La capacità della 3,5-idrossicumarina di indurre la migrazione dei fibroblasti è stata studiata utilizzando le concentrazioni del fattore che avevano mostrato attività sul tasso di crescita cellulare. Le cellule così trattate sono state, infine, colorate per 5 minuti con ematossilina e eosina e fotografate al microscopio ottico con una fotocamera digitale.

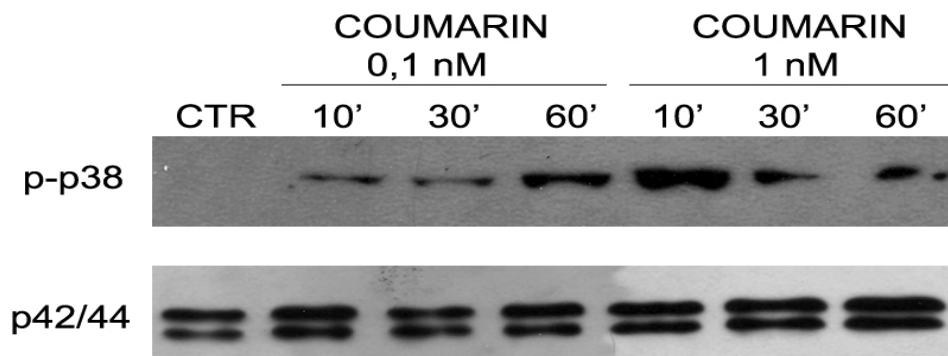
### **Analisi del ciclo cellulare al citofluorimetro**

Per valutare la quantità di DNA contenuto nelle cellule trattate o non trattate con 5,7-dimetossicumarina,  $2 \times 10^5$  cfibro sono stati marcati per 15 minuti al buio con 2,5 mg/ml ioduro di propidio (PI) in una soluzione contenente 0,05% TRITON X-100. La fluorescenza emessa dalle singole cellule è stata valutata con il citofluorimetro FACScalibur.

## ***RISULTATI***

### La 5,7-dimetossicumarina attiva la via di trasduzione del segnale di p38 MAPK nei fibroblasti cardiaci murini

La via di segnalamento di p38 MAPK (per brevit  indicata come p38)   una via ubiquitaria la cui attivazione   stata associata alla sopravvivenza cellulare, ma anche al differenziamento e alla migrazione. In un esperimento realizzato in western blot, la 5,7-dimetossicumarina ha mostrato la capacit  di attivare la fosforilazione di p38 alle concentrazioni di 1 e 10 nM (Figura 1). Tale osservazione potrebbe indicare che i fibroblasti cardiaci posseggono un sistema recettoriale specifico per i derivati cumarinici, anche se la natura di questo sistema   al momento ignota.

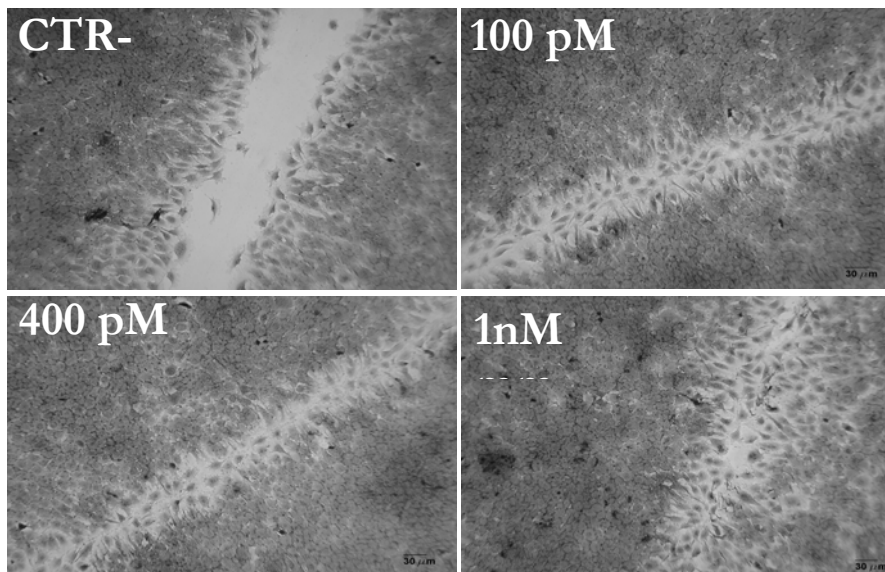


**Figura 1: Analisi Western blot.** La stimolazione dei fibroblasti cardiaci con DMOC causa l'attivazione entro 10 minuti della via di p38 MAPK. Lo stesso filtro   stato incubato con un anticorpo diretto contro la forma totale di p42/44 per effettuare la normalizzazione.

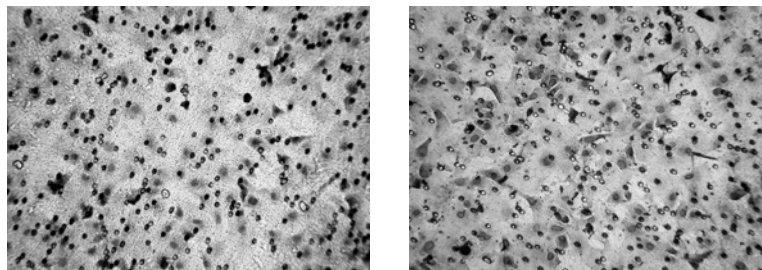
### Effetto della 5,7-dimetossicumarina sulla capacit  di fibroblasti cardiaci murini di migrare

La capacit  dei fibroblasti cardiaci di origine murina (cfibro) di migrare e chiudere una ferita precedentemente inferta   stata saggiata mediante il test del "wound healing". A tal fine, cfibro sono stati coltivati in piastra fino alla confluenza e quindi lasciate in terreno contenente siero al 0,5% per 12 ore. Successivamente, una pipetta da 200  l   stata utilizzata per generare una ferita sul monostrato cellulare. Dopo la rimozione del terreno, le cellule sono state incubate per 6, 12 o 18 ore in assenza o in presenza di 5,7-dimetossicumarina (DMOC) alle seguenti concentrazioni: 100, 400 pM e 1 nM. La figura 2 mostra che un significativo effetto motogenico   esercitato dalla DMOC alle concentrazioni considerate (Figura 2). La concentrazione attiva pi  alta (1 nM)   stata in seguito utilizzata per valutare se la DMOC potesse esercitare un effetto chemoattrattivo sulle stesse cellule. A tal fine   stato utilizzato un saggio "transwell" nel quale un filtro con pori del diametro di 8  m   frapposto tra le cellule, poste nella camera superiore e una soluzione contenente il fattore la cui attivit  si vuole saggiare. Come evidente dalla Figura 3, dopo 6 ore di incubazione,

si e' potuta osservare la migrazione di un numero considerevole di cellule nella camera inferiore contenente la DMOC.



**Figura 2: Test “wound healing”.** la 5,7-dimetossicumarina esercita un effetto motogenico sui fibroblasti cardiaci alle concentrazioni 100, 400 pM e 1 nM. La migrazione e' stata osservata 12 ore dopo il taglio. Marcatura con ematossilina-eosina.



**Figura 3: Effetto chemoattrattivo della 5,7-dimetossicumarina.** Il saggio transwell ha indicato la capacita' della 5,7-dimetossicumarina di attrarre i fibroblasti cardiaci murini. Le cellule sono state fissate e colorate con ematossilina-eosina dopo 6 ore dall'aggiunta del fattore. A sinistra e' mostrata la condizione di controllo, mentre nella figura di destra si possono vedere le cellule migrate nella camera inferiore dove e' presente la DMOC a concentrazione 1 nM.

### **La 5,7-dimetossicumarina influenza il ciclo cellulare dei fibroblasti cardiaci murini**

Per valutare la possibilita' che la DMOC potesse esercitare un effetto sul ciclo cellulare dei fibroblasti cardiaci, i cfibro sono stati coltivati in presenza del derivato cumarinico alle concentrazioni di 1, 10 e 30 nM per 24, 72 e 144 ore. Successivamente, le cellule sono state staccate dalla piastra, e marcate con ioduro di propidio in presenza del detergente TRITON X-100. In tali

condizioni, la membrana cellulare e' stata disgregata dal detergente mettendo lo ioduro di propidio (un colorante fluorescente) in condizione di intercalare le molecole di DNA. Utilizzando il citofluorimetro (FACS) e' stato quindi possibile valutare la quantita' di DNA presente in ogni singola cellula, correlandola all'intensita' della fluorescenza emessa. In tal modo siamo stati in grado di valutare all'interno dei singoli campioni, la percentuale di cellule che erano nelle varie fasi del ciclo cellulare: G0-G1 (cellule che sono quiescenti o stanno svolgendo il loro ruolo fisiologico), S (cellule che stanno sintetizzando il DNA), G2-M (cellule che hanno terminato la sintesi del DNA e si apprestano alla divisione mitotica). Mediante questi accorgimenti, e' stato possibile verificare che, in seguito a trattamento con DMOC a concentrazioni nel range 1-30 nM, i cfibro sono indotti a sintetizzare DNA, quindi probabilmente a dividersi. Parallelamente, nelle stesse condizioni sperimentali si osservava una diminuzione delle cellule in fase sub-G0, le cellule morte (Figura 4a). Tali effetti apparivano piu' evidenti dopo 144 ore (Figura 4b).

a)

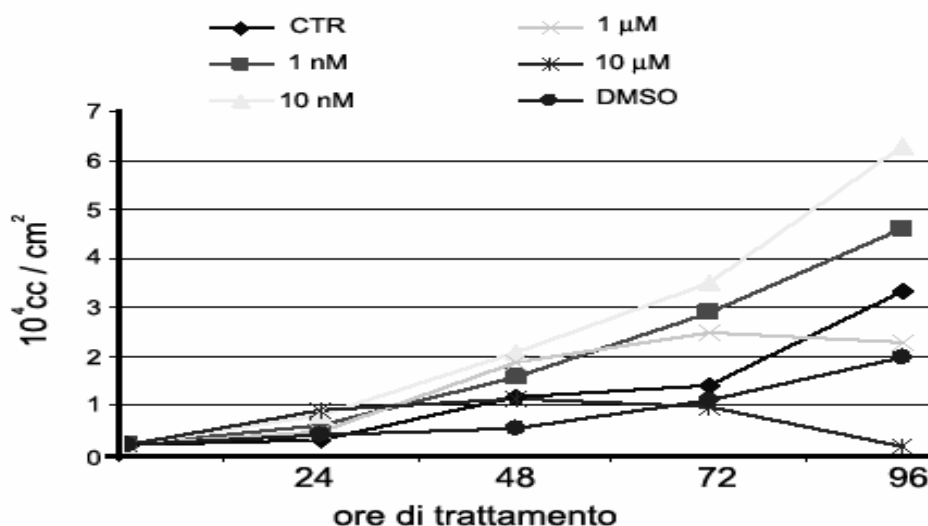
<b>72 h</b>	<b>sub-G0 (%)</b>	<b>G0-G1(%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2-M (%)</b>
<b>CTR</b>	<b>5,16</b>	<b>63,73</b>	<b>3,21</b>	<b>9,62</b>
<b>DMSO</b>	<b>3,94</b>	<b>75,41</b>	<b>5,8</b>	<b>6,46</b>
<b>1 nM DMOC</b>	<b>1,76</b>	<b>83,48</b>	<b>5,31</b>	<b>6,33</b>
<b>10 nM DMOC</b>	<b>3,85</b>	<b>78,82</b>	<b>5,31</b>	<b>6,33</b>
<b>30 nM DMOC</b>	<b>2,92</b>	<b>76,38</b>	<b>6,1</b>	<b>6,38</b>

b)

<b>144 h</b>	<b>sub-G0 (%)</b>	<b>G0-G1 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2-M (%)</b>
<b>CTR</b>	16,48	71,58	6,28	5,91
<b>DMSO</b>	17,66	61,12	15,94	4,72
<b>1 nM DMOC</b>	28,49	36,88	26,95	4,68
<b>10 nM DMOC</b>	17,65	55,13	15,67	6,33
<b>30 nM DMOC</b>	19,48	60,08	15,5	4,38

**Figura 4:** Analisi al FACS della distribuzione delle cellule cfibro nelle fasi del ciclo cellulare, dopo trattamento con 5,7-dimetossicumarina (DMOC) per 72 (a) e 144 ore (b). La frazione di cellule che sono in una determinata fase del ciclo cellulare (sub-G0, Go-G1, S, G2-M) e' indicata come percentuale. Il dimetilsolfossido (DMSO) e' stato utilizzato come controllo interno.

A conferma di tali risultati, un saggio di conta cellulare in trypan blu è stato realizzato utilizzando cfibro coltivati per 24, 48, 72 e 96 in presenza di DMOC alle concentrazioni che erano risultate attive nei precedenti test (1, 10 nM). Allo stesso tempo, sono state utilizzate concentrazioni maggiori (1, 10  $\mu$ M) per valutare la possibilità che la DMOC esercitasse un effetto concentrazione-dipendente sulle cellule prese in considerazione. La figura 5 indica che, come già suggerito dagli esperimenti precedenti, il trattamento dei fibroblasti cardiaci con DMOC a concentrazioni nanomolari causa un aumento del tasso proliferativo dei cfibro. Tale effetto è concentrazione-dipendente nel range delle concentrazioni nanomolari. Al contrario, quando i cfibro vengono stimolati con concentrazioni più elevate di DMOC (1, 10  $\mu$ M) tale sostanza sembra esercitare un effetto tossico, bloccando la crescita cellulare.

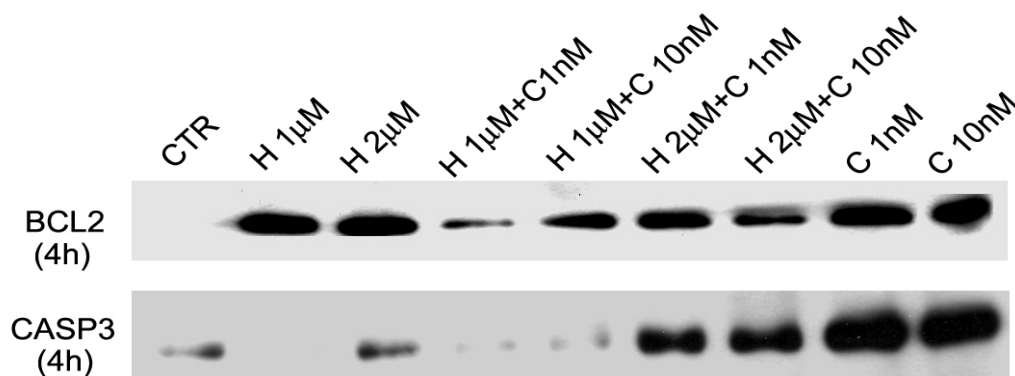


**Figura 5:** La DMOC induce la proliferazione dei cfibro a concentrazioni nM, mentre blocca la crescita a concentrazioni più elevate ( $\mu$ M).

### **La 5,7-dimetossicumarina non esercita effetti protettivi sui fibroblasti cardiaci murini**

L'esposizione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) è uno dei maggiori determinanti della morte cellulare nella progressione delle patologie cardiache. Per questo motivo, si è voluto determinare se i derivati cumarinici fossero in grado di proteggere i cfibro dallo stress ossidativo indotto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le cellule cfibro sono state quindi trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 e 2  $\mu$ M e contemporaneamente con 5,7-dimetossicumarina a concentrazioni nanomolari (1, 10 nM). Lo studio in western blot

dell'attivazione di noti attivatori e inibitori della via apoptotica hanno mostrato che la DMOC non e' in grado di fornire protezione ai fibroblasti cardiaci trattati con  $H_2O_2$  (Figura 6).



**Figura 6: Il trattamento con 5,7-dimetossicumarina non fornisce protezione dall'apoptosi indotta da  $H_2O_2$ .** L'analisi western blot realizzata utilizzando anticorpi diretti contro proteine coinvolte nell'apoptosi (BCL2 e CASP3) indica che la DMOC (1, 2 nM) non e' in grado di prevenire o contrastare i danni indotti da  $H_2O_2$  a concentrazioni 1 e 2  $\mu$ M.

## Conclusioni

L'identificazione di composti naturali in grado di poter contribuire alla terapia delle patologie cardiovascolari e' un obiettivo prioritario della cardiologia sperimentale. Inoltre, data l'altissima incidenza delle malattie cardiache nei Paesi industrializzati, la possibilita' di individuare nuovi protocolli terapeutici per esse, e' di grande interesse per l'industria farmaceutica. Nel presente lavoro sperimentale, e' stata valutata la capacita' di un derivato cumarinico identificato in campioni di *Lathirus sativus* L. di Campodimele e *Lens culinaris* Medik. di Ventotene di agire su alcuni parametri biologici di cellule di origine cardiaca. Tale composto e' gia' stato utilizzato con successo nel bloccare il ciclo cellulare di cellule tumorali e alcuni composti a struttura simile sono correntemente impiegati come anti-coagulanti nella terapia cardiovascolare. Gli esperimenti hanno dimostrato che la 5,7-dimetossicumarina e' in grado di stimolare in maniera specifica i fibroblasti cardiaci, come dimostrato dall'attivazione della via di trasduzione del segnale di p38 MAPK. A tale evento, che avviene nell'ambito di 10 minuti, segue un effetto dello stesso composto sulla proliferazione e, quindi, sulla progressione nel ciclo cellulare, delle stesse cellule. Saggi funzionali (wound healing e transwell) hanno inoltre dimostrato che la cumarina a concentrazioni nanomolari e' in grado di indurre la migrazione delle cellule cardiache e la chiusura di una ferita, esercitando un'attivita' chemotattica. Al contrario, non e' stato possibile dimostrare nessun effetto della 5,7-

dimetossicumarina sulla sopravvivenza dei fibroblasti esposti a danno ossidativo. Questi dati fanno ipotizzare un'applicazione in vivo sulle patologie cardiovascolari soprattutto nella prevenzione.

### **Bibliografia**

- Alesiani D, Cicconi R, Mattei M, Montesano C, Bei R, Canini A. Cell cycle arrest and differentiation induction by 5,7-dimethoxycoumarin in melanoma cell lines. *Int J Oncol.* 2008; 32: 425-434.
- Kim DS, et al. Kaempferol protects ischemia /reperfusion-induced cardiac damage through the regulation of endoplasmic reticulum stress. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008; 30: 257-270.
- Khoo CW, Tay KH, Shantsila E, Lip GY. Novel oral anticoagulants. *Int J Clin Pract.* 2009 Feb 14. Epub ahead.
- Mojžišová G, et al. Effect of Flavonoids on Daunorubicin-induced Toxicity in H9c2 Cardiomyoblasts. *Phytother Res.* 2008; 23: 136-139.



## **Analisi della variabilità genetica in ecotipi laziali di Fagiolo e Cicerchia**

*S. Micali<sup>1</sup>, M.T. Dettori<sup>1</sup>, E. Bramati<sup>2</sup>, E. Vendramin<sup>1</sup>, J. Giovinazzi<sup>1</sup>, R. Quarta<sup>1</sup> e I. Verde<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura Via di Fioranello, 52 00134 ROMA*

<sup>2</sup>*Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”*

### **Introduzione**

La globalizzazione dei mercati e l'omologazione delle produzioni agricole sono tra le cause che hanno determinato la scomparsa di un gran numero di varietà vegetali appartenenti alla tradizione popolare. A partire dalla seconda metà del XX secolo si è assistito ad una progressiva diminuzione della diffusione di molte specie di interesse agrario, un tempo ampiamente coltivate ed utilizzate per l'alimentazione umana, che oggi rischiano l'estinzione (Negri 2002). Il rischio di perdere a livello mondiale la diversità genetica è stato più volte denunciato negli ultimi decenni e proprio per evitarlo è stato promulgato nel 2001 il “Trattato internazionale della FAO sulle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura”. Questo documento pone l'accento su come la biodiversità vegetale sia una delle maggiori risorse naturali di cui l'uomo dispone e su come lo sfruttamento eccessivo e non razionale in agricoltura possa portare a gravi conseguenze.

Per quanto riguarda le leguminose è stato stimato che la diversità genetica ha subito un decremento pari a circa il 60% tra il 1950 ed il 1993 (Hammer *et al.*, 1996). Questa perdita di variabilità è avvenuta a scapito quasi esclusivo degli ecotipi locali rapidamente soppiantati dalle nuove cultivar, più produttive, introdotte sul mercato dalle grandi multinazionali sementiere. La sopravvivenza degli ecotipi autoctoni è attualmente relegata ad areali con particolari condizioni pedoclimatiche in cui operatori, perlopiù anziani, praticano ancora forme di agricoltura tradizionali. In molti casi la sopravvivenza del germoplasma autoctono è favorita dall'isolamento geografico, dall'isolamento legato a minoranze etniche, dal consumo rituale e terapeutico (Negri 2003; Piergiovanni, 2003). Gli ecotipi locali trovano un grande apprezzamento da parte dei consumatori, sempre più informati ed attenti e costituiscono una produzione di pregio in grado di avere un buon mercato.

Negli ultimi anni sono state promosse azioni volte alla valorizzazione dei prodotti locali ed alla salvaguardia delle risorse vegetali. Tra gli strumenti utili a tale fine sono le denominazioni di origine ed i marchi di qualità (D.O.P-Denominazione di Origine Protetta., I.G.P-Indicazione Geografica Protetta) riconosciuti a livello comunitario come mezzo per valorizzare e tutelare i prodotti tipici.

Scopo del presente lavoro di ricerca è stato la caratterizzazione attraverso l'uso di marcatori molecolari di ecotipi laziali di fagiolo e cicerchia al fine di ottenere un profilo genetico unico e distintivo di ciascuna popolazione locale.

## **Materiali e Metodi**

### *- Fagiolo (*Phaseolus vulgaris*)*

Sei popolazioni locali di ‘Cannellino di Atina’ provenienti da aziende diverse [(Bastianelli (At-BS), Gian Andrea (At-GN), Tavolieri (At-TV), Morelli (At-MR), Cannellino A (At-A), Cannellino B (At-B)] sono state messe a confronto con il ‘Cannellino di Sulmona’ (Sul) e con altri sette ecotipi laziali di *P. vulgaris* [‘Verdolino’ (Verd), ‘Purgatorio’ (Purg), ‘Giallo’, ‘Cocco’ ‘Ciavattone’ (Ciav), ‘Solfarino’ (Solf), ‘Borlotto della Regina’ (BoRe)]. Il DNA è stato estratto da 16 individui per ciascuna accessione mediante il DNAesy Plant Minikit della Qiagen. Per le analisi molecolari sono stati utilizzati 12 marcatori microsatellite (SSR) pubblicati da Lioi et al. nel 2005. I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi capillare su sequenziatore automatico a 8 canali (CEQ8000, Beckman Coulter) e i frammenti sono stati analizzati tramite il software annesso. I dati molecolari espressi come matrice binaria (presenza/assenza dei frammenti) sono stati analizzati con il software NTSYS 2.11X.

### *- Cicerchia (*Lathyrus sativus*)*

Due ecotipi di Campodimele [‘Campodimele 1’ (Cdm1) e ‘Campodimele 2’ (Cdm2)] sono stati messi a confronto con 9 altri ecotipi di origine diversa: CTE1, CTE2, CTE3, CTE4, CTE5, CTE6, CTE7, Ecotipo 6 (Eco6), Rieti 9 (Rie9), Rieti 15. Il DNA è stato estratto dalle foglie di 8 individui per ciascun ecotipo mediante il DNAesy Plant Minikit (Qiagen). La caratterizzazione molecolare è stata effettuata utilizzando 10 decameri RAPD della Operon Technologies (OPM1, OPA20, OPF1, OPF4, OPF6, OPF7, OPF8, OPF9, OPF10, OPF11) e i prodotti di amplificazione sono stati risolti mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Le matrici di similarità e i raggruppamenti gerarchici sono stati ottenuti tramite il software NTSYS 2.11X.

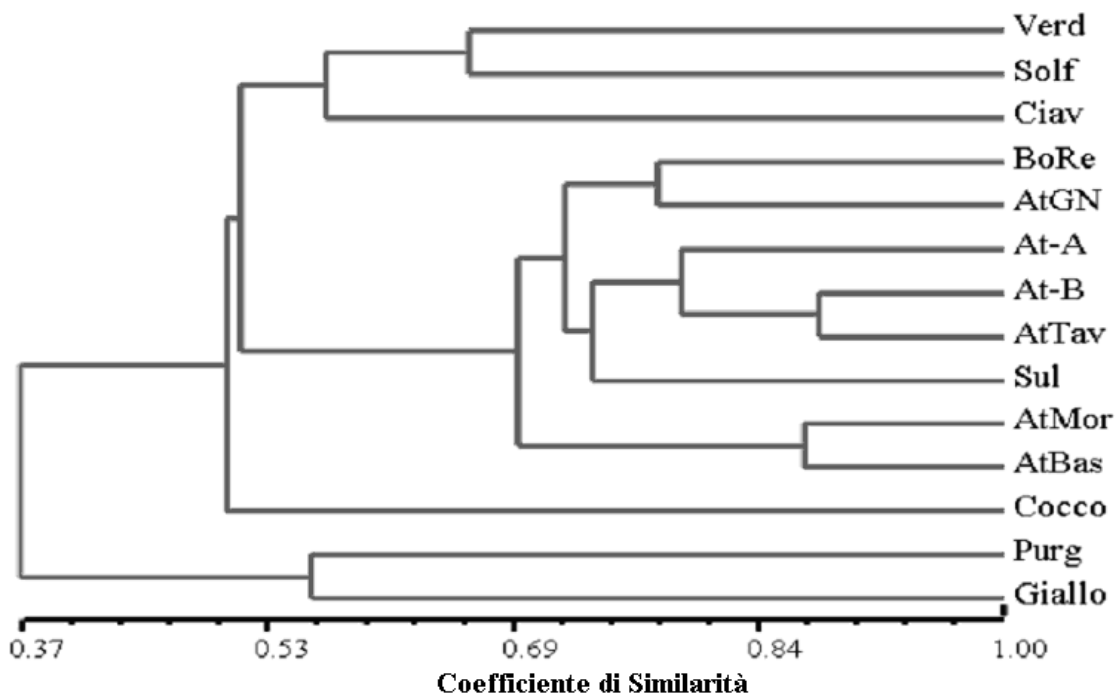
## **Risultati e Discussione**

### *- Fagiolo*

I profili molecolari a livello dei loci microsatellite analizzati sono stati ottenuti separatamente per ciascuno dei 16 campioni provenienti dai 14 ecotipi saggiati. I dati molecolari sono stati trattati sia individualmente, per effettuare un confronto tra i singoli campioni, che come set unico per ciascun ecotipo in modo da annullare la variabilità interna e mettere in evidenza la variabilità esistente tra le popolazioni.

In Figura 1 è mostrato il dendrogramma relativo all’analisi tra gli ecotipi. Tutti i cannellini saggiati possiedono una loro identità genetica distaccandosi dagli altri tipi ad un coefficiente di similarità di circa 0,51 con un ramo nel quale si inserisce la popolazione dei ‘Borlotti della Regina’. All’interno di questo cluster i diversi ecotipi mostrano una similarità genetica piuttosto elevata che va da un

minimo di circa il 69% ad un massimo di circa l'88%, anche se ciascuna popolazione rimane distinta dall'altra. I cannellini di Sulmona occupano una posizione intermedia all'interno di questo cluster e si separano ad un coefficiente di circa 0,74 dal gruppo degli Atina A, B e Tavolieri con cui risultano essere più simili. I cannellini di Atina provenienti dalle aziende Morelli e Bastianelli sono raggruppati invece in un cluster che risulta essere il più distante dai Sulmona con un coefficiente di similarità di circa 0,69. Gli Atina provenienti dall'azienda Gian Andrea si clusterizzano con i 'Borlotti della Regina' ad un indice di similarità pari a circa il 78%. Le altre popolazioni diverse dai cannellini si distinguono nettamente da questi essendo i 'Purgatorio' e i 'Giallo' separati dagli altri a 0,37, i Cocco a circa 0,49 e il cluster formato da Verdolini, Solfarini e Ciavattoni a circa 0,56.



**Figura 1.** Analisi dei cluster inter-popolazione relativa ai loci SSR

Data la modalità di costruzione di un dendrogramma UPMGA, le distanze fra le singole coppie analizzate non sempre sono immediatamente deducibili dall'osservazione dei cluster ottenuti. Ad esempio, mentre risulta immediatamente visibile che nel cluster che raggruppa tutti i cannellini, il subcluster costituito da AtMor e AtBas è il più distante dal Cannellino di Sulmona, non è altrettanto immediato cogliere che quest'ultimo risulta più simile all'AtBas (0.70, Tabella 1) che non all' At-A (0.68, Tabella 1). Dai singoli valori di similarità ottenuti con l'indice di Nei (Tabella 1) ed utilizzati per ottenere i raggruppamenti gerarchici è possibile effettuare un confronto diretto tra i cannellini di Sulmona ed i vari ecotipi di Atina analizzati. L'Atina dell'azienda Tavolieri e l'ecotipo di Sulmona hanno mostrato l'indice di similarità più elevato essendo risultato pari al 79%.

**Tabella 1.** Matrice di similarità ottenuta con l'indice di Nei (1973) dai dati qualitativi dell'analisi con i 14 marcatori SSR

SIMQUAL coeff=DICE							
	At-A	At-B	AtGN	AtTav	AtMor	AtBas	Sul
At-A	1						
At-B	0.81	1					
AtGN	0.64	0.75	1				
AtTav	0.78	0.88	0.83	1			
AtMor	0.67	0.67	0.67	0.67	1		
AtBas	0.76	0.78	0.74	0.79	0.87	1	
Sul	0.68	0.75	0.76	<b>0.79</b>	<b>0.58</b>	0.70	1

### *-Cicerchia*

La cicerchia è una specie ancora poco studiata e pertanto non esistono marcatori molecolari specifici. Trattandosi di una leguminosa, sono state inizialmente effettuate delle prove di amplificazione con marcatori microsatelliti isolati in fagiolo (Lioi et al, 2005) ed in pisello (Tar'an et al, 2005), ottenendo tuttavia scarsi risultati. Per questo motivo si è utilizzato l'approccio della genotipizzazione tramite marcatori RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) che sono tra i marcatori molecolari più utilizzati in lavori di fingerprinting.

In tabella 2 sono riportati i risultati della genotipizzazione in termini di numerosità di bande ottenute e di percentuale di polimorfismo riscontrata per ciascun marcatore analizzato.

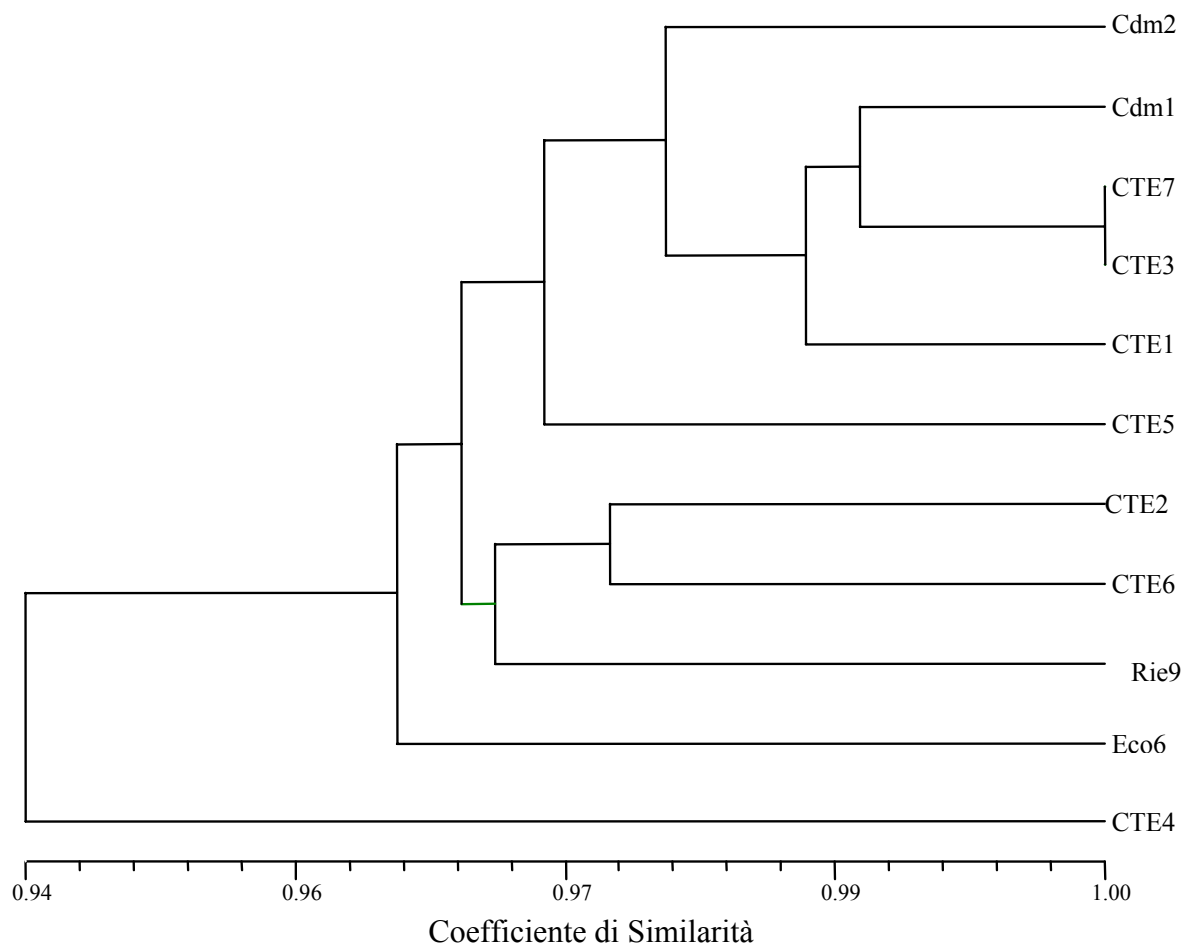
**Tabella 2.** Marcatori RAPD: numero e polimorfismi ottenuti

Primer RAPD	Bande/primer	Bande polimorfiche (%)
OPM1	7	71.4
OPA20	20	90.0
OPF1	16	93.3
OPF4	11	81.8
OPF6	21	100.0
OPF7	10	100.0
OPF8	14	78.6
OPF9	22	90.9
OPF10	16	75.0
OPF11	20	100.0
Tot	157	90.4

Mediante l'uso dei 10 decameri riportati in tabella sono stati ottenuti un totale di 157 frammenti di cui il 90,4% è risultato polimorfico. Il primer che ha prodotto il maggior numero di frammenti è l'OPF9 (22 frammenti) di cui il 90.9% è risultato polimorfico. La percentuale di polimorfismo riscontrata è stata elevata ed in tre casi (OPF6, OPF7, OPF11) è risultata pari al 100%.

Analogamente a quanto fatto per il fagiolo, i dati di presenza/assenza del marcatore sono stati utilizzati sia per effettuare un confronto interno tra i singoli individui, sia per analizzare le relazioni, a livello di popolazione, esistenti tra i diversi ecotipi analizzati.

In figura 2 è riportato il dendrogramma relativo all'analisi dei cluster tra i diversi ecotipi di cicerchia. In generale si osserva che la variabilità esistente tra le popolazioni è molto ristretta. Infatti l'indice di similarità dell'albero ha il suo valore minimo a 0,94 a cui si separa l'ecotipo CTE4 ed il suo massimo a 1,00, con le popolazioni di CTE7 e CTE3 che non vengono distinte l'una dall'altra. Entrambi gli ecotipi di Campodimele si separano sia da tutti gli altri che tra loro. In particolare il Cdm2 forma un ramo a sé a circa 0,97 mentre il Cdm1 si stacca da tutti gli altri a oltre 0,99 di similarità. La similarità genetica della cicerchia di Campodimele rispetto alle altre popolazioni saggiate è stata confermata anche dall'analisi dei cluster effettuata sui singoli individui. Infatti, pur condividendo un'alta similarità genetica con tutti gli altri, gli 8 campioni delle due popolazioni Cdm risultano raggruppati insieme.



**Figura 2.** Analisi dei cluster tra gli ecotipi di cicerchia ottenuta tramite marcatori RAPD

## Conclusioni

Il presente lavoro di ricerca rappresenta un punto di partenza ed un valido aiuto per tutti coloro che siano interessati alla conservazione ed alla valorizzazione del germoplasma di fagiolo e cicerchia.

Per quanto riguarda il fagiolo è stata accertata la variabilità esistente tra le popolazioni laziali autoctone, informazione utile per eventuali programmi di miglioramento genetico delle varietà coltivate, ed è stata verificata la possibilità che ecotipi d'*elite*, quali il cannellino di Atina, possano essere tipizzati geneticamente al fine ultimo di recuperarne e mantenerne il germoplasma originario attraverso l'attribuzione di eventuali marchi di tipicità.

Per quanto riguarda la cicerchia, le analisi molecolari hanno messo in evidenza il ristretto grado di variabilità genetica esistente tra tutti gli ecotipi analizzati.

## **Bibliografia**

- Hammer K., Knüpffer H., Xhuveli L., Perrino P. (1996). Estimating genetic erosion in landraces. Two case studies. *Genet. Resour. Crop. Evol* 43, 329-336.
- Lioi L., Piergiovanni , Pignone D., Puglisi S., Santantonio M. and Sonnante G. (2005) Genetic diversity of some surviving on-farm Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. *Plant Breeding* 124: 576-581
- Negri V., Tosti N. (2002). *Phaseolus* genetic diversity maintained on-farm in central Italy. *Genet. Resour. Crop. Evol* 49, 511- 520
- Negri V. (2003). Landraces in central Italy: where and why they are conserved and perspectives for their on-farm conservation. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 50, 871-885.
- Piergiovanni A. R. (2003). La promozione delle vecchie varietà locali come strategia per la salvaguardia del germoplasma autoctono. CNR Bari.
- Tar'an B., Zhang C., Warkentin T., Tullu A., and Vandenberg A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48: 257–272

## **Proprietà nutrizionali e salutistiche di ecotipi di leguminose del Lazio**

*Stefania Ruggeri, Altero Aguzzi, Loretta Gambelli, Vittorio Vivanti*

*Istituto Nazionale di Ricerca per gli alimenti e la Nutrizione-Via Ardeatina, 546-00178 Roma-.*

L'attività di ricerca dell'Unità Operativa INRAN è stata rivolta allo studio delle caratteristiche nutrizionali di ecotipi e di alcune linee di lenticchie e cicerchie, al fine di individuare peculiarità degli ecotipi locali del Lazio: Castelluccio, Ventotene, Onano e Campodimele e loro particolari proprietà salutistiche. Lo studio che è stato condotto potrà costituire base utile ai fini dell'etichettatura nutrizionale dei prodotti.

### **Materiali e Metodi**

#### **Campioni**

Nello studio sono stati analizzati nove campioni di lenticchie: 3 ecotipi (Onano, Ventotene e Castelluccio) una cultivar canadese (Eston 26) e quattro linee Icarda provenienti da Viterbo. Per le cicerchie sono stati analizzati nove campioni: due campioni di cicerchia di Campodimele appartenenti a due diversi produttori locali e sette campioni di cicerchie del germoplasma di Viterbo.

#### **Macronutrienti**

I contenuti di acqua, proteine, amido, lipidi, ceneri sono stati determinati secondo i metodi AOAC 2002. La fibra totale è stata determinata secondo il metodo enzimatico-gravimetrico AOAC (Prosky et al., 1988).

Gli zuccheri solubili: glucosio, saccarosio, rafinosio, stachiosio, e verbascosio sono stati estratti in acqua e i loro livelli determinati mediante cromatografia a scambio anionico (Gambelli et al., 1999). Tutte le analisi sono state condotte in triplicato e in ogni procedura utilizzati campioni certificati per valutare l'accuratezza delle analisi.

#### **Micronutrienti**

I contenuti in minerali Ca, Fe, Mn, P, Zn, Na, K, Mg Cu, nei campioni di lenticchie e cicerchie sono stati determinati mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico ICP-AES, previa mineralizzazione del campione mediante idrolisi acida in forno a microonde.



I folati totali negli ecotipi Ventotene Onano, Castelluccio, Campodimele sono stati estratti mediante trattamento “trienzimatico” di Johnston et al. (2001) in presenza di coniugasi di rene porcino preparata secondo Phillips and Wright, 1983. Il contenuto in folati è stato poi determinato mediante metodo microbiologico utilizzando *L. casei* (ATCC 7469) come microrganismo (Wright et al., 2000).

Tutte le analisi sono state condotte in triplicato e in ogni procedura utilizzati campioni certificati per valutare l’accuratezza delle analisi.

## Risultati e Discussione

### *Lenticchie*

La composizione chimica in macronutrienti nei nove campioni di lenticchie allo stato secco è riportata in **Tabella 1**.

**Tabella 1. Composizione chimica dei campioni di lenticchie (g/100g)**

Campioni	Umidità	Proteine	Lipidi	Amido	Zuccheri totali *	Fibra	Ceneri
Castelluccio	9.69 ± 0.51	22.42 ± 0.09c	1.63 ± 0,05c	45,01±3,12	5,08	12.2 ± 0.71c	3.76 ± 0.10
Onano 7	9.83 ± .021	23.81 ± 0.13c	1.07 ± 0,07b	46,00± 2,98	4,95	9.4 ± 0.12b	4.32 ± 0.09
Ventotene	9.51 ± 0.53	25.64 ± 0.33d	1.57 ± 0,08c	47,01±2,23	4,93	9.2 ± 0.02a	3.25 ± 0.08
Eston 26	8.90 ± 0.46	22.49 ± 0.73c	1.66 ±0,05c	48,85±4,78	5,27	10.0± 0.81b	3.36 ± 0.10
LI 3-3	8.92 ± 0.29	21.09 ± 0.54b	1.19 ±0,07b	51,04±3,43	5,46	9.6 ± 0.89a	3.07 ± 0.07
LI 2-2	8.32 ± 0.46	20.35 ± 0.62b	0.97 ± 0,05a	52,68±2,98	3,91	10.2 ± 1.15b	3.30 ± 0.04
LI 13	9.04 ± 0.16	20.97 ± 0.74b	2.50 ± 0,06e	50,65±3,65	5,11	9.1 ± 0.03a	3.18 ± 0.08
Linea 19	8.93 ± 0.41	22.31 ± 0.60c	2.18 ± 0,08d	44,83±2,56	5,82	11.2 ± 0.72c	3.74 ± 0.05
L 12	7.72 ± 0.22	19.67 ± 0.01a	2.83 ± 0,09f	50,54±3,34	5,46	10.7± 0.82b	3.32 ± 0.09

\*come somma dei singoli zuccheri

valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti ( $P \leq 0,05$ )

I campioni di lenticchie possono essere considerati una fonte concentrata di proteine con livelli che variano da 19,67 g/100g nel campione L12 a 25,64 g/100g nell’ecotipo Ventotene.

L’analisi statistica dimostra inoltre che l’ecotipo Ventotene presenta un contenuto significativamente più elevato ( $P \leq 0,05$ ) di proteine, 25.6 g/100g, rispetto agli altri campioni. Gli ecotipi di lenticchie, Castelluccio e Onano, sono caratterizzati anche’essi comunque da buoni livelli in proteine, rispettivamente 22,4 e 23,8 g/100g.

I lipidi nei campioni di lenticchie sono presenti in quantità molto modeste: i loro contenuti variano da 1,0 g/100g nella linea LI 2-2 a 2,8 g/100g nella linea L12.

I carboidrati totali: amido e zuccheri rappresentano più del 50% della composizione chimica in macronutrienti. E’ opportuno però ricordare che i legumi con la cottura assorbono una grande

quantità di acqua (circa 2 volte e mezzo il loro peso secco) per cui la concentrazione dei vari nutrienti si diluisce dello stesso fattore.

I campioni di lenticchie sono un'ottima fonte di fibra alimentare, e in particolare l'ecotipo Castelluccio si presenta particolarmente ricco in fibre: 12,2 g/100g con valori significativamente più elevati ( $P \leq 0,05$ ) rispetto agli altri campioni. I costituenti della fibra presenti nei legumi, con meccanismi diversi, intervengono nella protezione della mucosa intestinale nel colon, nel metabolismo lipidico e glucidico e contribuiscono all'abbassamento dei livelli di colesterolo e di glucosio plasmatici.

Il profilo degli zuccheri solubili è riportato in **Tabella 2**.

Nei campioni di lenticchie, lo zucchero maggiormente presente è lo stachiosio, seguito dal saccarosio, dal verbascosio, dal raffiniosio e infine dal glucosio. Gli zuccheri responsabili della flatulenza -raffiniosio, stachiosio e verbascosio- costituiscono così insieme gli zuccheri principali nelle lenticchie.

La variabilità nei contenuti dei singoli zuccheri risulta comunque piuttosto elevata nei campioni di lenticchie e nessuna differenza significativa ( $P > 0,05$ ) è stata determinata per questi campioni.

**Tabella 2. Zuccheri solubili (g/100g)**

Campioni	Glucosio	Saccarosio	Raffiniosio	Stachiosio	Verbascosio
<b>Castelluccio</b>	0,19±0,011	1,37±0,138	0,48±0,033	2,40±0,069	0,80±0,056
<b>Onano7</b>	0,14±0,014	1,27±0,086	0,69±0,042	2,01±0,297	0,84±0,112
<b>Ventotene</b>	0,16±0,080	1,30±0,068	0,65±0,089	2,43±0,278	0,39±0,032
<b>Eston26</b>	0,20±0,014	1,28±0,074	0,56±0,138	2,40±0,087	0,83±0,038
<b>L I 3-3</b>	0,13±0,019	0,97±0,038	0,66±0,128	2,71±0,237	0,97±0,063
<b>LI 2-2</b>	0,092±0,009	0,84±0,035	0,48±0,78	1,83±0,119	0,65±0,086
<b>LI 13</b>	0,072±0,023	1,26±0,041	0,54±0,28	0,24±0,154	0,83±0,021
<b>Linea19</b>	0,06±0,015	1,31±0,037	0,57±0,075	2,37±0,12	0,94±0,035
<b>L 12</b>	0,13±0,020	1,30±0,050	0,57±0,089	2,42±0,077	0,86±0,043

I campioni di lenticchie analizzati presentano contenuti altamente significativi di molti minerali (**Tabella 3**).

Di particolare interesse sono i contenuti in ferro (range: 17,7-54,2 mg/100g), in calcio (range: 64,5-130,5 g/100g) in zinco (range: 3,7-5,5 mg/100g) ed in rame (range: 0,8-1,2 mg/100g). Occorre evidenziare gli elevati contenuti di ferro e calcio nell'ecotipo di Onano, che presenta inoltre contenuti in Mn, K, Mg e Cu più elevati rispetto agli altri ecotipi e linee di lenticchie in studio.

Al fine di confermare la peculiare ricchezza in microelementi dell'ecotipo di Onano sarebbe necessario effettuare ulteriori misure dei componenti minerali in altri campioni di diversi produttori locali ed effettuare studi della componente minerale in annate diversi di produzione.

**Tabella 3. Contenuti in minerali (mg/100g)**

	Ca	Fe	Mn	P	Zn	Na	K	Mg	Cu
<b>Castelluccio</b>	85,2 ± 4,94	36,2 ± 0,60	1,3 ± 0,03	524,3 ± 16,65	5,5 ± 0,06	9,9 ± 9,77	929,1 ± 19,77	109,5 ± 2,62	1,2 ± 0,07
<b>Onano 7</b>	130,5 ± 10,71	54,2 ± 4,71	1,6 ± 0,13	481,0 ± 41,02	4,5 ± 0,32	6,9 ± 0,98	1000,8 ± 55,02	110,2 ± 8,93	1,2 ± 0,11
<b>Ventotene</b>	65,1 ± 5,18	19,5 ± 2,03	0,9 ± 0,09	397,8 ± 41,26	4,3 ± 0,40	8,9 ± 2,37	811,8 ± 72,57	86,0 ± 8,62	0,8 ± 0,14
<b>Eston 26</b>	75,2 ± 4,71	20,5 ± 1,92	0,8 ± 0,02	387,5 ± 35,19	4,2 ± 0,39	7,1 ± 1,94	935,3 ± 65,34	103,7 ± 8,73	0,9 ± 0,17
<b>LI 3-3</b>	100,2 ± 9,82	25,7 ± 2,96	0,7 ± 0,16	429,1 ± 15,52	3,8 ± 0,15	9,1 ± 1,82	845,8 ± 76,31	96,4 ± 3,94	1,1 ± 0,03
<b>LI 2-2</b>	98,3 ± 10,10	36,6 ± 0,90	1,2 ± 0,15	442,3 ± 17,63	3,7 ± 0,13	8,5 ± 1,32	998,3 ± 60,15	98,1 ± 4,713	0,9 ± 0,06
<b>LI 13</b>	68,3 ± 5,23	34,6 ± 1,33	1,0 ± 1,32	500,1 ± 35,34	3,8 ± 0,28	7,4 ± 0,94	1000,0 ± 61,37	102,1 ± 8,30	0,8 ± 0,17
<b>Linea 19</b>	64,5 ± 4,11	17,7 ± 8,04	0,9 ± 0,11	459,1 ± 29,56	4,1 ± 0,35	7,2 ± 0,89	876,9 ± 55,65	94,5 ± 8,31	0,9 ± 0,12
<b>L 12</b>	88,3 ± 6,76	24,5 ± 0,71	0,8 ± 0,18	483,4 ± 30,12	4,3 ± 0,22	9,0 ± 0,95	962,1 ± 49,84	103,5 ± 4,90	1,2 ± 0,15

I contenuti in folati totali sono riportati in **Tabella 4**.

I legumi sono noti per essere una buona fonte di vitamine del gruppo B e tra queste i folati sono particolarmente interessanti per la loro capacità preventiva nei confronti di gravi patologie congenite e per le malattie cardiovascolari. Lo studio del contenuto in folati nei campioni ha dimostrato che gli ecotipi di lenticchie e cicerchie presentano livelli piuttosto elevati di folati totali con valori medi 480 mcg/100g nelle lenticchie. Tra i campioni di lenticchie l'ecotipo di Ventotene è caratterizzato da livelli in folati totali particolarmente elevati: 545, 5 e significativamente più elevati ( $P \leq 0,05$ ) rispetto agli altri ecotipi di lenticchie e alle altre linee analizzate.

**Tabella 4. Folati totali ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )**

	Folati totali
<b>Castelluccio</b>	439,8 ± 15,2
<b>Onano 7</b>	425,2 ± 10,8
<b>Ventotene</b>	545,5 ± 17,3
<b>Eston 26</b>	496,7 ± 12,2
<b>LI 3-3</b>	540,2 ± 18,3
<b>LI 2-2</b>	466,3 ± 11,5
<b>LI 13</b>	455,6 ± 9,9
<b>Linea 19</b>	498,3 ± 13,4
<b>L 12</b>	489,4 ± 10,1

## Cicerchie

La composizione in macronutrienti nei campioni di cicerchie è riportata in **Tabella 5**.

**Tabella 5.** Composizione chimica di campioni di cicerchie (g/100g).

Campioni	Umidità	Proteine	Lipidi	Amido	Zuccheri totali*	Fibra	Ceneri
<b>Sani 1 - Campodimele</b>	10.40 ± 0.19	24.00 ± 0.54	1.15 ± 0,07b	39,56 ± 2,87	5,91	15.6± 0.52b	3.08 ± 0.06
<b>Sani 9- Campodimele</b>	10.25 ± 0.40	23.71 ± 0.29	0.93 ± 0,06a	41,07 ± 3,11	6,15	15.3± 0.51b	2.81 ± 0.02
<b>Sani 11</b>	10.03 ± 0.71	24.58 ± 1.10	0.63 ± 0,04a	35,89 ± 2,24	5,09	20.6± 0.81e	3.11 ± 0.03
<b>Sani 12</b>	11.81 ± 0.32	24.28 ± 0.71	1.68 ± 0,05c	34,67 ± 3,07	5,36	19.5± 0.45d	2.79 ± 0.04
<b>Sani 13</b>	10.93 ± 0.62	24.21 ± 0.90	1.46 ± 0,07c	39,45 ± 2,77	5,43	16.3 ± 0.55b	2.90 ± 0.06
<b>Sani 14</b>	8.80 ± 0.22	23.76 ± 1.06	1.72 ± 0,08c	38,99± 3,34	5,65	17.7± 0.19c	3.02 ± 0.03
<b>Sani 15</b>	10.36 ± 0.86	23.60 ± 0.59	1.86 ± 0,07d	39,05 ± 4,02	5,35	16.4 ± 0.38b	2.78 ± 0.08
<b>Sani 16</b>	10.45 ± 0.60	23.15 ± 1.18	2,02 ± 0,10e	43,11 ± 4,09	5,61	13.4± 0.49a	2.91 ± 0.06
<b>Buoni 10</b>	10.94 ± 0.10	24.08 ± 0.62	2.06 ± 0,09e	36,90 ± 3,23	5,94	17.8 ± 0.29c	2.88 ± 0.05

\*come somma dei singoli zuccheri, valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti ( $P \leq 0,05$ )

**Tabella 6.** Zuccheri solubili (mg/100g)

Glucosio	Saccarosio	Raffinosio	Stachiosio	Verbascosio
0,13±0,026	1,80±0,022	0,55±0,073	1,89±0,094	1,31±0,013
0,36±0,024	1,72±0,101	0,42±0,062	1,71±0,083	0,16±0,099
0,18 ±0,072	1,55±0,177	0,39±0,037	1,77±0,121	1,30±0,040
0,23±0,039	1,60±0,107	0,41±0,065	1,77±0,056	1,17±0,062
0,17±0,040	1,66±0,065	0,47±0,063	1,96±0,070	1,17±0,084
0,24± 0,039	1,78±0,123	0,50±0,075	2,05±0,051	1,09±0,050
0,18±0,037	1,50±0,059	0,46±0,037	1,79±0,068	1,42±0,021

0,28±0,028	1,69±0,047	0,46±0,051	1,87±0,096	1,29±0,085
0,35±0,100	1,86±0,069	0,48±0,054	1,93±0,024	1,32±0,065

0,17±0,040	1,66±0,065	0,47±0,063	1,96±0,070	1,17±0,084
0,24± 0,039	1,78±0,123	0,50±0,075	2,05±0,051	1,09±0,050
0,18±0,037	1,50±0,059	0,46±0,037	1,79±0,068	1,42±0,021
0,28±0,028	1,69±0,047	0,46±0,051	1,87±0,096	1,29±0,085
0,35±0,100	1,86±0,069	0,48±0,054	1,93±0,024	1,32±0,065

I campioni di cicerchie presentano mediamente contenuti più elevati in proteine rispetto ai campioni di lenticchie (valore medio= 23,9 g/100g) e gli ecotipi di Campodimele non presentano alcuna differenza significativa ( $P > 0,05$ ) rispetto agli altri campioni analizzati.

Nelle cicerchie i lipidi presentano livelli leggermente inferiori rispetto ai campioni di lenticchie che variano da 0,6 nella linea Sani 11 a 2,1 /100g nel campione Buoni 10.

Le cicerchie sono caratterizzate da contenuti in fibra alimentare elevati che raggiungono i 20.6 g/100 nel campione Sani 11. I due campioni provenienti da Campodimele, Sani 1 e Sani 9, hanno contenuti mediamente elevati in fibra: 15 g/100g. I livelli in fibra nei campioni di cicerchie sono particolarmente elevati se confrontati con tutte le altre specie di legumi (piselli, fagioli, fave, ceci). Sarebbero quindi necessari ulteriori studi volti alla valutazione dell'indice glicemico di questi legumi e sugli effetti in vivo sul metabolismo glucidico e del colesterolo.

In tutti i campioni di cicerchie, lo zucchero principale è rappresentato dal saccarosio seguito dallo stachiosio, verbascosio, raffiniosio e infine dal glucosio. Tra i campioni di cicerchia infine, il campione Sani 1 proveniente da Campodimele presenta livelli totali di raffiniosio, stachiosio e verbascosio inferiori rispetto agli altri campioni di cicerchie.

I contenuti in minerali nei campioni di cicerchie sono riportati in **Tabella 7**.

Da una prima analisi della componente minerale emerge che i campioni di cicerchie presentano contenuti in minerali tendenzialmente più elevati rispetto ai campioni di lenticchie e che i campioni Sani 1, Sani 9- ecotipi di Campodimele- e il campione Sani 14 sono caratterizzati da contenuti in calcio, ferro, zinco e rame particolarmente elevati rispetto agli altri campioni di cicerchie.

**Tabella 7.** Contenuti in minerali (mg/100g)

	Ca	Fe	Mn	P	Zn	Na	K	Mg	Cu
<b>Sani 1- Campodimele</b>	147,2 ± 3,93	54,7 ± 0,60	1,2 ± 0,03	560,4 ± 16,65	4,5 ± 0,07	10,9 ± 3,77	978,1 ± 18,77	134,5 ± 1,64	1,5 ± 0,08
<b>Sani 9 Campodimele</b>	138,9 ± 11,71	34,2 ± 5,41	1,3 ± 0,14	481,0 ± 39,02	4,5 ± 0,32	6,9 ± 0,98	1112,8 ± 55,02	110,2 ± 8,93	1,2 ± 0,11
<b>Sani 11</b>	65,1 ± 5,18	19,5 ± 2,03	0,9 ± 0,09	397,8 ± 41,26	4,3 ± 0,41	7,9 ± 1,25	813,9 ± 65,47	85,0 ± 7,69	0,8 ± 0,15
<b>Sani 12</b>	87,2 ± 3,41	19,5 ± 1,85	0,8 ± 0,02	476,5 ± 44,18	3,9 ± 0,45	6,7 ± 1,87	1045,3 ± 67,76	99,7 ± 8,84	1,3 ± 0,18
<b>Sani 13</b>	99,2 ± 5,86	45,7 ± 3,33	0,9 ± 0,18	500,5 ± 16,56	4,0 ± 0,17	10,1 ± 1,55	835,7 ± 76,07	89,7 ± 2,94	1,0 ± 0,05
<b>Sani 14</b>	144,6 ± 11,09	52,7 ± 1,11	1,3 ± 0,17	532,7 ± 15,89	4,5 ± 0,10	9,5 ± 1,30	997,3 ± 59,78	100,7 ± 9,12	1,4 ± 0,06
<b>Sani 15</b>	88,3 ± 8,24	49,6 ± 1,56	1,1 ± 1,30	467,1 ± 26,67	4,2 ± 0,25	9,6 ± 1,00	108,0 ± 51,47	98,1 ± 6,27	0,8 ± 0,11
<b>Sani 16</b>	72,5 ± 5,11	35,7 ± 4,04	0,9 ± 0,15	545,2 ± 30,45	4,5 ± 0,45	8,2 ± 0,77	976,9 ± 67,25	100,5 ± 9,38	0,8 ± 0,11
<b>Buoni 10</b>	89,53 ± 5,77	44,5 ± 1,25	0,8 ± 0,15	476,3 ± 35,13	4,4 ± 0,23	10,3 ± 2,77	971,1 ± 3,65	90,7 ± 3,91	1,2 ± 0,15

I contenuti in folati dei campioni di cicerchie sono riportati in **Tabella 8**. Le cicerchie presentano livelli in folati che variano da 560 nel campione Sani 15 a 634,8  $\mu\text{g}/100\text{g}$  nel campione Sani 1. Da una prima analisi dei campioni sottoposti a cottura risulta inoltre che circa il 70% dei folati presenti sono trattenuti nel campione e quindi disponibili all'assorbimento. Le cicerchie quindi possono essere annoverate tra le principali fonti di folati nella dieta.

**Tabella 8.** Folati totali ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )

	<b>Folati totali</b>
<b>Sani 1 - Campodimele</b>	634,8 $\pm$ 14,3
<b>Sani 9- Campodimele</b>	577,4 $\pm$ 12,2
<b>Sani 11</b>	611,3 $\pm$ 10,7
<b>Sani 12</b>	586,2 $\pm$ 11,2
<b>Sani 13</b>	599,4 $\pm$ 9,98
<b>Sani 14</b>	645,2 $\pm$ 18,7
<b>Sani 15</b>	560,4 $\pm$ 11,4
<b>Sani 16</b>	567,5 $\pm$ 13,5
<b>Buoni 10</b>	600,7 $\pm$ 11,4

I dati ottenuti da questo studio potrebbero essere utilizzati come base utile per l'etichettatura nutrizionale degli ecotipi Castelluccio, Onano, Ventotene e Campodimele e per opuscoli che evidenzino le loro peculiarità. Ai fini dell'etichettatura nutrizionale sarebbe comunque opportuno effettuare altre campionature in diverse annate di produzione per verificare i risultati ottenuti in questo studio.

### **Conclusione e Prospettive di studio**

Lo studio degli ecotipi è oggi in via di completamento e sono in via di completamento le analisi sui contenuti dei macro e micronutrienti degli ecotipi Castelluccio, Onano e Ventotene utilizzati in ricette tipiche dei luoghi di provenienza, per valutare le loro caratteristiche come prodotti al consumo. Dallo studio delle componenti nutrizionali è emerso che le cicerchie sono caratterizzate da contenuti particolarmente elevati in fibra, minerali e folati e quindi sarebbe necessario un ulteriore approfondimento sulle proprietà nutrizionali di questo legume ancora poco oggetto di studio e conosciuto.

## **Bibliografia**

- AOAC, 2002. Official Methods of Analysis. Vol I-II.17<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemist, Arlington VA.
- Gambelli L, Manzi P., Panfili G., Vivanti V., Pizzoferrato L. 1999. "Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy". Food Chemistry, 66, 353-358.
- Prosky L, Asp NG., Schewizer TF, De Vries J.W. and Furda I. 1988. "Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products. interlaboratory study". J. Ass. Off. Anal. Chem. 71: 1017-1020.
- Johnston, K. E., D. B. Dienzo, and T. Tamura. 2001. Folate content of dairy products measured by microbiological assay with trienzyme treatment. J. Food Sci. 61(2):817- 820.
- Phillips, D. R., and A. J. A. Wright. 1983. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to folate vitamin in food. Br. J. Nutr. 49:181-186.

***Ringraziamenti:***

*Si ringrazia la Sig.ra Montoro Adalgisa, il Sig. Roberto Targa, l'ing. Carlo Giannandrea e l'omgrafica srl - Roma.*



Le banche del seme, gli orti botanici, le coltivazioni *in situ* ed *ex situ*, essenziali ai fini della tutela, rischiano di restare azioni anonime se non accompagnate da pratiche di conservazione attiva che facciano sì che le specie caratterizzate tornino ad essere presenti nell'attualità dell'offerta gastronomica, con le loro varietà di gusti e caratteristiche organolettiche.

