

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Agro-ambientali  
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Vegetali e Microbiche

# **Risposta del Basilico (*Ocimum basilicum* L.) alla tossicità da Boro**

**Relatore:** prof. Alberto Pardossi

**Correlatrice:** Dr. Lucia Guidi

**Candidato:** William Vacca

Anno accademico 2012/2013

### **Dichiarazione**

*Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.*

*William Vacca*

---

“L’aspetto esteriore di una pianta è solo metà della sua realtà”

(Johann Wolfgang von Goethe)

# INDICE

Riassunto.....	5
Summary .....	7
<b>CAP.1 PARTE INTRODUTTIVA .....</b>	<b>9</b>
1.1 Il Basilico .....	9
Caratteristiche botaniche .....	9
Il Basilico dolce .....	13
Il Basilico come pianta officinale .....	17
1.2 Il metabolismo secondario .....	19
L'acido rosmarinico .....	21
<b>CAP. 2 PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>25</b>
2.1 Introduzione .....	25
La coltura idroponica delle piante officinali .....	25
Il Boro .....	26
2.2 Obbiettivi della tesi .....	33
2.3 Materiali e Metodi .....	36
Coltivazione idroponica .....	36
Determinazioni .....	46
2.4 Risultati .....	41
Esperimento 1 .....	41
Esperimento 2 .....	49
2.5 Discussione .....	55
CONCLUSIONI .....	60
BIBLIOGRAFIA .....	61
RINGRAZIAMENTI .....	66

## Riassunto

Il Boro (B) è un elemento essenziale per le piante essendo un costituente della parete cellulare e ricoprendo altre funzioni metaboliche. Soprattutto nei sistemi colturali intensivi come le colture in serra e in idroponica, il B (sotto forma di acido borico) è fornito normalmente con la concimazione e la fertirrigazione. D'altra parte, in molte regioni nel mondo, in particolare nel Bacino del Mediterraneo, la contaminazione da B dei terreni e delle acque irrigue (con concentrazioni fino a 15 mg /L) rappresenta una seria minaccia per le colture vegetali e per la produzione di acqua potabile. Elevate concentrazioni di B nelle acque irrigue possono provocare danni sia diretti che indiretti alle coltivazioni in quanto: i) limitano la fotosintesi fogliare (anche a causa della clorosi e necrosi che interessano soprattutto i margini fogliari); ii) espongono a rischio la salute umana quando determinano accumulo di B nelle parti eduli delle piante (soprattutto le foglie), tanto che la Commissione Europea ha fissato la dose massima giornaliera di 10 mg per gli adulti.

Il B viene assorbito dalle radici delle piante come acido borico e tende ad accumularsi nelle foglie vecchie, specialmente ai margini, poiché viene trasportato lungo il sistema di traspirazione e accumulato alla fine della corrente traspiratoria. Invece, in altre specie, come melo, pesco, mandorlo, il B è rimobilizzato attraverso il floema con un meccanismo di trasporto che è legato alla traslocazione di composti come il mannitolo e il sorbitolo in grado di legare l'acido borico. La tolleranza delle piante alla tossicità del B è variabile da specie a specie ed è essenzialmente legata alla capacità delle piante di ridurre l'assorbimento radicale del B grazie a meccanismi di esclusione e di efflusso attivo dalle cellule radicali.

In questa tesi, sono stati studiati gli effetti di diverse concentrazioni (da 0,25 a 20 mg/L) di B nella soluzione nutritiva su piante di basilico dolce (*Ocimum basilicum* L.) coltivate in idroponica (floating system). Negli esperimenti sono state impiegate due diverse varietà di basilico, con foglie verdi ("Tigullio", basilico del tipo "Genovese") oppure rosso-viola ("Red Rubin").

Il basilico a foglia verde è usato soprattutto come pianta aromatica e per la preparazione del pesto (anche su scala industriale), mentre le varietà a foglia rosso-viola vengono solitamente utilizzate come piante ornamentali. Queste varietà sono caratterizzate da un maggior contenuto di antociani (localizzati soprattutto nell'epidermide) e di composti anti-ossidanti come acido ascorbico e glutazione, che giocano un ruolo fondamentale nella foto-protezione e nella tolleranza a stress di varia natura (Landi et al., 2012b, 2013).

In precedenti studi condotti da Landi et al (2012b, 2013) su piante coltivate in idroponica, è stato osservato una minore sensibilità all'eccesso di B (20 mg/L nella soluzione nutritiva)

delle varietà rosso-viola di basilico, come "Red Rubin", rispetto a quelle a foglia verde, come "Tigullio". Il danno fogliare provocato dall'eccesso di B nella soluzione nutritiva consiste in una riduzione della fotosintesi e nella comparsa di clorosi e necrosi fogliari (marginali e internervali) e la sua gravità dipende dalla concentrazione di B nei tessuti fogliari (Landi et al., 2012, 2013). La minore sensibilità delle varietà rosso-viola rispetto a quelle verdi è stata attribuita da Landi et al. (2012 e 2013) principalmente a: i) un maggiore contenuto di sostanze anti-ossidanti (antociani, acido ascorbico, glutatone), osservato anche nelle piante coltivate con una concentrazione ottimale di B nella soluzione nutritiva; ii) una maggiore attività di enzimi anti-ossidanti, come l'ascorbato per ossidasi (APX) e la catalasi, in presenza di un'elevata concentrazione di B nel mezzo di crescita.

Landi et al. (2012b, 2013) hanno studiato soprattutto gli effetti del B sulla fotosintesi fogliare e il possibile ruolo protettivo svolto dai sistemi anti-ossidanti (composti e enzimi) e in particolare degli antociani nei confronti dello stress ossidativo indotto dall'eccesso di B (Landi et al., 2012a). Gli esperimenti di Landi et al. (2012b, 2013) non hanno però chiarito se la maggior tolleranza all'eccesso di B nelle varietà rosso-viola è anche dovuta alla capacità di queste varietà di ridurre l'accumulo di B nelle foglie. Proprio per chiarire questo aspetto sono stati condotti gli esperimenti riportati in questa tesi.

In un primo esperimento, ripetuto due volte, le piante sono state coltivate con due concentrazioni di B (0,25 e 20 mg/L) usando un sistema miniaturizzato di coltura idroponica che ha consentito di determinare il tasso giornaliero di assorbimento idrico e traspirazione fogliare per via gravimetrica, cioè usando una bilancia analitica. Nel secondo esperimento, anch'esso ripetuto due volte, le piante sono state allevate in idroponica con sei diverse concentrazioni di B: 0,25; 5; 10; 15; 20 e 25 mg/L. L'obiettivo di questo esperimento è stato soprattutto quello di valutare la relazione tra la concentrazione di B nella soluzione nutritiva e quella nella linfa xilematica. Nel secondo esperimento è stato determinato anche il contenuto fogliare di fenoli totali e di acido rosmarinico.

## SUMMARY

Boron (B) is an essential element for plants and the importance of its application in intensive cropping systems, such as greenhouse crops and soilless cultures, is well recognized. On the other hand, excess B may occur in soil naturally or as a result of over-fertilization and/or irrigation with water rich in B. In some regions B contamination of groundwater represents a serious constraint to both agriculture and the production of drinking water.

High B concentration in irrigation water could produce both direct and indirect damage to the cultivations: i) by reducing leaf photosynthesis also the chlorosis and necrosis affecting principally leaf margins (leaf scorch); ii) by increasing the B content of edible organs, thus representing a serious threat for human health. Indeed EU fixed the maximum daily intake rate for adult to 10 mg.

B is absorbed by plant roots as boric acid and tends to build up in mature leaves, especially at the margins, because B is transported along the transpiration system and is accumulated at the end of the transpiration flux. However, in other species such as apple, peach, almond, boron can be remobilized by phloem as sugars like mannitol and sorbitol are able to bind boric acid. The plant tolerance to the B toxicity differs from species to species and is generally associated with the ability to reduce B absorption through mechanisms of exclusion and active efflux of B from the root cells.

In this thesis, the effects of different B concentrations (0.25 to 20 mg / L) in the nutrient solution were studied on plants of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in hydroponics (floating system). In the experiments two different varieties of basil were used, with green ("Tigullio", basil of the "Genovese" type) or red-purple leaves ("Red Rubin").

The green-leaved basil is mostly used as an aromatic plant and for the preparation of pesto sauce (even on an industrial scale), while the purple-leaved varieties are usually used as ornamental plants. These varieties are characterized by a higher content of anthocyanins (located mainly in the epidermis) and of anti-oxidant compounds such as ascorbic acid and glutathione, which play a fundamental role in photo-protection and in various types of stress tolerance (Landi et al., 2012b, 2013).

In previous studies conducted by Landi et al. (2012b, 2013) a lower sensitivity to B excess (20 mg / L in the nutrient solution) has been observed for hydroponic-grown red-purple basil varieties such as "Red Rubin", compared to the green-leaved ones such as "Tigullio". The leaf damage caused by the excess of B in the nutrient solution consists in a reduction of photosynthesis and in the appearance of chlorosis and of marginal and internodal leaf necrosis and its severity depends on the concentration of B in leaf tissues (Landi et al., 2012,

2013). The lower sensitivity of the red-purple varieties compared to the green ones has been attributed by Landi et al. (2012 and 2013), mainly to: i) a higher content of antioxidant substances (anthocyanins, ascorbic acid, glutathione), also observed in plants grown with an optimal B concentration in the nutrient solution, ii) an increased activity of anti-oxidant enzymes, such as ascorbate peroxidase (APX) and catalase, in the presence of a high concentration of B in the growth medium.

Landi et al. (2012b, 2013) studied the effects of B on leaf photosynthesis and the possible protective role played in general by the anti-oxidants systems (compounds and enzymes) and in particular by anthocyanins against the oxidative stress induced by an excess of B (Landi et al., 2012a). However, the experiments of Landi et al. (2012b, 2013) have not explained whether the increased tolerance to excess B in the red-purple varieties is also due to their ability to reduce the accumulation of B in the leaves, possibly due to a lower respiratory activity. The experiments reported in this thesis were conducted just to clarify this topic. In a first experiment, which was repeated twice, the plants were grown with two concentrations of B (0.25 and 20 mg / L) using a miniaturized hydroponic system, with the aim to determine the daily rate of water uptake and leaf transpiration by gravimetric measurements, that is using an analytical balance. In the second experiment, which was also repeated twice, the plants were grown in tanks at six different B concentrations: 0.25, 5, 10, 15, 20 and 25 mg / L. The purpose of this experiment was mainly to evaluate the relationship between the concentrations of B in the nutrient solution and in the xylem sap. In the second experiments the leaf content of total phenols and rosmarinic acid was also determined.

## CAP. 1 – PARTE INTRODUTTIVA

### 1.1. IL BASILICO

Il termine “basilico” deriva dal greco e significa “regale”. Il basilico è originario dell’Asia o dell’India e giunse in Europa attorno al XV secolo. Il basilico è una pianta aromatica appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae* che viene usata in cucina e anche nell’industria cosmetica ed erboristica. Le proprietà del basilico sono diverse: stimola la secrezione della saliva, placa i crampi allo stomaco e il vomito, calma il raffreddore e il mal di testa, è antisettico, tonico, lassativo, va bene contro la debolezza muscolare e le punture d’insetti.

È una pianta erbacea annuale, con foglie verdi o viola e fiori piccoli e bianchi; è delicata nei confronti dei climi freddi ma anche troppo caldi, e ha bisogno di abbondante acqua. È una pianta particolarmente esigente e necessita di terreno fresco, permeabile, ben arato, concimato abbondantemente, con annaffiature regolari ma non eccessive. È anche piuttosto sensibile alle patologie, e la difesa è essenzialmente affidata a tecniche agronomiche come l’utilizzo di seme sano ed ampie rotazioni.

#### Caratteristiche botaniche

Il genere *Ocimum* (famiglia delle *Lamiaceae*) comprende almeno 65 specie, la cui classificazione botanica è molto difficoltosa a causa di un’enorme diversità in colore, aroma, composizione chimica e ambiente di crescita. Inoltre, la tassonomia del basilico è complicata per l’esistenza di numerose varietà botaniche, nomi di coltivazione, e chemiotipi all’interno delle specie, che non presentano differenze rilevanti nella morfologia. Tra le specie esistenti, *Ocimum basilicum* L., comunemente noto come “basilico” o “basilico dolce”, è la specie più coltivata, soprattutto per usi alimentari; le piante sono alte 30-40 cm con foglie verdi o violette e fiori bianchi o lilla. Altre specie di *Ocimum* sono:

- 1) *Ocimum canum* L. o *Ocimum americanum* L.. Pianta originaria dell’Africa e dell’India e caratterizzata da un elevato contenuto di trans-metilcinnammato (80%). Il suo aroma ricorda quello della canfora e del garofano. A questa specie appartengono numerose varietà e cultivar, ad esempio “anise”, “cinnamon” e “green ruffles”.
- 2) *Ocimum crispum* L.. Pianta originaria del Giappone.
- 4) *Ocimum gratissimum* L.. Conosciuto anche come basilico arborecente per la maggiore altezza della pianta, è originario del sud-est asiatico dove è una pianta perenne.

5) *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Canfor Basil o African Blu Basil). Pianta il cui olio essenziale presenta un alto contenuto di canfora.

6) *Ocimum sanctum* L. (Holy Basil). Trattasi di una specie nativa della Malesia, Australia, India e Asia molto diffusa ed utilizzata nei paesi induisti ed in particolare in India dove viene chiamato Basilico santo.

7) *Ocimum suave* L.. Pianta che in India e Africa raggiunge 2-3 m di altezza.



*Ocimum canum* L.



*Ocimum crispum* L.



*Ocimum gratissimum L.*



*Ocimum kilimandscharicum L.*



*Ocimum sanctum L.*



*Ocimum suave L.*

## **Il basilico dolce**

L'*Ocimum basilicum* L. è una delle specie più importanti appartenenti al genere *Ocimum*. Questa specie comprende un gran numero di varietà e cultivar con caratteristiche morfologiche distinte e chemiotipi (Simon et al., 1999), che vanno da varietà a tipica foglia verde ("Genovese", foglia di lattuga, "Gigante") a genotipi color porpora (var. *purpurascens*, cultivar "Red Rubin", "Dark Opal") o cultivar al profumo di limone (var. *citriodorum*).

Il basilico è coltivato in tutto il mondo, in campo e in serra, a terra ed anche in idroponica (Miceli et al., 2003). Anche se alcune varietà sono utilizzate come piante ornamentali, il basilico è utilizzato principalmente per le preparazioni alimentari (Makri e Kintzios, 2007). Le foglie verdi fresche di alcune cultivar (per esempio "Genovese") sono comunemente utilizzate per la preparazione del famoso "pesto" italiano, ormai largamente diffuso in tutto il mondo (Miele et al, 2001.).

Il basilico è una pianta erbacea annuale che raggiunge, nei nostri climi, un'altezza di 20-40 cm. In ambienti più caldi assume un portamento arbustivo e può raggiungere anche i 60-70 cm di altezza. Le foglie sono opposte e lunghe da due a cinque centimetri. Sono brevemente picciolate, glabre, di forma ovale-lanceolata; il margine è intero o dentellato. Il colore varia dal verde pallido al verde intenso, oppure è viola o porpora in alcune varietà. I fusti eretti, ramificati, hanno una sezione quadrata come molte delle Lamiaceae, e hanno la tendenza a divenire legnosi e frondosi. I fiori, piccoli e bianchi hanno la corolla di 5 petali irregolari e sono raggruppati in infiorescenze all'ascella delle foglie. Il calice presenta labbro superiore non diviso e labbro inferiore diviso in quattro lobi profondi. La corolla bianca o rossastra ha labbro inferiore non diviso e labbro superiore a quattro lobi ottusi. Gli stami sono sporgenti dal tubo della corolla. I fiori sono ermafroditi e l'impollinazione è entomofila; la fioritura avviene da giugno ad ottobre, il frutto è un achenio (tetrachenio) utilizzato come seme. I semi, di colore nero, hanno forma ovoidale a sezione trasversale triangolare e il peso di 1000 semi è in media di 1,3-1,5 g (Schauer e Caspari, 1997).

Preferisce il clima temperato o temperato-caldo, senza brusche variazioni di temperatura. Rifiuta il sole diretto e cocente dell'estate e in semiombra diventa più aromatica. Per quanto riguarda la temperatura, è molto delicata: cresce bene tra i 15 e i 25 °C, non tollera le temperature inferiori a -2 °C né il gelo. Ha bisogno di luce, infatti nelle aree settentrionali fiorisce meglio in serra o in luoghi protetti e soleggiati. Ha bisogno di acqua abbondante, però un eccesso è controproducente perché ne peggiora la qualità e diminuisce l'aroma e la quantità dell'essenza.



*Coltivazioni di Basilico in campo*

Il miglior terreno per il basilico presenta tali caratteristiche: leggero, spugnoso, sciolto, ben amalgamato, pulito, vangato fino a 45 cm di profondità, spianato, permeabile, ben drenato, umido, abbastanza fresco, irrigabile, silico-argilloso, calcareo-umificato o arenoso, di medio impasto e ricco di sostanze organiche o in decomposizione e concimato abbondantemente. I terreni compatti e argillosi sono inadeguati.

La propagazione si effettua tramite semente che va seminata superficialmente in letto caldo da gennaio a febbraio se si desidera anticipare la coltura, trapiantando poi in marzo in serra e definitivamente in aprile in pieno campo. Alternativamente si può seminare in marzo-aprile in semenzaio proteggendo le plantule con telo plastico o paglia. La temperatura di germinazione è compresa tra 9 e 15 °C o, meglio, fra 13 e 15 °C.



*Coltivazioni di Basilico in serra*

Il trapianto in pieno campo viene effettuato in aprile-maggio (quando non si debbano più temere le gelate) con piantine di circa 10 cm di altezza, circa a 40-45 giorni dalla loro nascita, in giorni nuvolosi e a pomeriggio inoltrato, inumidendo la terra con un'irrigazione prima del trapianto; subito dopo è opportuno effettuare un'altra irrigazione.

Durante i primi giorni del trapianto le piantine dovrebbero essere protette dal sole coprendole con dei vasi. La terra del semenzaio deve essere composta da 2 parti di terra grossa, 2 di torba e 1 di sabbia fine. Le sementi devono essere prima disinfettate in acqua e ipoclorito di sodio. In alternativa basta acqua e aceto. Si può anche seminare ai primi di settembre, coltivando le

piantine durante tutto l'inverno, in situazione di Sud Italia.

Ha apparato radicale superficiale e richiede molto letame, meglio la pollina. É una specie avida di azoto: amalgamare alla fine dell'inverno 40-50 t/ha di letame ben fermentato con 450-900 kg/ha di solfato ammonico, 500-900 di superfosfato di calcio e 200-300 di solfato di potassio. Il solfato di ammonio, in tre volte: alla semina, durante la crescita e 10 giorni dopo il taglio. Si distribuiscono quantità maggiori quando il clima richiede irrigazioni frequenti che dilavano parte di questo concime. Essendo una pianta che produce oli essenziali, richiede una gran quantità di zolfo. Il concime azotato è quello che dà maggior risultato in termini di resa.

La raccolta per usi erboristici o gastronomici si effettua prima che si aprano i fiori; per oli essenziali, in fioritura avanzata, tra luglio e settembre. Nelle coltivazioni industriali, prima che i fiori si siano sviluppati del tutto, tagliando la pianta alla base. Se si é seminato e trapiantato in anticipo, é possibile ottenere due raccolti all'anno: uno in giugno-luglio, tagliando a circa 15 cm dal suolo; l'altro in settembre-ottobre. Si deve continuare a tagliare le infiorescenze per favorire la formazione delle foglie. Per la conservazione invernale in cucina, si devono raccogliere le foglie prima della fioritura: in questo momento la pianta è più ricca di sali minerali. Le piante raccolte al mattino possiedono maggior quantità di oli essenziali rispetto a quelle tagliate di pomeriggio. Non vanno raccolte in ore di forte calore poiché ne aumenterebbero considerevolmente le perdite. Il basilico richiede molta manodopera nell'epoca di semina e di raccolto.

La resa varia tra 10 e 16 t/ha di pianta fresca. Con l'essiccazione rimane il 18-20% del peso iniziale e con la pulitura solo il 10-12%. Tuttavia, con una buona coltivazione si può ottenere anche un 50% in più del peso indicato. La resa in olio essenziale delle foglie e dei rami verdi é molto variabile, oscillando tra lo 0,024% e 0,33%. Le sommità fiorali possono arrivare a contenere fino allo 0,45% di essenza. La varietà foglia di lattuga dà un valore generalmente più alto.

Per quel che riguarda la composizione chimica, 100 g di parte edibile sono composti da: Acqua: 92,3 g; Proteine: 3,10 g; Lipidi: 0,80 g; Glucidi disponibili: 5,1 g; Amido: tracce; Zuccheri solubili: 5,1 g; Fibra; Sodio: 9 mg; Potassio: 300 mg; Ferro: 5,5 mg; Calcio: 250 mg; Fosforo: 37 mg; Tiamina; 0,08 mg; Riboflavina: 0,31 mg; Niacina: 1,10 mg; Vitamina A: 658 µg; Vitamina C: 26 mg. I minerali calcio, fosforo e potassio sono presenti in maggiore quantità rispetto a molte altre spezie. I basilico possiede ottime proprietà antiossidanti e antimicrobiche.

## **Il basilico come pianta officinale**

Le piante medicinali vengono utilizzate in modo specifico per il contenuto di composti bioattivi, che sono prodotti dal metabolismo secondario vegetale, con provati effetti benefici sulla salute umana. Queste sostanze sono note in quanto svolgono un ruolo chiave nei meccanismi di adattamento della pianta all'ambiente, ma generalmente presentano proprietà antiossidanti e spesso agiscono come molecole di difesa che sono sintetizzate dalle piante in risposta a condizioni di stress biotici o abiotici.

Negli ultimi decenni, l'interesse da parte di aziende farmaceutiche verso la produzione di composti bioattivi da piante medicinali è notevolmente aumentato, soprattutto nei paesi sviluppati, in considerazione della sensibilità dei consumatori verso i rimedi di origine naturale. Come conseguenza, la tradizionale raccolta allo stato spontaneo è diventata insufficiente a sostenere la domanda di mercato, e le piante medicinali sono sempre più coltivate su scala commerciale.

Tra le circa 50.000 specie officinali in uso, circa due terzi sono ottenute da raccolte spontanee (Canter et al., 2005). Anche se ciò che viene percepito come naturale è anche percepito come sicuro, il materiale vegetale raccolto allo stato spontaneo è spesso di scarsa qualità o addirittura velenoso (Atanassova et al, 2011; Prasad et al, 2012). Questo rappresenta un problema serio per medici, ricercatori e consumatori, ed è stata la causa di una forte preoccupazione sanitaria pubblica e di una domanda di regolamentazione per l'alta qualità, l'uniformità e la sicurezza dei prodotti di piante medicinali (Stewart e Lovett-Doust, 2003; Atanassova et al., 2011). Una normativa regolamentare è stata introdotta negli ultimi anni nel Nord America e nell'Unione Europea per disciplinare la sicurezza e la qualità specifiche dei preparati a base di erbe aromatiche (Zheng et al, 2006b; Vlietinck et al, 2009). Gli standard di qualità e di sicurezza (ad esempio, le concentrazioni massime consentite di metalli pesanti) sono stati emanati e messi in atto in molti paesi (Rahimi et al., 2012). Inoltre, anche se la raccolta tradizionale dal loro ambiente naturale è ancora una pratica a basso costo in molti paesi in via di sviluppo (Prasad et al., 2012), con la crescente popolarità e la rapida crescita del mercato mondiale per la medicina a base di erbe, la raccolta è diventata un pericolo per gli ecosistemi e per la conservazione delle specie vegetali (è richiesta una particolare attenzione per le specie a rischio di estinzione).

Come conseguenza di questi problemi di sicurezza ed ambientali, le piante officinali attualmente vengono coltivate anche su scala commerciale, anche se rimangono colture minori. Nonostante il recente interesse verso le piante medicinali, che è anche il risultato di

accettazione di nuovi prodotti alimentari e la salute (Ehret et al., 2002) da parte dei consumatori, in Europa solo il 10% delle specie medicinali ad uso commerciale viene coltivato (Canter et al., 2005). Recentemente Prasad et al. (2012) hanno segnalato la necessità di metodi di produzione sostenibili e vitali, mentre Vlietinck et al. (2009) ha evidenziato la necessità di coltivazione controllata per garantire la produzione di sostanze vegetali di alta qualità.

Il basilico è una fonte importante di oli essenziali e di composti fenolici. Gli oli essenziali sono ampiamente utilizzati nell'industria alimentare, farmaceutica, profumiera, nella cosmesi e fitoterapia (Makri e Kintzios, 2007; Hussain et al., 2008). La composizione e la concentrazione degli oli essenziali è ampiamente variabile in dipendenza delle cultivar e condizioni di crescita. Tuttavia, linalolo, cavicolo e metil-cavicolo, eugenolo e metil-eugenolo, estragolo, metil-cinnamato, sono stati tutti segnalati come i costituenti volatili dominanti (Lee et al., 2005; Makri e Kintzios, 2007; Klimánková et al., 2008). Il contenuto relativo di ciascun componente spesso può permettere di distinguere tra le diverse cultivar (Klimánková et al., 2008).

I composti fenolici sono il gruppo di metaboliti secondari più numerosi e distribuiti ubiquitariamente delle piante, con più di 8000 strutture attualmente conosciute (Soobrattee et al., 2005). I fenoli hanno un gran numero di applicazioni terapeutiche, ad esempio per la prevenzione e trattamento delle malattie cardiovascolari, neurodegenerative, diabete, cancro e malattie infiammatorie (Soobrattee et al., 2005, Hinneburg et al. 2006). Le attività medicinali dei composti fenolici sono in gran parte attribuite alla loro capacità antiossidante, alla chelazione di ioni metallici redox attivi, alla modulazione dell'espressione genica e all'interazione con le vie di segnalazione cellulare (Soobrattee et al., 2005 Hinneburg et al. 2006).

La capacità di liberazione dai radicali liberi e l'azione antiossidante dei fenoli sono principalmente dipendenti dal numero e dalla posizione dei gruppi ossidrilici legati all'anello aromatico (Soobrattee et al., 2005 Hinneburg et al. 2006). Tra alcuni dei composti fenolici derivati dell'acido caffeico (CADs) ritroviamo gli acidi, cicorico, cinnamico, p-cumarico, ferulico, rosmarinico e sinapico che sono largamente contenuti nei tessuti del basilico (Jayasinghe et al., 2003; Lee e Scagel 2009; Makri e Kintzios, 2007).

In particolare, l'acido rosmarinico è uno dei più abbondanti composti fenolici antiossidanti accumulati dal basilico (Jayasinghe et al., 2003; Li et al., 2007; Makri e Kintzios, 2007; Juliani et al., 2008; Lee e Scagel 2009). L'acido rosmarinico è ampiamente distribuito nel

regno vegetale, ma rappresenta un caratteristico metabolita secondario in diverse piante medicinali (ad esempio, *Salvia officinalis*, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*) nelle *Boraginaceae* e *Lamiaceae* (Petersen e Simmonds, 2003; Petersen et al., 2009).

## 1.2 IL METABOLISMO SECONDARIO

I benefici effetti medicinali delle piante provengono tipicamente dalla combinazione dei prodotti del metabolismo secondario in esse contenuti. I metaboliti secondari sono composti sintetizzati dalle piante che, a differenza dei metaboliti primari, non svolgono ruoli fondamentali nelle funzioni vitali di base come ad esempio la divisione cellulare, crescita, respirazione, riproduzione; per questo è stata loro attribuita per molto tempo una funzione di scarto, detossificazione, accumulo o eccesso di produzione di vie metaboliche primarie. Kossel (1891) fu il primo a definire questi composti come opposti ai metaboliti primari ed in seguito Czapek (1921) li definì “endproduckt” in quanto sosteneva che derivassero dal metabolismo dell’azoto, grazie a “modificazioni secondarie” quali, ad esempio, le deamminazioni.

Oggi sappiamo che questi composti chimici svolgono un ruolo chiave nelle interazioni delle piante con l’ambiente che le circonda e risultano perciò indispensabili per il mantenimento della specie (Falvo, 2004). Negli ultimi 50 anni la ricerca ha mostrato il loro ruolo centrale nell’ecofisiologia della pianta: in special modo queste molecole, eterogenee dal punto di vista chimico, hanno compiti come la difesa contro erbivori o attacchi patogeni, possono fungere da sostanze allelopatiche e attrattive verso pronubi o organismi simbiotici. Inoltre i metaboliti secondari hanno anche un’azione protettiva contro stress abiotici come quelli associati a shock termici e idrici, esposizione agli UV, cambiamenti nutritivi. Recenti lavori indicano anche un certo ruolo nelle piante come modulatori di espressione genica e nella cascata di segnale (Briskin, 2000).

Numerosi composti secondari hanno però anche un effetto benefico sull’organismo umano, e ciò ha reso molte piante fonte primaria di sostanze naturali di notevole interesse applicativo nel settore alimentare (riguardo ad esempio sapori, colori ed aromi), cosmetico e farmaceutico. Tali principi attivi sono classificati in base ai loro percorsi biosintetici, nelle grandi famiglie molecolari degli alcaloidi, terpenoidi (sesquiterpeni, saponine, carotenoidi e steroidi), fenoli (come tannini, chinoni e lignine), i loro glucosidi e peptidi. Sono anche di interesse gli oli essenziali e le resine, che spesso contengono composti appartenenti alle classi

prima citate (Tyler *et al.*, 1988; Pengelly, 1996). I metaboliti secondari, a differenza di quelli primari che devono essere mantenuti stabili sia per concentrazione che per struttura chimica per assicurare l'integrità strutturale e funzionale delle cellule, hanno un "elevato grado di libertà" per quanto riguarda struttura e concentrazione (Maffei, 1999; Collin, 2001). Ad esempio, il contenuto in flavonoidi nelle piante, oltre che dal genotipo, dipende strettamente dalle condizioni ambientali, soprattutto dalla radiazione luminosa; è noto, ad esempio, che in molte specie le radiazioni UV inducono significativi incrementi nel contenuto fogliare di flavonoidi (Lercari *et al.*, 1997).

I metaboliti secondari sono sintetizzati in quantità molto bassa e rappresentano meno dell'1% del carbonio totale, sono spesso organo o tessuto-specifici, assolvono precise funzioni e sono peculiari nelle diverse specie vegetali. Sono caratterizzati, infatti, da una sorprendente variabilità intra-specifica: comprendono migliaia di composti e solo le recenti tecniche chimico-analitiche hanno permesso di accrescere le nostre conoscenze a riguardo.

Il metabolismo secondario impiega gli stessi enzimi del metabolismo primario, ma anche quelli originatisi in seguito a duplicazioni geniche e variazioni alleliche (Pichersky *et al.* 2000). L'insieme di queste mutazioni ha permesso, nel corso dell'evoluzione, la generazione di un insieme ricco ed eterogeneo di composti secondari.

Si assiste ad un'armoniosa regolazione delle varie vie biosintetiche che sono integrate nel metabolismo primario. Secondo Bu'lock (Maffei, 1999) infatti, l'accumulo di metaboliti primari ha indotto la formazione di "valvole di sfogo" divergenti e la conseguente produzione di migliaia di molecole diverse. Questa risposta è fondamentale per il metabolismo della pianta in quanto l'accumulo di un composto intermedio può avere effetti di inibizione retroattiva, bloccare e rallentare altre vie metaboliche. Mediante la produzione di vie alternative il problema è superato ma si ripresenta nei prodotti finali della via neo-formata. Ecco così che il fenomeno si ripete e nascono nuove vie parallele in grado di "drenare" gli accumuli.

Fra le attività più importanti di alcune molecole c'è quella antiossidante, in grado di contrastare la formazione di ROS (*reactive oxygen species*) e l'azione di enzimi che ossidano membrane cellulari, lipidi e proteine (Martinez-Valverde *et al.* 2000). Molti composti secondari interagiscono con canali ionici di membrana e sono impiegati nella cura dell'asma; vari alcaloidi hanno strutture simili ai neurotrasmettitori endogeni e possono mimarne le attività e fungere così da trasduttori cellulari (Falvo, 2004).

Alcune piante producono composti che stimolano l'attività delle cellule del sistema

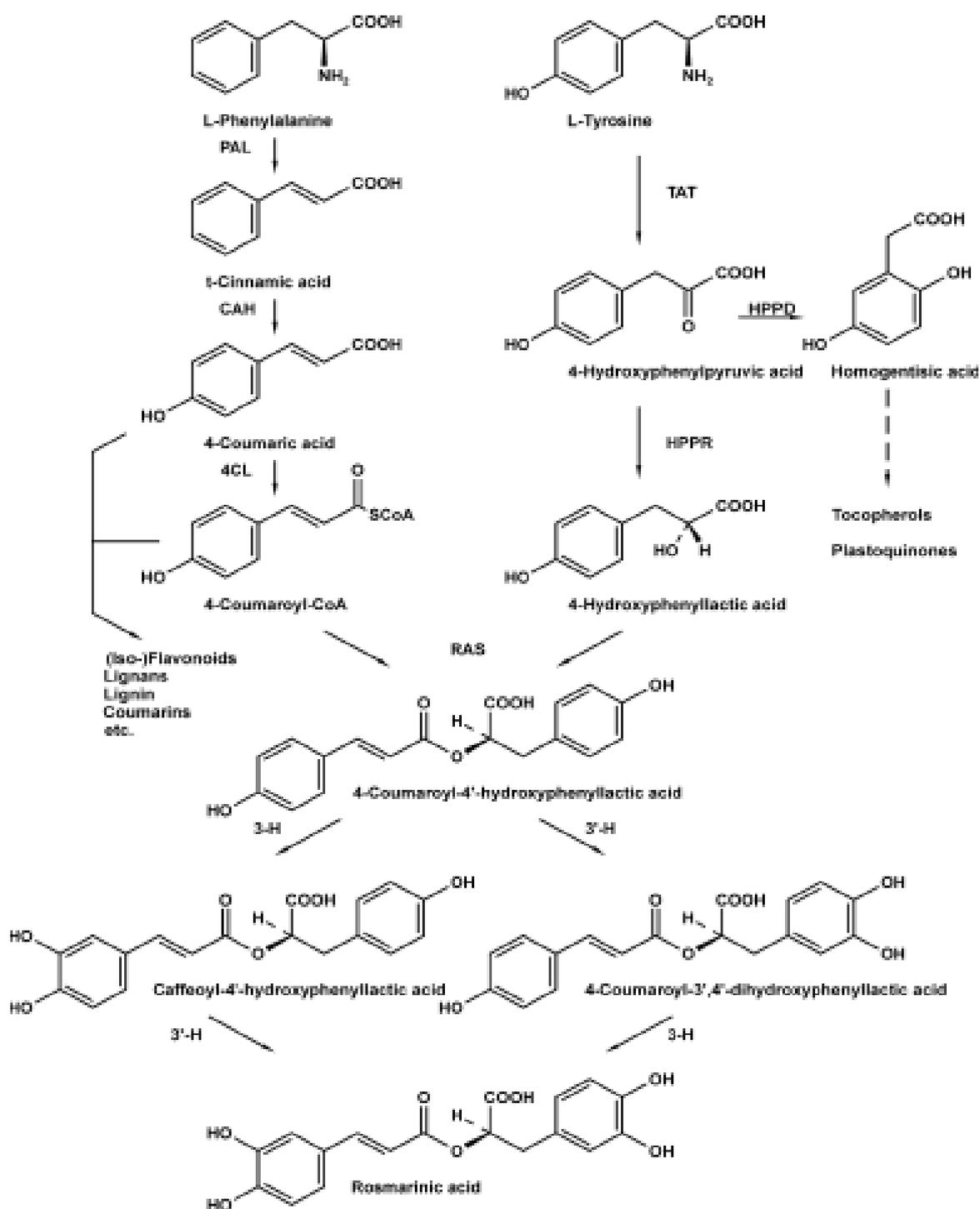
immunitario in modo da renderle più pronte ad affrontare una situazione di pericolo e contenere le infiammazioni. I flavonoidi e gli isoflavonoidi sono responsabili di svariati effetti benefici: prevengono diversi tipi di carcinogenesi (Singh *et al.* 2003) come quella della cavità orale (Sagami *et al.* 1999), della prostata e il cancro al seno (Peeters *et al.* 2003).

Quest'ultima azione è dovuta alle proprietà estrogeniche dei flavonoidi che garantiscono protezione anche nei confronti delle malattie renali croniche quali glomerulo-sclerosi e fibrosi midollare interstiziale (Ranich *et al.* 2001). Inoltre, i flavonoidi riducono il rischio di aterosclerosi e delle malattie cardiovascolari (O'Prey *et al.* 2003), hanno effetti vasodilatatori sulla microcircolazione (Nestel *et al.* 2003) e riducono i livelli di colesterolo LDL nel sangue (Nestel *et al.* 2003). Gli alcaloidi garantiscono bassi livelli di colesterolo e trigliceridi nel sangue, stimolano il sistema immunitario, hanno effetti analgesici, antileucemici, vasocostrittori, molti sono allucinogeni o narcotizzanti (Falvo, 2004). Possiamo quindi considerare le piante (quelli medicinali in particolar modo) come dei contenitori di sostanze chimiche, talvolta isolate ed utilizzate come tali per scopi terapeutici, in altri casi come fonti di materia prima per la produzione di farmaci emisintetici, oppure come base per la produzione di fitoterapici veri e propri.

### **L'acido rosmarinico**

Come derivato dell'acido caffeico, l'acido rosmarinico appartiene alla classe dei fenilpropanoidi (Kurkin, 2013). La molecola è formalmente ottenuta per esterificazione del gruppo carbossilico dell'acido caffeico con il gruppo ossidrilico alfa dell'acido 3,4-diidrossifenilattico. Il composto puro è stato isolato per la prima volta nel *Rosmarinus Officinalis* da Scarpati e Oriente (1958), mentre la via biosintetica (**Figura 1.**) a partire dai precursori tirosina e fenilalanina è stata completamente chiarita molti anni dopo da Petersen e Simmonds (2003). L'acido rosmarinico è un efficiente agente di eliminazione dei radicali liberi. Le proprietà antiossidanti di questo metabolita secondario sono dovute alla presenza di due coppie di gruppi ossidrilici, ogni paio è situato nelle posizioni orto degli anelli benzenici.

Un gran numero di ulteriori attività biologiche sono state descritte ed attribuite all'acido rosmarinico: proprietà astringente, antinfiammatoria, antimutagena, antibatterica e antivirale (Petersen e Simmonds, 2003; Juliani *et al.*, 2008). Come per la maggior parte dei metaboliti secondari delle piante, l'accumulo di acido rosmarinico per un dato genotipo è fortemente influenzato da molti fattori, tra cui le condizioni di crescita e ambientali, stadio di sviluppo, tipo di tessuto ecc (del baño *et al.*, 2003.; Juliani *et al.*, 2008.; Shiga *et al.*, 2009).



PAL= phenylalanine ammonia-lyase; CAH= cinnamic acid 4-hydroxylase,  
 4CL= hydroxycinnamate: coenzyme A ligase; TAT= tyrosine aminotransferase;  
 HPPR= hydroxyphenylpyruvatereductase; HPPD=hydroxyphenylpyruvatedioxygenase;  
 RAS= hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyphenyllactatehydroxycinnamoyltransferase;  
 3-H,30-H= hydroxycinnamoyl-hydroxyphenyllactate 3- and 30 -hydroxylases

**Figura 1.** Via biosintetica dell'acido rosmarinico

Molto diffuso in natura, l'acido rosmarinico è il costituente principale del fitocomplesso delle piante della famiglia delle *Labiatae* dove viene sintetizzato a scopo difensivo, con un picco durante il periodo della fioritura.

Il notevole e crescente interesse scientifico nei confronti dell'acido rosmarinico ha portato ad indagare e a dimostrare le proprietà e le ampie possibilità di utilizzo di tale sostanza; i numerosissimi studi compiuti hanno avvalorato gli impieghi tradizionali degli estratti di piante, note per l'elevata concentrazione in acido rosmarinico, e hanno validato l'inserimento di tale composto funzionale in prodotti salutistici dai molteplici campi di applicazione.

#### Proprietà antimicrobiche

Sono note le proprietà antimicrobiche degli estratti di piante della famiglia delle *Labiatae*, ricche di derivati fenolici dell'acido caffeico. Si distingue appunto l'acido rosmarinico, sia per la naturale elevata presenza nel fitocomplesso sia per le spiccate proprietà inibitorie verso batteri, miceti e virus.

#### Proprietà antinfiammatorie

Numerosi studi hanno confermato le straordinarie proprietà dell'acido rosmarinico quale antinfiammatorio, indagandone anche i possibili meccanismi d'azione. La sua struttura chimica, oltre a farne intuire la spiccata azione antiossidante, fa senz'altro prevedere le sue proprietà antinfiammatorie, per analogia ad altri acidi organici fenolici presenti in natura. La risposta antinfiammatoria dell'acido rosmarinico si esplica sia per uso esterno, sia per uso sistemico (Osakabe e Yasuda 2004). L'efficacia antinfiammatoria degli estratti di *Ocimum sanctum*, ad esempio, è risultata paragonabile a quella dell'ibuprofene, del naproxene e dell'acido acetilsalicilico, ma senza effetti collaterali, la presenza nel fitocomplesso di altri principi funzionali consente infatti di armonizzare e modulare l'azione antinfiammatoria senza i tipici effetti dannosi riportati dai farmaci di sintesi. L'azione dell'acido rosmarinico si esplica anche tramite inibizione della ialuronidasi, enzima responsabile della degradazione dell'acido ialuronico, sostanza polisaccaridica di importanza fondamentale per il tessuto connettivo; tale proprietà conferisce all'acido rosmarinico un ruolo protettore dei tessuti, soprattutto articolari, e si coniuga molto bene con le proprietà antinfiammatorie di tale sostanza.

### Proprietà antiallergiche

L'acido rosmarinico è riconosciuto come il costituente attivo responsabile delle proprietà antiallergiche degli estratti di *Perilla frutescens* (Labiatae), pianta largamente impiegata nella medicina giapponese per la sua efficacia nel trattamento delle problematiche allergiche. Studi preliminari in vivo per confermarne le proprietà, hanno evidenziato efficacia comparabile tra gli estratti di *Perilla* e l'acido rosmarinico in quanto tale, evidenziando perciò che, tra i vari costituenti attivi contenuti nella pianta, l'effetto antiallergico è principalmente legato al suo contenuto in acido rosmarinico. Secondo le indagini sinora compiute, l'acido rosmarinico controlla anche l'iper-reattività delle cellule immunitarie attivate in seguito alla presentazione dell'allergene; quest'azione si esplica in modo estremamente "intelligente": da una parte ne limita la proliferazione, dall'altra favorisce l'eliminazione (apoptosi) il tutto senza danneggiarle in alcun modo quelle in stato di riposo.

### Proprietà antiossidanti

Come già evidenziato, la struttura polifenolica dell'acido rosmarinico gli conferisce marcate proprietà antiossidanti ed anti radicali liberi; come tale ha in generale un ruolo protettivo nei confronti dell'invecchiamento e del danno cellulare. Si ritiene che tale azione sia superiore a quella della vitamina C e della vitamina E (Soobrattee e Neergheen, 2005). L'acido rosmarinico previene la formazione di radicali superossidi e inibisce lo stress ossidativo anche da parte dei composti esogeni, riducendo sia le specie radicaliche dell'ossigeno sia la malondialdeide (MDA), prodotto terminale della cascata radicalica. Un ulteriore studio in vitro ha evidenziato che l'acido rosmarinico protegge efficacemente anche dal danno cellulare indotto da aflatoxina B1 e da un'altra micotossina (ochratoxin A) rallentando la sintesi proteica e la frammentazione del DNA cellulare, fenomeni indotti da queste tossine, dimostrando perciò un'efficace azione citoprotettiva. (Renzulli e Galvano, 2004).

Le virtù dell'acido rosmarinico non finiscono qui, sono state individuate proprietà antidepressive, ansiolitiche, ipoglicemizzanti, fotoprotettive, antitrombotiche e di protezione del sistema nervoso e dei reni.

## CAP. 2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.1. INTRODUZIONE

#### La coltura idroponica delle piante medicinali

L'industria farmaceutica richiede un prodotto con caratteristiche qualitative standardizzate, pulito e facile da trasformare. Per questo motivo la coltivazione intensiva delle piante di interesse farmaceutico sta sempre più sostituendo la raccolta di piante spontanee.

Fra i metodi di coltivazione delle piante officinali ci sono senz'altro le colture fuori suolo.

Le colture fuori suolo comprendono tutti quei sistemi di coltivazione che sono realizzati senza l'utilizzo del terreno e che prevedono l'impiego dell'acqua come veicolo per il trasporto delle sostanze nutritive (da qui il termine *idroponica*, letteralmente "lavoro dell'acqua", dal greco "*hydro*", acqua, e "*ponos*", lavoro).

Si possono distinguere due gruppi di sistemi idroponici: le colture in soluzione nutritiva a radice nuda (senza substrato) e quelle in contenitore su substrato, naturale o artificiale. Fra i substrati maggiormente utilizzati troviamo in ordine d'importanza la torba, la perlite, la lana di roccia, la pomice, il lapillo o altre rocce vulcaniche e la fibra di cocco. Le distinzioni possono essere fatte poi anche sul sistema di irrigazione (irrigazione a goccia oppure subirrigazione) e al recupero o meno della soluzione nutritiva somministrata: se questa non viene recuperata si parla di sistema aperto, altrimenti se viene raccolta, riarricchita e somministrata di nuovo si parla di sistema chiuso.

Oltre ad un aumento della produzione e ad una riduzione dei rischi fitopatologici, le colture idroponiche possono consentire di controllare la sintesi e l'accumulo dei principi attivi d'interesse farmaceutico. Ad esempio, si è visto che modificando la composizione della soluzione nutritiva si può stimolare sia la produzione di biomassa sia la sintesi di metaboliti (Demeyer e Dejaegere, 1989; Letchamo *et al.*, 1993; Aokiet *et al.*, 1997; El-Gengaihi *et al.*, 1998; Magalhaes *et al.*, 1996; Marschner *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1999; Mairepetyan *et al.*, 1999; Briskin *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2001). Importanti studi sulla coltivazione idroponica ad esempio sono stati condotti su *Taxus media* e *Taxus cuspidata* per la produzione di taxolo, un potente chemioterapico (Wickremesinhe e Artega, 1994), e su *Hypericum perforatum*, per la produzione di attivi ipericina, pseudoipericina e di perforina (Murch *et al.*, 2002).

Fra i diversi sistemi idroponici, quello che sembra più adatto alla coltivazione di piante officinali come il basilico è il floating system.



*Un impianto di floating system per la produzione di basilico fresco*

La tecnica del floating system prevede la coltivazione delle piante su pannelli di polistirolo galleggianti in vasche di soluzione nutritiva arieggiata. Si tratta di un sistema idroponico a ciclo chiuso. Sono utilizzati volumi particolarmente elevati di soluzione nutritiva, per assicurare un elevato potere tampone al sistema e ridurre così le escursioni termiche a livello radicale e la necessità di controllare il pH e la concentrazione dei vari elementi nutritivi. È un sistema particolarmente utilizzato per gli ortaggi da foglia per il mercato della IV gamma (lattuga, lattughino, rucola, valeriana, spinacio, indivia ecc.).

Essendo un ciclo chiuso, una concentrazione particolarmente alta di qualche ione tossico o potenzialmente tossico nell'acqua irrigua (utilizzata per la preparazione della soluzione nutritiva) può determinare danni alla coltura. E' questo il caso del B, un elemento essenziale per le piante che però non di rado è presente a concentrazioni alte nell'acqua irrigua.

## **Il Boro**

Il Boro è un elemento metalloide (ha proprietà intermedie tra non metalli e metalli) appartenente al gruppo IIIA della tavola periodica con un numero atomico 5, un PM di 10,81 g/mol e stato di ossidazione +3. Il Boro esiste naturalmente al 19,78% come isotopo B10 e al 80,22% come isotopo B11 (OMS, 1998). Questo elemento è elettrone-carente, possiede un *p*-orbitale vacante; non forma legami ionici, ma forma legami covalenti stabili. I composti del B spesso si comportano come acidi di Lewis, legando facilmente con sostanze ricche di elettroni.

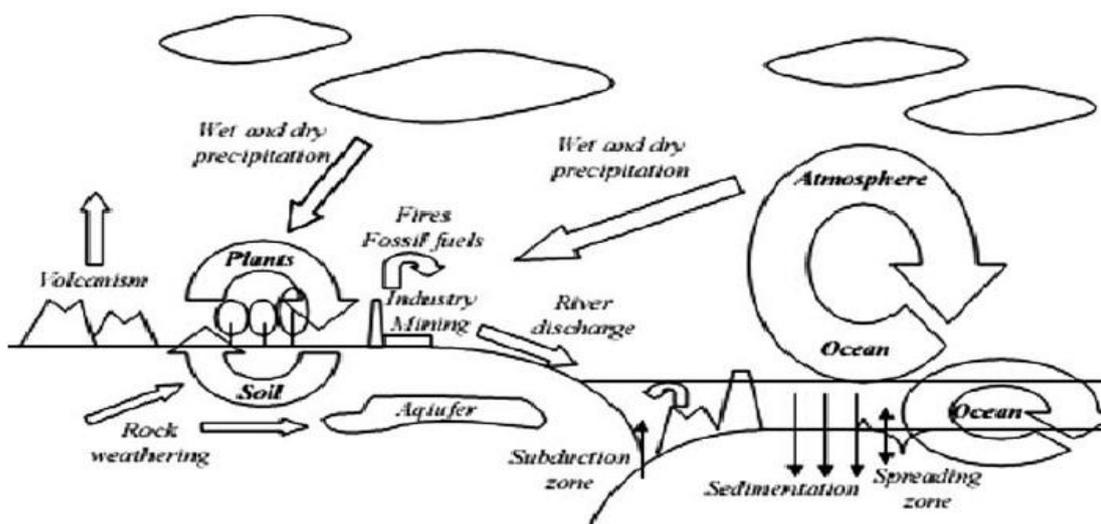
Il B è generalmente presente in natura come ossi-composti: borati, acido borico, ossido di boro e sodio borato che sono generalmente stabili eccetto che per deidratazione ad alte temperature (Boron 1998). L'atomo di B può essere circondato da un'immense quantità di gruppi molecolari tra cui gli acetosili ( $\text{RCOO}^-$ ), i perossidi ( $\text{ROO}^-$ ), gli alogeni ecc. (Johnson, 2005). Mentre la presenza e la ripartizione del B nella biosfera sono state stimate in maniera più o meno precisa (**Tabella 2.1**), tuttavia rimangono ancora molte incertezze sul ciclo del B nell'ambiente.

**Tabella 2.1.** Riserve di boro nella biosfera (Kot, 2008).

Riserve	Contenuto (Kg)
Crosta continentale e oceanica	$10^{18}$
Oceani	$10^{15}$
Acqua di falda	$10^{11}$
Ghiacciai	$10^{11}$
Depositi di carbone	$10^{10}$
Depositi commerciali di B	$10^{10}$
Biomassa	$10^{10}$
Acqua superficiale	$10^8$

Sono stati tre i principali cicli (pianta-terreno, oceano-crosta oceanica e atmosfera-oceano) ad essere individuati da diversi autori (**Figura 2.1**). Ad ogni modo l'entità dei flussi con cui il B si muove attraverso i vari compartimenti della biosfera restano incerti e gli studi effettuati a tal proposito presentano una certa eterogeneità.

Alcuni autori sostengono che la maggiore mobilitazione del B avvenga attraverso le emissioni vulcaniche a scapito delle riserve accumulate nella crosta terrestre ( $0,017-2,10 \times 10^9$  Kg per anno). Comunque, un'imponente mobilitazione del B avviene anche attraverso processi antropologici, principalmente legati all'industria del vetro e dei detersivi ( $0,31-1,36 \times 10^9$  kg per anno). A questo proposito si stima che il consumo industriale del B sia aumentato del 4,7 % dal 2001 al 2005.



**Figura 2.1.** Turn-over del boro nell'ambiente (Kot 2009).

Il B è presente nell'atmosfera in forma gassosa o come particolato e la sua concentrazione può variare tra 0,0002 e 0,3 mg/L (Rose-Koga et al., 2006). Tuttavia, per fini connessi all'attività agricola e alla salute degli esseri viventi, la presenza del B è maggiormente studiata nelle acque ad uso irriguo e nei terreni. La concentrazione di B, nei corsi d'acqua superficiali o nei bacini idrici, in condizioni normali, varia invece tra 0,009 e 0,3 mg/L. Per quanto riguarda l'acqua proveniente da falde sotterranee, il contenuto in B può essere estremamente variabile con concentrazioni che vanno da 0,017 a 1,90 mg/L. Questi valori possono aumentare notevolmente in prossimità di zone con attività geotermica a causa della sua forte concentrazione nelle acque termali (0,2-72 mg/L).

Nell'area Mediterranea, ad esempio, la concentrazione di B nelle acque di falda può arrivare a valori di 3-13 mg/L nelle zone più esposte come (Val di Cornia, Italia) come evidenziato da un recente progetto di ricerca (BOREMED, <http://boremmed.brgm.fr/>). Meno variabile invece è il livello del B nelle acque marine, dove la concentrazione media risulta stabile intorno a 4,5 mg/L (Kot, 2008). La presenza del B in un terreno è fortemente influenzata dal pH della soluzione ricircolante, dalla tessitura, dall'umidità e dalla temperatura (Kot, 2008).

Diversi autori riportano una correlazione positiva fra la disponibilità di B nel terreno e il pH per valori di quest'ultimo compresi tra 3 e 9 (Bingham et al., 1971; Elrashidi e O'Connor, 1982). Il B è molto solubile e viene dilavato facilmente dal terreno (Kot, 2008). Nei terreni argillosi il B viene trattenuto più facilmente, in parte per la maggiore capacità di ritenzione idrica rispetto ai terreni sabbiosi o di medio-impasto, in parte per la capacità delle argille di

formare complessi stabili con questo ione (Mattigod et al., 1985). La presenza di sostanza organica nel terreno costituisce una riserva importante di B, che sarà disponibile per la coltura solo in seguito alla mineralizzazione. Alcuni autori hanno mostrato non solo che la presenza di B nella sostanza organica del terreno può essere superiore a quella della frazione minerale (Yermiyahu et al., 2001; Lemarchand et al., 2005), ma anche che l'assorbimento del B è positivamente influenzato dalla concimazione organica (Yermiyahu et al., 2001).

In generale, le concentrazioni di B nei terreni risultano molto basse, tanto da provocare carenze, nelle aree molto piovose e terreni sciolti, come accade in alcune regioni della Cina, Giappone o USA (Tanaka e Fujiwara, 2008), mentre un eccesso di B si verifica spesso nei climi aridi o semi-aridi come ad esempio nell'area Mediterranea, Cile, Perù (Nord), Sud dell'Australia e California (Kot, 2008; Tanaka e Fujiwara, 2008). Un eccessivo contenuto di B nel terreno dipende anche dalla presenza di acque geotermiche, come già menzionato. Tra tutti i micronutrienti la deficienza in B è una delle carenze nutrizionali più largamente diffuse a causa della sua mobilità nel terreno che lo rende facilmente lisciviabile (Kot, 2008).

Il B è un microelemento essenziale per le piante, riveste un ruolo importante come componente della parete cellulare (grazie alla sua capacità di stabilire legami con le pectine; (Kobayashi et al. 1996; O'Neill et al., 2004) ed è implicato in diversi processi metabolici, come ad esempio il trasporto degli zuccheri, il metabolismo dei fenoli e delle auxine, la regolazione dei flussi idrici all'interno delle cellule. Inoltre è coinvolto nello sviluppo dei tessuti e riveste un ruolo importante nella riproduzione. Questo microelemento è quindi necessario alla nutrizione delle piante ma se è presente a livelli eccessivi nel terreno o nell'acqua di irrigazione può essere fitotossico ed il confine tra il livello di concentrazione considerato ottimale per la crescita ed il livello di tossicità per le piante è molto stretto, come in genere accade per i microelementi.

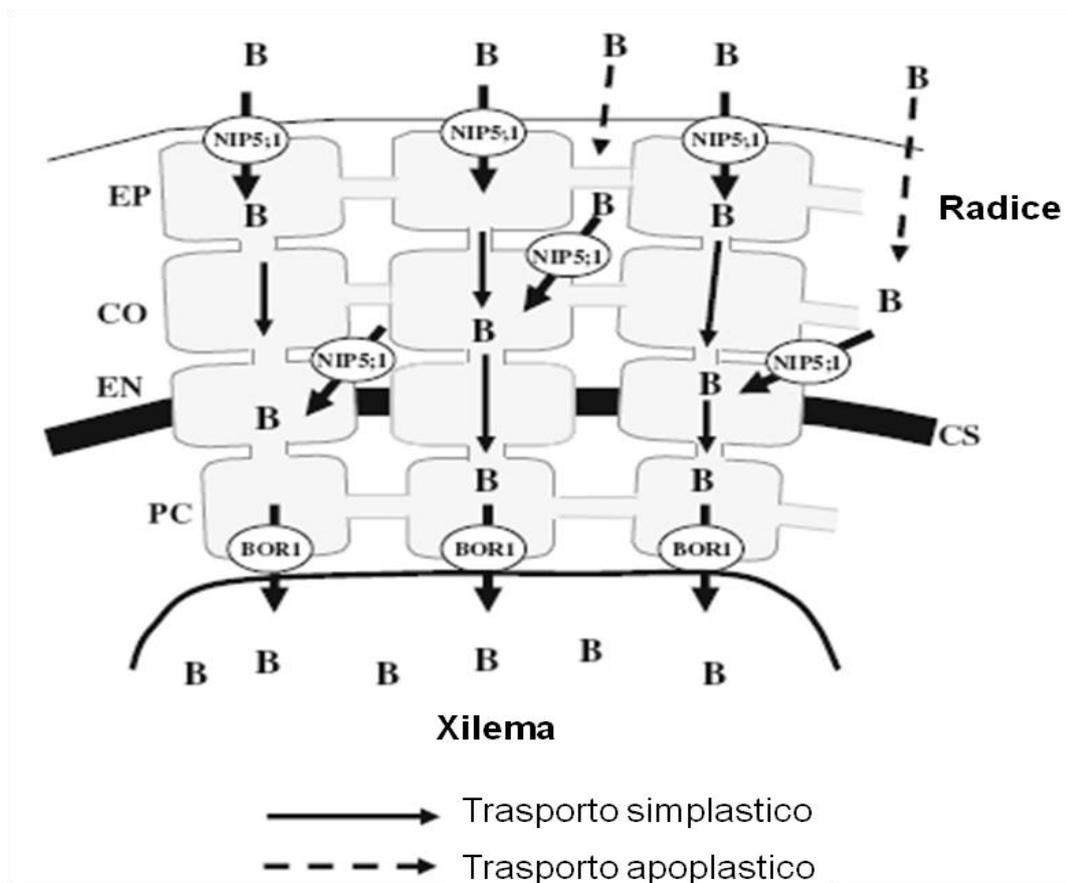
Il B è considerato come un microelemento polivalente nella pianta, essenziale a molti processi metabolici tra cui il metabolismo degli acidi nucleici, carboidrati, proteine, acido indolacetico e fenolo, inoltre favorisce l'integrità delle membrane cellulari ed è un costituente della parete cellulare (Tanaka e Fujiwara 2008).

La carenza di B si manifesta principalmente attraverso una crescita ridotta causata dalla sua scarsità nelle pareti e membrane cellulari. Così, l'espansione fogliare e radicale risulta ridotta come pure la dominanza apicale e lo sviluppo di fiori e frutti, determinando una generale riduzione di qualità e quantità nel prodotto finale (Brown et al., 2002; Tanaka e Fujiwara, 2008). Il B viene assorbito dalla pianta a livello radicale come acido bórico. L'assorbimento

di questo elemento avviene per lo più passivamente seguendo un gradiente di concentrazione tra l'ambiente esterno e i tessuti della pianta. Si conoscono tre sistemi di trasporto del B (Figura 2.2; Takano et al., 2008).:

- i) trasporto passivo legato alla permeabilità dei lipidi di membrana al B;
- ii) trasporto attivo, attraverso canali specifici (BOR);
- iii) trasporto attivo attraverso canali regolati dall'attività di proteine (NIP).

All'interno della pianta il B è trasportato attraverso lo xilema, seguendo quindi il flusso traspiratorio; questo spiega parzialmente anche l'accumulo di tale elemento nella parte marginale delle foglie più vecchie (Brown e Shelp, 1997). Nella pianta il B è difficilmente ritraslocato, quindi in situazioni di carenza sono gli organi più giovani che ne risentono maggiormente. Tuttavia, in alcune specie (melo, mandorlo, pesco e susino) il B è ben distribuito nelle diverse porzioni della pianta, anche quando la sua presenza nel suolo è scarsa, mostrando addirittura un leggero aumento della concentrazione nelle foglie più giovani (Brown e Shelp, 1997).



**Fig. 2.2.** Movimenti del Boro nei tessuti della pianta (Takano et al., 2008)

Esistono quindi due sistemi principali di comportamento: uno tipico di piante, come alcune specie arboree, in grado di rimobilizzare il B per via floematica, e un secondo tipico di molte specie orticole, ad esempio, che non sono appunto capaci di rimobilizzare questo elemento attraverso il floema. Nel primo caso, il trasporto per via floematica sarebbe legato al trasporto di composti, come il mannitolo e sorbitolo, ai quali il B si lega attraverso i gruppi idrossilici in posizione *cis*. Comunque, alcuni studi hanno dimostrato la rimobilizzazione del B anche in piante che non producono composti come il mannitolo, attraverso canali specifici per il B (es. in girasole; Noguchi et al., 2000). Questo meccanismo sarebbe attivo solo in caso di carenza di B. In conclusione, il B nella pianta è trasportato/assorbito passivamente soprattutto in condizioni non limitanti, mentre in situazioni di deficienza il B è interessato da un sistema attivo di trasporto e assorbimento, che rende più facile l'adattamento della piante alla condizione di stress nutrizionale (Tanaka e Fujiwara 2008) (**Figura 2.2**).

### La tossicità da Boro

L'inquinamento delle acque di falda e dei terreni da parte del B può essere dovuto a tre cause principali:

- l'intrusione di acque marine (molto ricche in B, con concentrazioni di 5-8 mg/L) nelle acque di falda;
- rilascio di B dai minerali presenti nel suolo (origine geologica). I minerali che contengono B e lo rilasciano in seguito ai fenomeni di erosione includono tinkal, ulexite, colemanite e rasorite; si ritrovano principalmente nelle rocce sedimentarie. Le attività geotermiche sono anch'esse importanti fonti di B, senza escludere le eruzioni vulcaniche e il vapore geotermico. Durante le eruzioni vulcaniche la temperatura elevata provoca l'emissione di B dalle rocce in forma di vapori che si depositano velocemente al suolo o nelle acque.
- Attività industriali e agricole, compresa la fertilizzazione delle colture (origine antropica).

I primi sintomi inerenti la tossicità da B si manifestano, nella maggior parte della pianta, con una leggera clorosi fogliare la quale evolve in necrosi. Queste aree, collocate dapprima sul margine fogliare, si allargano dall'esterno verso l'interno e presentano una concentrazione di B significativamente superiore rispetto al tessuto "sano" della foglia (Nable et al., 1997). Tuttavia, nelle specie in cui il B si muove per via floematica (melo, pero e pesco) i sintomi evolvono in disordini metabolici che riguardano i meristemi primari e gli organi riproduttivi.

**Tabella 2.1.**Soglia di tolleranza alla concentrazione di B (mg/L) nell’ambiente radicale per diverse colture (Knott’s Handbook, 1997; Nable et al. 1997).

0.2-0.4	0.5-1	1-2	2-4	4-6	10-15
Avocado	Aglione	Avena	Carciofo	Barbabietola	Asparago
Fagiolo	Cipolla	Broccoli	Carota	Pomodoro	
Melo		Cetriolo	Cavolfiore	Prezzemolo	
		Mais	Cavolo		
		Patata	Erba medica		
		Peperone	Lattuga		
		Pisello	Melone		
		Radicchio	Sedano		

Nelle piante esiste una ampia variabilità inter- e intra-specifica della tolleranza al B (**Tabella 2.1**; Nable et al., 1997). All’interno della stessa specie, le varietà più tolleranti presentano una concentrazione di B nei tessuti significativamente più bassa delle varietà meno tolleranti. Questo comportamento è stato osservato nel frumento, pomodoro, girasole, limone, carciofo e in alcune leguminose e sarebbe legato alla capacità della pianta di ridurre l’assorbimento radicale del B (meccanismo di esclusione) attraverso una ridotta permeabilità dei lipidi di membrana. Recenti studi (Miwa et al., 2007; Sutton et al., 2007) hanno dimostrato che in *Arabidopsis* la tolleranza del B è legata alla presenza dei canali BOR (BOR4, BOR1, Bot1) essenziali nei processi di estrusione del B dal citoplasma (efflusso).

L’eccesso di B è un’importante fattore limitante della produzione agricola in molte regioni del mondo. Inoltre, l’alta concentrazione di B si trova spesso in associazione con elevata salinità nelle zone aride e ambienti semiaridi (Nibile *et al.*, 1997; Marschner *et al.*, 1995; Nibile *et al.*, 1997) ed anche in zone costiere.

Alcune ricerche hanno segnalato le risposte delle colture all’eccesso simultaneo di salinità e di B, ad esempio in: pomodoro (Alpaslan e Gunes, 2001; Ben-Gal e Shani, 2002; Guidi *et al.*, 2011), melone (Edelstein et al, 2005), carota (Eraslan *et al.*, 2007a), peperone (Yermiyahu *et al.*, 2008), cetrioli (Alpaslan e Gunes, 2001), lattuga (Eraslan *et al.*, 2007b), spinaci (Eraslan *et al.*, 2008), broccoli (Grieve e Poss, 2010) e geranio (Banon e Miralles, 2011). Dai risultati di questi studi si possono trarre alcune conclusioni generali:

- Gli effetti negativi del B sono alleviati se la coltura è esposta anche ad uno stress salino (Ben-Gal e Shani, 2002; Yermiyahu et al., 2008) probabilmente grazie alla riduzione della traspirazione provocata dall’effetto osmotico dello stress salino e quindi dell’assorbimento

(passivo) di B (Yermiyahu et al., 2008).

- Lo stress salino potrebbe alterare l'attività delle acquaporine di membrana, attraverso le quali avviene il trasporto del B con alte concentrazioni di questo elemento nel mezzo di crescita (Martinez-Ballesta *et al.*, 2008).
- La risposta della pianta alla tossicità da B è diversa anche a seconda della tolleranza alla salinità della coltura stessa, infatti colture sensibili alla salinità, come il cetriolo, sono influenzate di più rispetto a colture più tolleranti come il pomodoro che risultano più tolleranti anche alla tossicità da B. Probabilmente in queste colture i meccanismi di esclusione dei sali controllano anche l'eccessivo assorbimento del B (Alpaslan e Gunes, 2001).

## 2.2. OBIETTIVI DELLA TESI

In questa prova sperimentale, sono stati studiati gli effetti di diverse concentrazioni (da 0,25 fino a 20 mg/L) di B su piante basilico (*Ocimum basilicum* L.) coltivate in serra in idroponica, usando la tecnica nota con il termine "floating system". Sono state impiegate due diverse varietà di basilico, una con foglie verdi (var. "Tigullio") e una con foglie rosse (var. "Red Rubin") (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3.** Le foglie di colore rosso-porpora o verdi delle due varietà di basilico impiegate per gli esperimenti: "Red Rubin" (sx) e "Tigullio" (dx).

Il basilico a foglie verdi è usato soprattutto come pianta aromatica e per la preparazione del pesto (anche su scala industriale), mentre le varietà a foglia rosso-viola vengono solitamente

utilizzate come piante ornamentali. Queste varietà sono caratterizzate da un maggior contenuto di antociani (localizzati soprattutto nell'epidermide; **Figura 2.4**) e di composti anti-ossidanti come acido ascorbico e glutazione, che giocano un ruolo fondamentale nella foto-protezione e nella tolleranza a stress di varia natura (Landi et al., 2012b, 2013).



**Figura 2.4.** Gli antociani sono localizzati nelle cellule dell'epidermide, svolgendo così un importante ruolo di foto-protezione (Landi et al., 2013).

In precedenti studi condotti da Landi et al (2012b, 2013) è stato osservato una minore sensibilità all'eccesso di B (20 mg/L nella soluzione nutritiva) delle varietà rosso-viola di basilico, come "Red Rubin" , rispetto a quelle a foglia verde, come "Tigullio" (**Figura 2.5**), coltivate in idroponica. Il danno fogliare provocato dall'eccesso di B nella soluzione nutritiva consiste in una riduzione della fotosintesi e nella comparsa di clorosi e necrosi fogliari (marginali e internervali) e la sua gravità dipende dalla concentrazione di B nei tessuti fogliari (Landi et al., 2012, 2013). La minore sensibilità delle varietà rosso-viola rispetto a quelle verdi è stata attribuita da Landi et al. (2012 e 2013) principalmente a: i) un maggiore contenuto di sostanze anti-ossidanti (antociani, acido ascorbico, glutazione), osservato anche nelle piante coltivate con una concentrazione ottimale di B nella soluzione nutritiva; ii) una maggiore attività di enzimi anti-ossidanti, come l'ascorbato per ossidasi (APX) e la catalasi, in presenza di un'elevata concentrazione di B nel mezzo di crescita. In altre parole, la maggiore tolleranza a concentrazioni tossiche di B sembra essere sia costitutiva sia inducibile.



**Figura 2.5.** Piante delle due varietà di basilico allevate in idroponica con 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva. La varietà rossa ("Red Rubin") ha mostrato una maggiore tolleranza all'eccesso di B rispetto alla varietà verde ("Tigullio"), come indicato dalla minore gravità delle clorosi e delle necrosi fogliari.

Landi et al. (2012b, 2013) hanno studiato soprattutto gli effetti del B sulla fotosintesi fogliare e il possibile ruolo protettivo svolto dai sistemi anti-ossidanti (composti e enzimi) in generale e in particolare degli antociani nei confronti dello stress ossidativo indotto dall'eccesso di B (Landi et al., 2012a). Gli esperimenti di Landi et al. (2012b, 2013) non hanno però chiarito se la maggior tolleranza all'eccesso di B nelle varietà rosso-viola è anche dovuta alla capacità di queste varietà di ridurre l'accumulo di B nelle foglie. Proprio per chiarire questo aspetto sono stati condotti gli esperimenti riportati in questa tesi.

In un primo esperimento, ripetuto due volte, le piante sono state coltivate con due concentrazioni di B (0,25 e 20 mg/L) usando un sistema miniaturizzato di coltura idroponica (**Figura 2.6**) in modo da poter determinare il tasso giornaliero di assorbimento idrico e traspirazione fogliare per via gravimetrica, cioè usando una bilancia analitica. Nel secondo esperimento, anch'esso ripetuto due volte, le piante sono state allevate in vasche a sei diverse concentrazioni di B: 0,25; 5; 10; 15; 20 e 25 mg/L. L'obiettivo di questo esperimento è stato soprattutto quello di valutare la relazione tra la concentrazione di B nella soluzione nutritiva e quella nella linfa xilematica.



**Figura 2.6.** I vasetti, resi stagni con un film plastico, utilizzati nel primo esperimento.

Nel secondo esperimento sono stati determinati anche i contenuti fogliari di fenoli totali e di acido rosmarinico. Il basilico contiene elevate concentrazioni di questo metabolita secondario, la cui sintesi è influenzata dalle condizioni di crescita delle piante e da molti tipi di stress (Maggini et al., 2013).

## **2.3. MATERIALI E METODI**

### **Coltivazione idroponica**

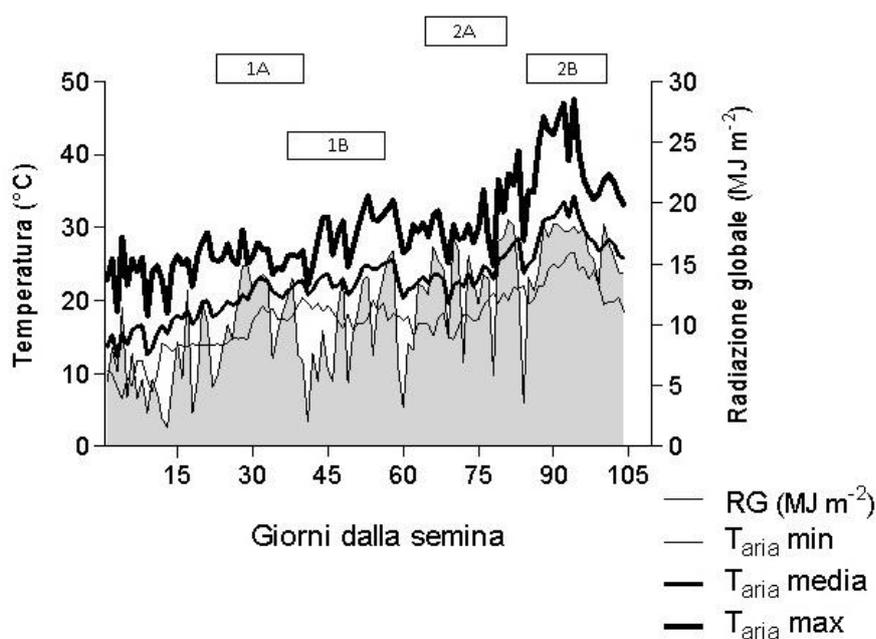
Gli esperimenti sono stati condotti in una serra in ferro e vetro (**Figura 2.7**), nel periodo primaverile – estivo del 2013. I dati cronologici relativi alle diverse prove (data di semina, di trapianto e di inizio e fine degli esperimenti; durata degli esperimenti; densità colturale; volume unitario di soluzione nutritiva) sono riportati nella **Tabella 2.2**. Normalmente, i semi erano seminati in cubetti di lana di roccia e fatti germinare in camera climatica. I semenzali erano quindi trasferiti in serra subito dopo l'emergenza (in genere, dopo una settimana) e, dopo un'altra settimana, trapiantate in idroponica: Il trattamento veniva iniziata la settimana successiva al trapianto (quindi tre settimane dopo la semina) e durava circa tre settimane.



**Figura 2.7.** Il compartimento della serra utilizzato per gli esperimenti.

In tutti gli esperimenti le soluzioni nutritive erano arieggiate tramite un compressore e sono stati previsti 4 replicati. La soluzione nutritiva era completamente rinnovata ogni 3-4 giorni nell'esperimento 1 e ogni settimana nell'esperimento 2.

Le condizioni di crescita sono state quelle tipiche del clima Mediterraneo nel periodo primaverile-estivo (**Figura 2.8**). La temperatura dell'aria è aumentata nel corso della stagione con valori massimi superiori a 30 °C e nella penultima settimana superiori anche ai 40 °C. A parte i primi dieci giorni del primo esperimento, la temperatura minima non è mai scesa sotto i 10 °C. Il valore medio della radiazione solare giornaliera è stato di 11,3MJ m<sup>-2</sup>; il valore cumulato nella stagione è stato di 1.141,9 MJ m<sup>-2</sup>.



**Figura 2.8.** Valori medi della temperatura dell'aria (minima, massima e media) e della radiazione solare all'interno della serra utilizzata per gli esperimenti sul basilico. Le barre orizzontali indicano il periodo del trattamento sperimentale nelle prove.

**Tabella 2.2.** Descrizione sintetica degli esperimenti.

	Esperimento con i vasetti		Esperimento con le vasche	
	1A	1B	2A	2B
Concentrazioni di boro a confronto (mg/L)	0,25 - 5,0 - 20		0,25 - 5,0 - 10 - 15- 20 - 25	
Semina	14 Marzo	31 Marzo	29 Aprile	20 Maggio
Trapianto	28 Marzo	15 Aprile	15 Maggio	7 Giugno
Inizio esperimento	4 Aprile	22 Aprile	20 Maggio	10 Giugno
Fine esperimento	24 Aprile	6 Maggio	5 Giugno	24 Giugno
Età della piante a fine esperimento (giorni dalla semina)	41	36	37	35
Durata del trattamento (giorni)	20	15	15	15
Densità (no. di piante per vasetto o vasca)	5	5	16	16
Densità (no. di piante per m <sup>2</sup> )	64	64	26	26
Volume unitario di soluzione nutritiva (L/pianta)	0,34	0,34	3,12	3,12
Temperatura media giornaliera (°C)*	20,2	22,0	23,1	29,9
Umidità relativa media giornaliera (%)*	63,6	66,9	54,7	52,9
Radiazione solare giornaliera (MJ/m <sup>2</sup> .giorno)*	10,37	8,51	13,52	16,42

\* Valori medi durante l'esperimento

La composizione della soluzioni nutritiva era la seguente: N-NO<sub>3</sub> 5,0 mM; S-SO<sub>4</sub> 4,0 mM; P 1,0 mM; Ca 3,0 mM; Mg 1,5 mM; Fe 40,0 μM; Cu 3,6 μM; Mn 10,9 μM; Mo 1 μM. La EC della soluzione nutritiva appena preparata era di 2,3 dS/m. La soluzione era preparata usando acqua piovana, praticamente priva di sali (EC = 0,06 dS/m). La EC e il pH erano controllati quasi tutti i giorni ed eventualmente si aggiustava il pH su valori intorno a 6,0 usando acido solforico al 20%.

### **Determinazioni**

In entrambi gli esperimenti, i parametri climatici sono stati monitorati con una stazione meteorologica posta nella parte centrale della serra e collegata ad un datalogger.

Nell'esperimento 1, una o due volte la settimana venivano determinate le quantità di soluzione nutritiva assorbite (A) o traspirate (T) dalle 5 piante coltivate nei vasetti. La differenza A-T è stata usata per determinare il tasso di accrescimento della coltura, espresso come sostanza fresca.

Alla fine di ogni esperimento, le piante sono state campionate per le analisi di laboratorio: 4 repliche da ogni trattamento, ciascuna replica costituita da almeno due piante prelevate da vasetti o vasche diverse.

Le piante sono state suddivise in foglie, fusti e radici. La superficie fogliare è stata misurata utilizzando un planimetro digitale (DT Area Meter MK2, Delta T-Devices). I campioni dei vari tipi di organo sono stati prima lavati con acqua potabile e quindi deionizzata, ed infine asciugati in stufa ventilata a 80 °C fino a peso costante. I campioni essiccati sono stati digeriti a caldo in ambiente acido (240 °C, 2 ore; miscela 5:2 v/v di acido nitrico 65% e perclorico 70%) usando dei tubi di teflon (B-free). Sul prodotto della digestione si è determinato il contenuto dei seguenti elementi:

- 1) B con il metodo dell'Azometina-H (Page et al., 1982);
- 2) P con il metodo del molibdato (Olsen et al., 1982);
- 3) K, Ca, Mg e altri microelementi (Fe, Mn, Zn e CU) con uno spettrofotometro ad assorbimento atomico (Varian Model Spectra-AA240 FS, Australia).

Sulle foglie disidratate è stato determinato anche il contenuto di nitrati e di N ridotto. Nel primo caso, i campioni sono stati estratti con acqua distillata e il contenuto di nitrati nella soluzione di estrazione, opportunamente filtrata, è stato determinato con il metodo colorimetrico dell'acido salicilico (Cataldo et al., 1975). Per l'N ridotto, è stato impiegato il metodo Kjeldahl (Eraslan e Inal, 2007).

Nell'esperimento due è stata anche prelevata la linfa grezza, recidendo l'intera pianta 2 cm circa sopra il colletto e fissando un tubo di silicone, dal quale veniva raccolta la linfa aiutandosi con una micro pipetta. Il taglio delle piante è avvenuto intorno alle 10:00 e l'essudazione è durata circa 6 ore. I primi microlitri sono stati scartati e da ogni pianta sono stati raccolti mediamente 8-10 ml. Sulla linfa raccolta è stato analizzato il contenuto di B con lo spettrofotometro ad assorbimento atomico.



*Foto delle vasche prima del rilievo finale (Esp. 2a)*

Per le analisi del contenuto fogliare di clorofille, carotenoidi, polifenoli, malondialdeide (MDA) e l'acido rosmarinico sono stati utilizzati dei campioni non-disidratati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  ed estratti in una soluzione acidificata di etanolo ( $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ , 70:29:1, v/v).

Per la quantificazione delle clorofille e dei carotenoidi si è usato un metodo spettrofotometrico leggendo l'assorbanza del campione a diverse lunghezze d'onda, a 470 nm (carotenoidi) e 648, 649 e 664 nm (clorofille) (Lichtenthaler e Buschmann, 2001).

L'analisi dei fenoli è stata svolta usando il reagente Folin-Ciocalteu, largamente impiegato per questo tipo di determinazioni, e leggendo l'assorbanza dei campioni a 765 nm (Kang e Saltveit, 2002).

Per la MDA si è usato il test TBA (acido tiobarbiturico; Hodges et al., 1999). La MDA è un marker dello stato perossidato dei tessuti biologici, causato da stress ossidativi di varia natura

che aumentano il livello di perossido di idrogeno nei tessuti, le letture sono state effettuate a 440 e 600 nm.

Per la determinazione dell'acido rosmarinico si è utilizzato il metodo descritto da Kiferle et al. (2011). L'analisi è stata effettuata via HPLC. L'acido rosmarinico è stato identificato e quantificato confrontando i tempi di ritenzione con quelli dello standard integrando l'area dei picchi a confronto con la curva di calibrazione.

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza a due vie impiegando il software "Statgraphics". Il confronto tra le medie è stato effettuato usando il test della minima differenza significativa. Poiché le condizioni ambientali e colturali erano pressoché identiche nelle due prove condotte per ciascuno esperimento, i risultati sono stati molto simili e pertanto nel paragrafo successivo talvolta si sono riportati i risultati di una sola prova.

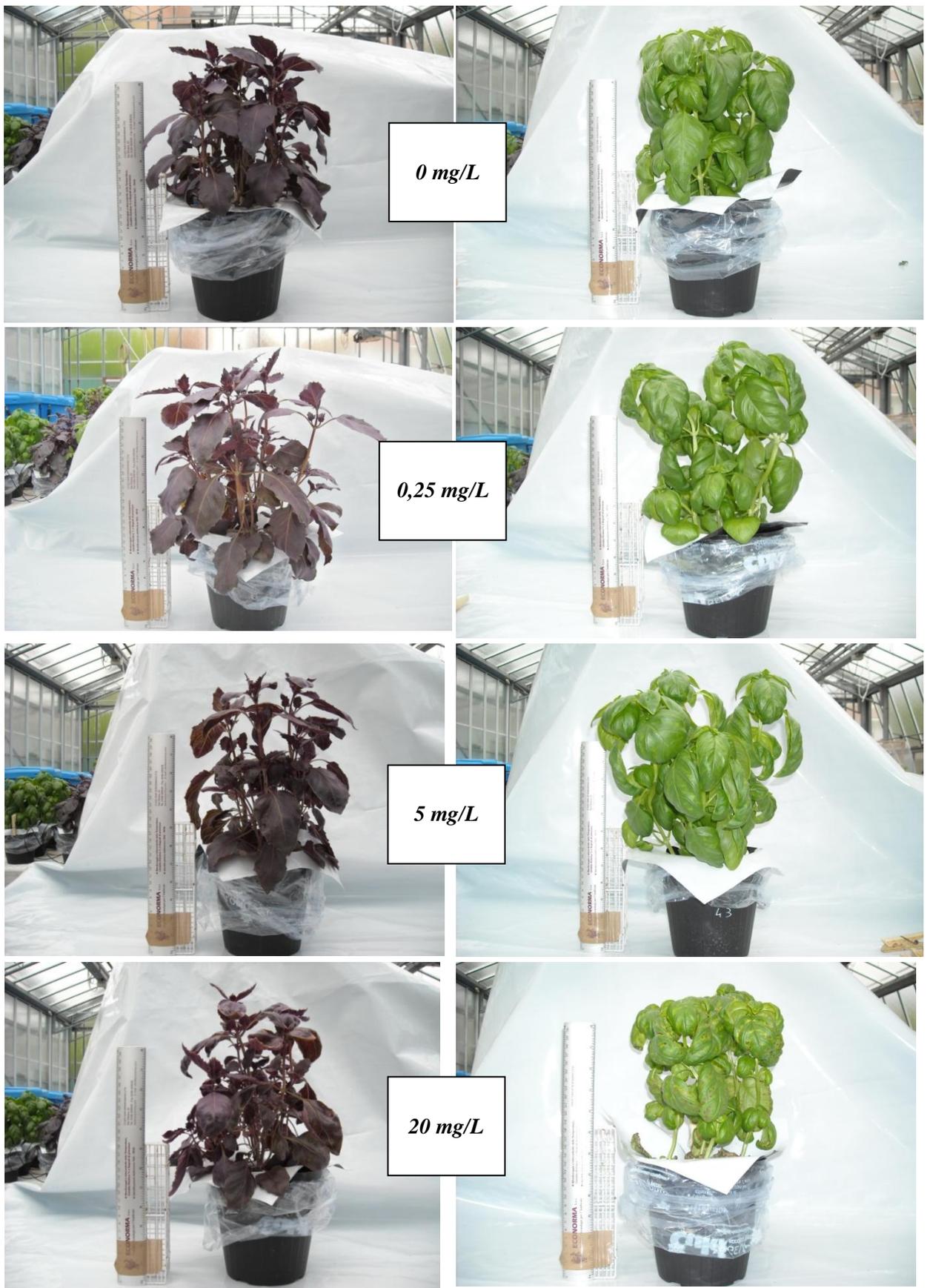
## 2.4. RISULTATI

### Esperimento 1

Quando le due varietà di basilico sono state allevate con 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva, in entrambe le varietà si è registrata una significativa riduzione dello sviluppo fogliare e della produzione di biomassa, totale e della parte aerea (**Tabella 2.3**).



*Alcune foglie delle due varietà di basilico coltivato in idroponica con 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva : "Red Rubin" (sx) e "Tigullio" (dx).*



**Figura 2.9.** Effetto della concentrazione di B nella soluzione nutritiva su due varietà di basilico coltivato in idroponica: "Red Rubin" (sx) e "Tigullio" (dx).

L'inibizione della crescita, però, è stata minore nella varietà a foglie rosse (**Tabella 2.2**). Inoltre, in questa varietà, che si è comunque accresciuta meno della varietà verde, la biomassa radicale non è stata influenzata negativamente come invece è avvenuto nell'altra varietà (**Tabella 2.2**). Questo dato conferma la minore suscettibilità della varietà "Red Rubin" all'eccesso di B, già osservata in precedenti lavori (Landi et al., 2012 e 2013).

La maggiore tolleranza al B della varietà a foglie rosse è dimostrata anche dalla minore incidenza dei tipici sintomi della tossicità da B, cioè la clorosi e il disseccamento fogliare, evidente quest'ultimo soprattutto ai margini delle foglie (**Figura 2.9**). La clorosi e la necrosi fogliare, di fatto, riducono la superficie fotosintetizzante e quindi la produzione di biomassa.

Tornando all'analisi di crescita, la varietà "Red Rubin" ha evidenziato un maggior rapporto tra la biomassa accumulata nelle radici e quella accumulata nella parte aerea. (**Tabella 2.3**).

Per quanto riguarda i flussi idrici, le due cultivar si sono comportate in modo pressoché identico se si considerano i valori cumulati (nei 20 giorni dell'esperimento) dell'assorbimento idrico radicale e della traspirazione fogliare. In entrambe le varietà, inoltre, l'eccesso di B ha ridotto i due processi del 11-16% (**Tabella 2.4**). Interessante è il dato relativo ai flussi idrici espressi per unità di superficie fogliare raccolto negli ultimi due giorni dell'esperimento. La varietà "Red Rubin" ha mostrato un assorbimento idrico e una traspirazione significativamente più alti rispetto all'altra varietà (**Tabella 2.4**). Inoltre, si è anche osservato che l'eccesso di B aumentava significativamente l'assorbimento in "Red Rubin", mentre in "Tigullio" non sono state trovate differenze significative tra le piante allevate a 0,25 mg/L e quelle a 20 mg/L (**Tabella 2.4**).

Una concentrazione di B pari a 20 mg/L nella soluzione nutritiva ha, come previsto, determinato un grande aumento della concentrazione di questo elemento in tutti gli organi della pianta considerati, in particolare nelle radici e nelle foglie (**Tabella 2.5**). Tra le due varietà e per entrambe le concentrazioni esterne di B non sono state rilevate differenze significative tra le concentrazioni di B nelle radici e negli steli. Al contrario, per la concentrazione di B nei foglie, i valori sono stati significativamente superiori in "Red Rubin" rispetto a "Tigullio". Quando le due varietà sono state allevate nelle condizioni di controllo, i valori della concentrazione fogliare di B sono stati superiori in "Red Rubin" ma questa differenza non era significativa (**Tabella 2.5**). L'assorbimento totale di B è stato praticamente uguale nelle due varietà (**Tabella 2.5**). Si è però visto che l'eccesso di B modificava la ripartizione del B nei diversi organi, anche se solo in "Tigullio". Questa varietà ha mostrato un diverso comportamento rispetto a "Red Rubin" anche in condizioni di controllo; cioè,

"Tigullio" ha ripartito nelle foglie una minor quantità del B assorbito rispetto a "Red Rubin" (**Tabella 2.5**). In altre parole, la varietà a foglie verdi, in condizioni di controllo, tende ad accumulare B in misura simile nelle radici e nelle foglie, mentre la varietà "Red Rubin" accumula più B nelle foglie anche in condizioni di controllo (**Tabella 2.5**).

La **Tabella 2.6** riporta i valori della concentrazione di assorbimento calcolati considerando le quantità totale di B e di acqua assorbite per via radicale oppure la quantità di B accumulata nei tessuti fogliari e la traspirazione totale. Nel primo caso, non ci sono differenze importanti tra le due varietà e i valori aumentano notevolmente in presenza di un'elevata concentrazione di B nella soluzione nutritiva (**Tabella 2.6**). Quando la concentrazione di assorbimento è calcolata in base alla traspirazione e al contenuto fogliare di B, i valori sono stati significativamente superiori nelle varietà a foglie rosse rispetto all'altra (**Tabella 2.6**).

I rapporti tra la concentrazione di assorbimento del B e quella esterna sono sempre stati inferiori ad 1 in "Tigullio" mentre in "Red Rubin" sono stati maggiori di 1 almeno nelle condizioni di controllo (**Tabella 2.6**). Quando le piante sono state allevate a concentrazioni elevate di B, questo rapporto è diminuito sensibilmente, suggerendo l'attivazione di un controllo dell'assorbimento nella pianta, senza differenze degne di nota tra le due cultivar (**Tabella 2.6**).

La concentrazione di B nella soluzione nutritiva non ha influenzato in modo significativo il contenuto fogliare di P, Ca, Mg, Zn e Cu. Invece, con 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva si è osservato un aumento della concentrazione fogliare di K, Fe e Mn in "Red Rubin" (K e Fe) o in entrambe le varietà (Mn). In generale, in base ai valori della concentrazione minerale delle foglie possiamo escludere una condizione di deficienza minerale indotta dall'eccesso di B. Un discorso particolare merita l'N. In entrambe le varietà, l'alta concentrazione di B nel mezzo di crescita ha aumentato in modo significativo il contenuto di N ridotto, di N nitrico e quindi di N totale. Particolarmente marcato è stato l'effetto sul contenuto di nitrati, che è più che raddoppiato nelle foglie delle piante allevate in presenza di 20 mg/L di B. Da notare anche l'elevata concentrazione di nitrati nella varietà "Red Rubin", anche nelle condizioni di controllo, con concentrazioni superiori ai limiti imposti dal Regolamento della Commissione Europea Regolamento n. 1258 del 2011 riguardante il contenuto massimo di nitrati in ortaggi da foglia come la lattuga e lo spinacio, pari a 2000 – 2500 mg/kg peso fresco.

**Tabella 2.3.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sull'area fogliare e sulla biomassa secca di due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra<sup>a</sup>. Si riporta anche il rapporto tra la biomassa radicale e quella aerea.

Cultivar	Trattamento (mg/L B)	Area fogliare (cm <sup>2</sup> /pianta)		Biomassa secca totale (g/pianta)		Biomassa parte aerea (g/pianta)		Biomassa radicale (g/pianta)		Rapporto radici/parte aerea
"Tigullio"	0,25	426,0 a	(100) <sup>b</sup>	2,44 a	(100)	1,92 a	(100)	0,52 a	(100)	0,27 bc
	20	277,1 c	(65)	1,73 b	(71)	1,40 b	(73)	0,33 b	(64)	0,24 c
"Red Rubin"	0,25	306,0 b	(100)	1,40 c	(100)	1,04 c	(100)	0,35 b	(100)	0,34 ab
	20	228,2 d	(75)	1,24 c	(89)	0,87 d	(84)	0,37 b	(104)	0,42 a
ANOVA										
A		***		***		***		***		**
B		***		***		***		ns		ns
A x B		***		***		***		**		*

<sup>a</sup> L'analisi della varianza a due vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; \*, significativa al 5%; \*\*, significativa all'1%; \*\*\*, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD (*least significant difference*).

<sup>b</sup> I valori tra parentesi rappresentano i valori relativi rispetto al controllo.

**Tabella 2.4.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sull'assorbimento totale e giornaliero e sull'evapotraspirazione (ET) di due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra<sup>a</sup>. I valori giornalieri di assorbimento ed ET, espressi sull'area fogliare, sono stati misurati negli ultimi due giorni dell'esperimento.

Cultivar	Trattamento (mg/L B)	Assorbimento totale di acqua (g/pianta)	Assorbimento giornaliero di acqua (g/cm <sup>2</sup> giorno)	ET totale (g/pianta)	ET giornaliera (g/cm <sup>2</sup> giorno)
"Tigullio"	0,25	574 a	0,123 c	545 a	0,119 c
	20	474 b	0,138 c	455 b	0,137 bc
"Red Rubin"	0,25	539 a	0,163 b	519 a	0,160 ab
	20	474 b	0,181 a	460 b	0,181 a
ANOVA					
A		ns	***	ns	***
B		***	*	***	*
A x B		ns	ns	ns	ns

<sup>a</sup> L'analisi della varianza a due vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; \*, significativa al 5%; \*\*, significativa all'1%; \*\*\*, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD (*least significant difference*).

**Tabella 2.5.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sul contenuto di questo elemento in due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra<sup>a</sup>. Viene anche mostrata la percentuale di boro ripartita fra i diversi organi.

Cultivar	Trattamento (mg/L B)	Concentrazione di B (mg/kg p.s)			Contenuto di B (µg/pianta)				Ripartizione del B (% contenuto totale)		
		Radici	Fusto	Foglie	Radici	Fusto	Foglie	Totale	Radici	Fusto	Foglie
"Tigullio"	0,25	93 b	28 b	37 c	48 c	18 bc	47 b	113 b	42 a	16 a	42 b
	20	526 a	98 a	963 b	179 b	42 a	930 a	1151 a	16 b	4 b	80 a
"Red Rubin"	0,25	62 b	15 b	119 c	25 c	6 c	133 b	164 b	16 b	4 b	80 a
	20	702 a	95 a	1514 a	259 a	26 b	901 a	1187 a	22 b	2 b	76 a
ANOVA											
A		ns	ns	***	ns	*	ns	ns	**	*	***
B		***	***	***	***	**	***	***	***	*	***
A x B		*	ns	**	*	ns	ns	ns	***	*	***

<sup>a</sup> L'analisi della varianza a due vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; \*, significativa al 5%; \*\*, significativa all'1%; \*\*\*, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD (*least significant difference*).

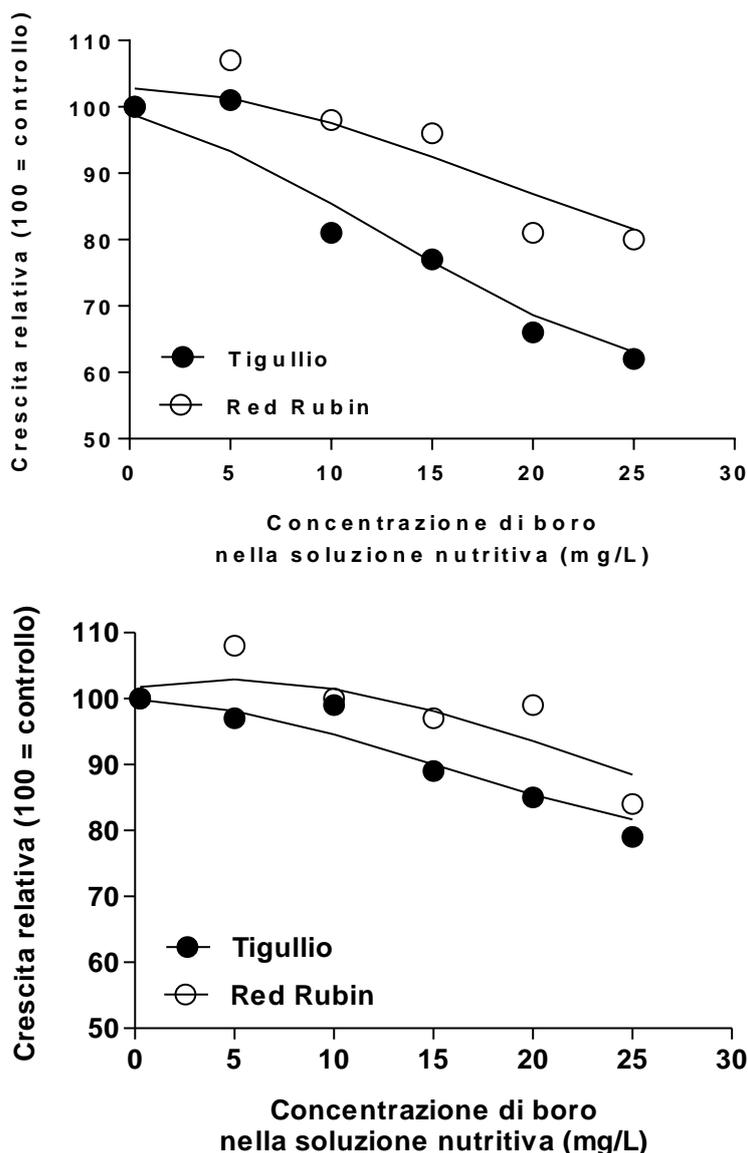
**Tabella 2.6.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sulla concentrazione di assorbimento del B in due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra<sup>a</sup>. La concentrazione di assorbimento è stata calcolata considerando l'assorbimento totale di boro e di acqua oppure la quantità di B accumulato nelle foglie e il volume totale di acqua traspirata. Si riporta anche il rapporto fra la concentrazione di assorbimento e quella della soluzione nutritiva.

Cultivar	Trattamento (mg/L B)	Concentrazione di assorbimento (mg/L)		Rapporto fra la concentrazione di assorbimento e quella della soluzione nutritiva (CSN)	
		Pianta intera (CA <sub>pianta</sub> )	Foglie (CA <sub>foglie</sub> )	CA <sub>pianta</sub> /CSN	CA <sub>foglie</sub> /CSN
"Tigullio"	0,25	0,20b	0,07d	0,79b	0,27b
	20	2,42a	2,12b	0,12c	0,11b
"Red Rubin"	0,25	0,30b	0,39cd	1,22a	1,57a
	20	2,50a	3,29a	0,13c	0,16b
ANOVA					
A		ns	***	*	***
B		***	***	***	***
A x B		ns	**	**	***

<sup>a</sup> L'analisi della varianza a due vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; \*, significativa al 5%; \*\*, significativa all'1%; \*\*\*, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD (*least significant difference*).

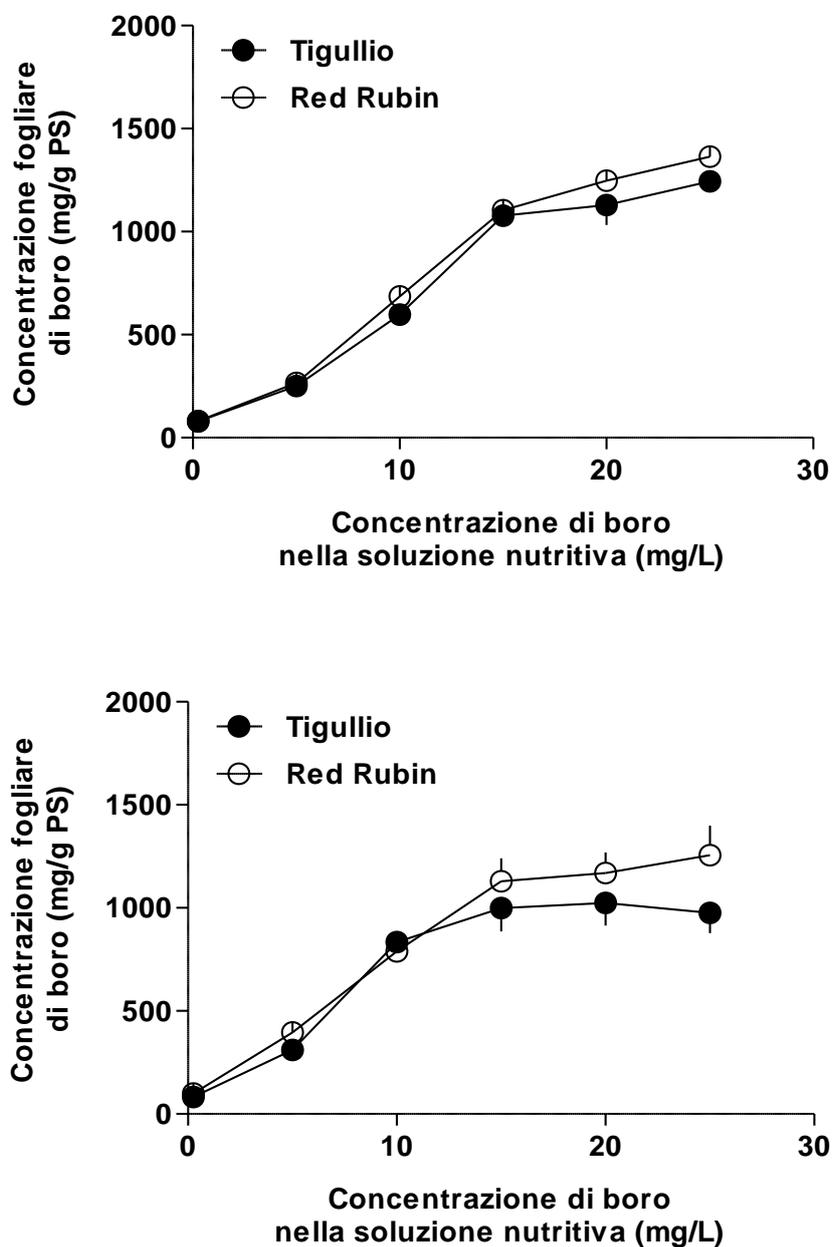
## Esperimento 2

Nel secondo esperimento si sono confrontate sei diverse concentrazioni di B nella soluzione nutritiva soprattutto allo scopo di verificare la risposta del basilico a concentrazioni più alte o più basse rispetto a quella testa nell'esperimento 1 (20 mg/L) e indagare la relazione tra la concentrazione esterna di B e quella della linfa xilematica raccogliendo l'essudato da piante tagliate al colletto.



**Figura 2.10.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sulla crescita di due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra (Esperimento 2a, in alto, e 2b, in basso). I valori sono espressi come percentuale rispetto alla biomassa prodotta nelle piante allevate a 0,25 mg/L (controllo) pari a 2,19 e 1,24 g/pianta nel primo esperimento, e a 2,54 e 5,05 g/pianta nel secondo esperimento, in "Tigullio" e "Red Rubin", rispettivamente.

I risultati riguardanti la crescita hanno confermato quelli ottenuti con il primo esperimento. In altre parole, la crescita del basilico è stata inibita già con concentrazioni di 10 mg/L e questa inibizione è stata maggiore in "Tigullio" rispetto a "Red Rubin" (**Figura 2.10**).



**Figura 2.11.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sulla concentrazione fogliare di questo elemento in due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra (Esperimento 2a, in alto, e 2b, in basso). Valori medi ( $\pm$  s.e.) di 4 replicati. Le foglie sono state campionate dal III e IV nodo.

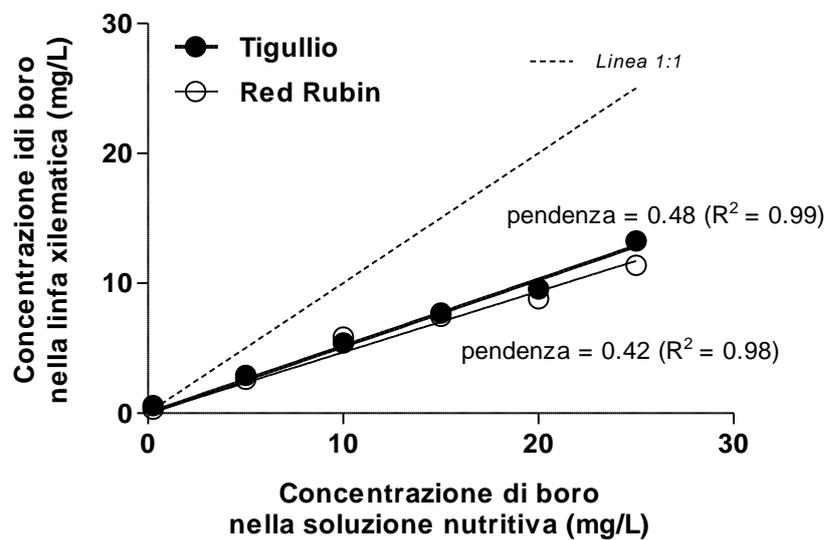
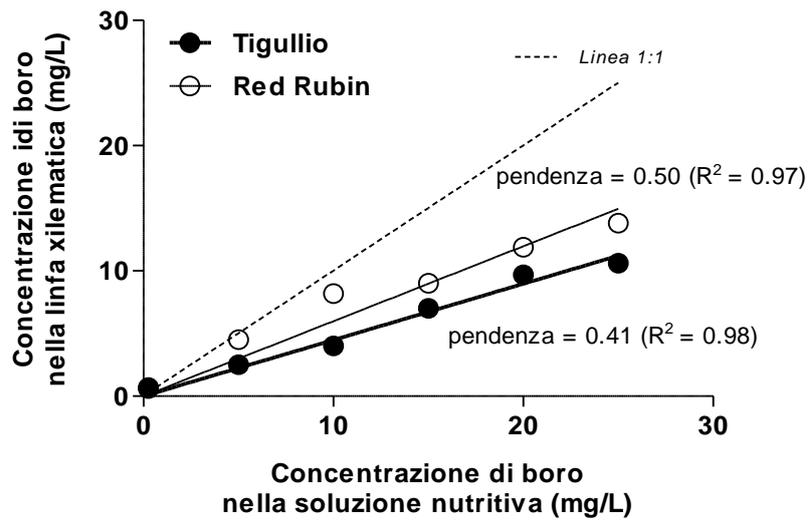
Anche per quanto riguarda la concentrazione di B nelle foglie le osservazioni hanno confermato i risultati del primo esperimento: cioè, la concentrazione fogliare è aumentata con la concentrazione esterna. In questo esperimento, inoltre, non si è osservata alcuna differenza degna di nota tra le due varietà (**Figura 2.11**). Questa figura mostra anche una diversa relazione tra la concentrazione fogliare e quella esterna per valori di quest'ultima compresi tra 0,25 e 15 mg/L e per valori superiori (**Figura 2.11**). Infatti, con le concentrazioni più alte, si raggiunge quasi un plateau.

In questo esperimento è stato determinato il contenuto di B solo delle foglie al III e IV nodo poiché sulle stesse foglie sono stati determinati una serie di parametri biochimici compreso il contenuto di acido rosmarinico (un derivato dell'acido caffeico). La scelta di campionare solo alcune foglie è stata determinata dai risultati riportati da Kiferle et al. (2013). Questi autori, infatti, hanno trovato che il contenuto dell'acido rosmarinico variava molto con la posizione (quindi l'età) delle foglie. Quindi, per ridurre la variabilità si è deciso di campionare solo alcune foglie e di determinare sugli stessi campioni anche il contenuto di B.

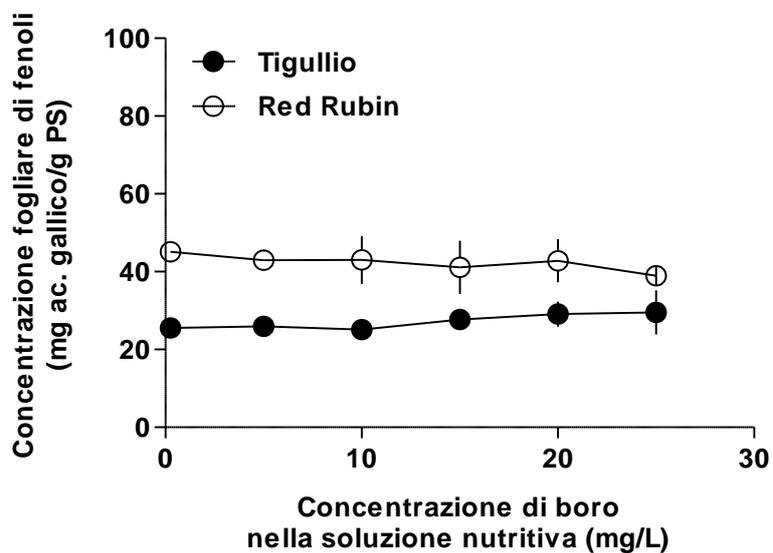
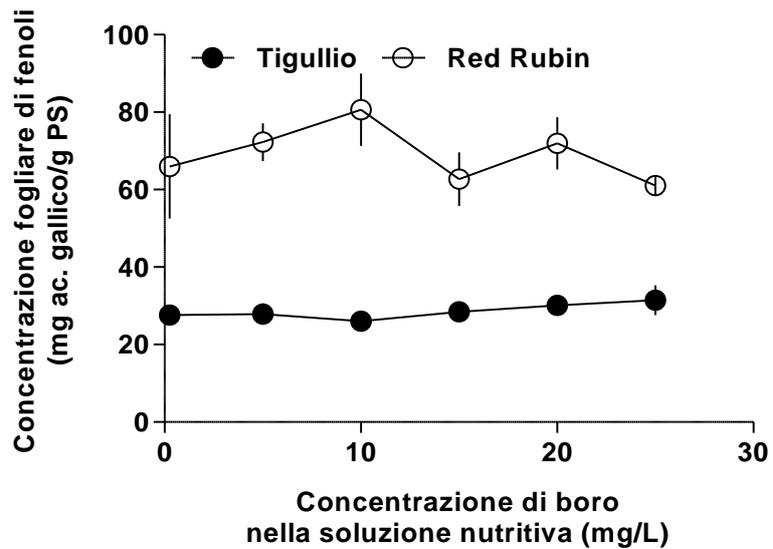
Due possono essere le cause per questa differenza: 1) sopra 15 mg/L le piante di entrambe le varietà iniziano ad essere più selettive, in altre parole riescono a controllare meglio l'assorbimento radicale e/o la traslocazione verso le foglie; 2) l'eccesso di B determina una riduzione della traspirazione e quindi del flusso di B verso le foglie.

I dati relativi alla concentrazione xilematica (**Figura 2.12**) sembrano escludere la prima ipotesi. Infatti, la concentrazione xilematica di B aumenta in modo lineare con la concentrazione esterna, peraltro con una pendenza leggermente superiore per "Red Rubin" che per "Tigullio" (**Figura 2.12**).

D'altra parte, i dati della traspirazione unitaria raccolti nel primo esperimento (**Tabella 2.4**) sembrano escludere che ad alte concentrazioni di B ci sia una chiusura stomatica responsabile di una riduzione del tasso traspiratorio e quindi del flusso di acqua e di B per unità di superficie fogliare. Per chiarire meglio le cause dell'andamento bi-fasico della relazione tra concentrazione di B nelle foglie e nella soluzione idroponica occorre investigare meglio l'effetto del B sia sull'assorbimento totale di questo nutriente sia sulla traspirazione fogliare. Nell'esperimento due si è anche analizzato il contenuto totale di fenoli e quello dell'acido rosmarinico.



**Figura 2.12.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sulla concentrazione xilematica di questo elemento in due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra. Valori medi ( $\pm$  s.e.) di 4 replicati.



**Figura 2.13.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sulla concentrazione fogliare di fenoli in due cultivar di basilico coltivate in idroponica per 20 giorni in serra (Esperimento 2a, alto, e 2b, basso). Valori medi ( $\pm$  s.e.) di 4 replicati. Le foglie sono state campionate dal III e IV nodo.

La concentrazione esterna di B non ha avuto un'influenza importante sul contenuto fogliare di fenoli totali, che è stato assai più alto nella varietà a foglie rosse rispetto a quella a foglie verdi (**Figura 2.13**). Anche il contenuto di acido rosmarinico, determinato solo per le concentrazioni di 0,25 e 20,0 mg/L non è stato influenzato dalla concentrazione di B (**Tabella 2.7**). Il contenuto di acido rosmarinico è variato molto da un esperimento all'altro, soprattutto in "Tigullio", che in tutte le condizioni saggiate ha mostrato un contenuto inferiore di questo derivato dell'acido caffeico rispetto alla varietà rossa. Nell'esperimento 2a il contributo dell'acido rosmarinico al contenuto di fenoli totali (espresso in equivalenti di acido gallico) è stato mediamente del 5% in "Tigullio" e del 20% in "Red Rubin". Nell'esperimento 2b, invece, il contributo è stato mediamente del 35% e del 58%.

**Tabella 2.7.** Influenza della concentrazione di boro nella soluzione nutritiva sui contenuti di acido rosmarinico, fenoli, clorofille ed antocianine totali di due cultivar di basilico dopo 20 giorni di coltura idroponica in serra<sup>a</sup>. I valori sono espressi in base al peso secco dei campioni. Le foglie sono state campionate dal III e IV nodo.

Cultivar	Trattamento ([B]; mg/L)	Esperimento 2a		Esperimento 2b	
		Acido rosmarinico (g/kg p.s.)	Fenoli Totali (g GAE/kg p.s.)	Acido rosmarinico (g/kg p.s.)	Fenoli totali (g GAE/kg p.s.)
"Tigullio"	0,25	0,44 b	27,63 b	8,27 b	25,56 b
	20,00	2,28 b	30,10 b	11,15 b	29,11 b
"Red Rubin"	0,25	13,89 a	65,98 a	26,23 a	45,14 a
	20,00	14,15 a	71,93 a	25,22 a	42,81 a
A		***	***	***	***
B		ns	ns	ns	ns
A x B		ns	ns	ns	ns

<sup>a</sup> L'analisi della varianza a due vie (ANOVA) è stata utilizzata per valutare gli effetti della cultivar (A), del boro (B) e la loro interazione. La significatività è come segue: NS, non significativa; \*, significativa al 5%; \*\*, significativa all'1%; \*\*\*, significativa all'0,1%. I valori medi (n = 4) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti (P<0,05) in base al test LSD (*least significant difference*).

Su campioni di foglie analoghi a quelli usati per le analisi dei fenoli e dell'acido rosmarinico è stato determinato anche il contenuto di clorofilla e di antociani. Il livello di B nella soluzione non ha influenzato in modo significativo il contenuto di due tipi di pigmenti. Il contenuto medio di clorofilla è stato di  $14.0 \pm 2.9$  mg/g (p.s.) in "Tigullio" e  $14.9 \pm 3.2$  mg/g in "Red Rubin". Il contenuto medio di antociani è stato invece di  $0.3 \pm 0.1$  mg/g (p.s.) in "Tigullio";  $15.1 \pm 3.8$  mg/g in "Red Rubin".

## 2.5 DISCUSSIONE

La tolleranza all'eccesso di B dipende dalla specie (v. Cap. 1) ma esiste anche una grande variabilità intra-specifica come osservato in orzo, grano e appunto nel basilico (Nable, 1988, Paull *et al.*, 1988, Reid e Fitzpatrick, 2009; Landi *et al.*, 2013). In questo lavoro, le due cultivar di basilico hanno mostrato una diversa tolleranza. L'analisi di crescita e la valutazione visiva dei sintomi tipici della tossicità da B hanno confermato i risultati di precedenti esperimenti (Landi *et al.*, 2012, 2013a, 2013b).

Quando le piante sono state allevate con 20 mg/L di B, la riduzione di biomassa è stata mediamente del 35% in "Tigullio" e del 10% in "Red Rubin" rispetto alle piante di controllo (**Tabella 2.3 e Figura 2.10**).

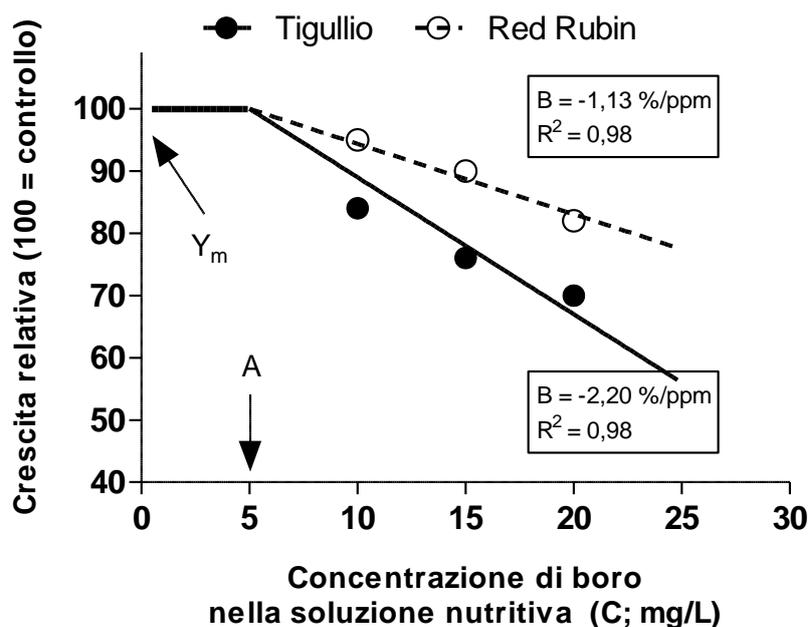
I dati relativi alla crescita (biomassa secca) registrati nel secondo esperimento (**Figura 2.10**) sono stati elaborati utilizzando il modello proposto da Maas e Hoffman (1977) per descrivere la risposta delle piante allo stress salino. Questo modello descrive la crescita o la produzione di una coltura (Y) in funzione della concentrazione salina nel mezzo di crescita:

$$Y = 100 - B (C - A)$$

dove: A è la soglia di tolleranza alla salinità del terreno o dell'acqua irrigua (nel nostro, sostituita dalla concentrazione di B nella NS), oltre il quale comincia a verificarsi una riduzione produttiva rispetto alle condizioni ottimali; B è la pendenza della relazione lineare (negativa) tra Y e la salinità o appunto la concentrazione, ovvero la riduzione della crescita o della produzione relativa per ogni incremento unitario della salinità o della concentrazione di B.

Il modello di Maas-Hoffman applicato alla crescita del basilico con concentrazioni del B nella soluzioni nutritiva comprese tra 0,2 e 25 mg/L è illustrato nella **Figura 2.14**. Al di sopra di 5 mg/L (A), per un incremento di 1 mg/L della concentrazione di B nella soluzione nutritiva la crescita si è ridotta del 2,20% in "Tigullio" e del 1,04% in "Red Rubin". Le due pendenze sono significativamente differenti per un livello di probabilità superiore al 5%.

La riduzione di crescita è stata attribuita da Landi *et al.* (2012 e 2013a) ad una riduzione della fotosintesi fogliare provocata dallo stress ossidativo indotto dall'eccesso di B. Gli stessi autori hanno spiegato la maggior tolleranza (o minore sensibilità) delle varietà di basilico a foglie rosse (nel loro esperimento, oltre a "Red Rubin" è stata usata la varietà "Dark Opal") con una maggiore capacità ossidante rispetto alle varietà di basilico a foglie verde.



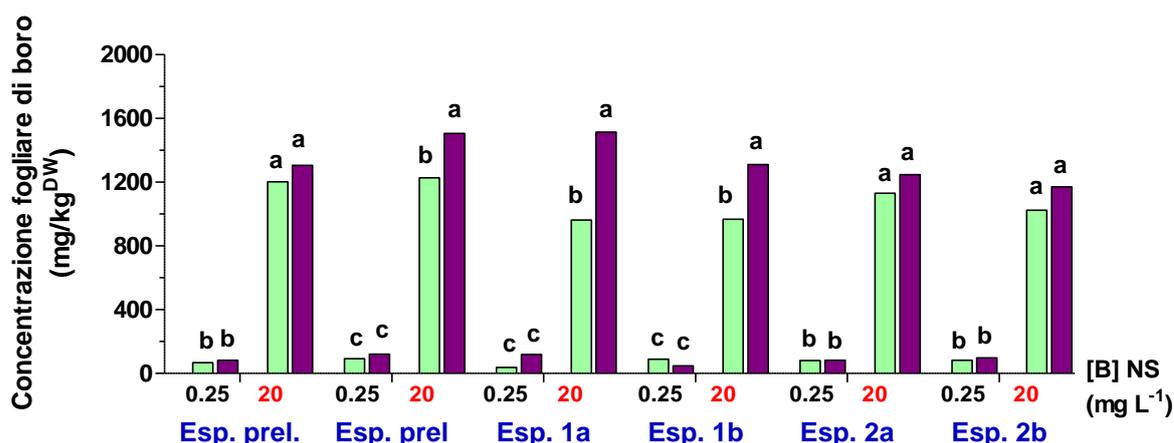
**Figura 2.14.** Relazione tra la crescita di due cultivar di basilico coltivate in idroponica alla concentrazione di B nella soluzione nutritiva, descritta con il modello di Maas e Hoffman (1977).

Le piante adottano svariati meccanismi per tollerare l'eccesso di B nel mezzo di coltivazione: 1) esclusione a livello radicale anche grazie alla sua estrusione; 2) riduzione del suo caricamento nello xilema; 3) rimobilizzazione / redistribuzione all'interno della pianta; 4) redistribuzione dal simplasto all'apoplasto o nel vacuolo

L'esclusione è il meccanismo più semplice. La pianta evita di assorbire l'elemento all'interno delle radici, riducendo ad esempio la presenza di proteine canale NIP sulle membrane plasmatiche a livello della zona tra cilindro corticale e cilindro centrale (Miwa e Fujiwara, 2010). Attraverso proteine BOR (trasportatori di membrana) il B può essere scaricato di nuovo verso l'apoplasto e da qui nel mezzo di crescita (estrusione) (Miwa e Fujiwara, 2010). La minore presenza di queste proteine può ridurre, inoltre, il caricamento del B nello xilema diminuendo la sua traslocazione e il suo accumulo nella parte aerea (Miwa e Fujiwara, 2010). Le specie che producono polialcoli come sorbitolo, mannitolo e dulcitolio riescono a rimobilizzare il B allocandolo in tessuti meno sensibili o "sacrificabili" (es. dalle nuove foglie alle vecchie foglie) (Miwa e Fujiwara, 2010). Non è questo, però, il caso del basilico. In alcune specie come l'orzo si può avere una redistribuzione a livello cellulare (Reid e Fitzpatrick, 2009): per mezzo di trasportatori BOR e TIP, il B viene allontanato dal simplasto

verso l'apoplasto o il vacuolo, per evitare che eserciti i suoi effetti dannosi nel citoplasma.

In questo studio, la minore sensibilità di "Red Rubin" all'eccesso di B non è apparsa associata ad una maggiore capacità di questa varietà di controllare l'assorbimento del B e/o la sua traslocazione verso le foglie né ad una minore attività traspiratoria. Infatti, l'assorbimento idrico, la traspirazione fogliare e la concentrazione di B nelle foglie e nella linfa xilematica sono stati simili nelle due varietà o addirittura superiori in "Red Rubin" (Tabella 2.4 e 2.5; Figura 2.11). Considerando anche alcune prove preliminari, le analisi del contenuto fogliare di B sono state condotte in sei diverse occasioni (Figura 2.15). In tutti i casi non si sono rilevate differenze significative tra le due varietà quando erano coltivate nelle condizioni di controllo mentre con 20 mg/L di B nella soluzione nutritiva la concentrazione fogliare di B è stata sempre superiore in "Red Rubin" e in tre esperimenti questa differenza è stata statisticamente significativa .



**Figura 2.15.** Influenza della concentrazione di boro (B) nella soluzione nutritiva sulla concentrazione fogliare di questo elemento in due cultivar di basilico coltivate in idroponica per circa tre settimane giorni in serra. Valori medi ( $\pm$  s.e.) di 4 replicati. I valori medi ( $n = 4$ ) seguiti dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti ( $P < 0,05$ ) in base al test LSD (least significant difference).

Le maggiori concentrazioni di B rilevate nelle foglie di "Red Rubin" rispetto all'altra varietà (Tabella 2.5; Figura 2.11) appaiono il risultato di una maggiore traspirazione per unità di superficie fogliare (Tabella 2.4) e di una maggiore concentrazione di B nella linfa xilematica (Figura 2.12). Tra le due varietà, invece, non sono state osservate differenze nella concentrazione di B nelle radici e negli steli (Tabella 2.5).

Il B è assorbito dalle piante come acido borico con un meccanismo passivo in condizioni di elevate o eccessiva disponibilità di questo elemento nel mezzo di crescita (Miwa e Fujiwara, 2010); dalle radici il B arriva quindi alla parte aerea attraverso lo xilema e tende ad accumularsi negli organi che traspirano (come le foglie), almeno nelle specie che non sono in grado di rimobilizzarlo attraverso il floema. Ci sono però evidenze a favore di meccanismi attivi, che richiedono quindi energia, per stimolare l'assorbimento radicale del B in condizioni di carenza o limitare il suo accumulo nelle cellule in condizioni di eccesso (Miwa e Fujiwara, 2010). Smith et al. (2010) hanno confrontato l'assorbimento di B osservato sperimentalmente in piante di cavolo con l'accumulo previsto in base alla traspirazione fogliare e la concentrazione esterna di B, concludendo che questa specie ha la capacità di limitare l'assorbimento di B e il suo accumulo nella parte aerea. Conclusioni simili sono state raggiunte su pomodoro da Carmassi et al. (2012). Negli esperimenti con il basilico, il rapporto tra la concentrazione di assorbimento e la concentrazione esterna del B (**Tabella 2.6**) era intorno ad 1, nelle condizioni di controllo, suggerendo un assorbimento passivo. Diversamente, in presenza di un'alta concentrazione di B il rapporto tra la concentrazione di assorbimento e la concentrazione esterna è stata molto bassa e pressoché identica nelle due varietà (0,12 in media), indicando che le piante sono state in grado di limitare l'assorbimento del B, probabilmente grazie all'attivazione di un processo di estrusione del B.

I dati riportati nella **Figura 2.11** (Esperimento 2) suggeriscono una maggiore capacità di controllare il flusso di B a concentrazioni esterne superiori a 15 mg/L, senza particolari differenze tra le due cultivar, comunque. Infatti, la concentrazione fogliare aumenta in modo proporzionale alla concentrazione esterna fino a 15 mg/L; per valori superiori, però, il contenuto fogliare cresce molto meno con la concentrazione esterna. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato da una minore attività traspiratoria al di sopra di 15 mg/L e/o alla capacità di esclusione operata a livello delle radici e/o del caricamento del B nello xilema. I dati della traspirazione fogliare del primo esperimento (**Tabella 2.5**) e delle concentrazioni di B nella linfa xilematica (**Figura 2.12**) escludono però queste due cause. Occorre far notare che i dati della **Figura 2.12** si riferiscono alle concentrazioni di B determinate non sull'intero complesso di foglie presenti sulla pianta al momento del campionamento, ma solo sulle foglie del III e IV nodo. Per chiarire le cause dell'andamento bi-fasico della relazione tra la concentrazione di B nelle foglie e nella soluzione idroponica, sono necessari altri studi per determinare l'assorbimento totale di B dell'intera pianta e la sua distribuzione nei vari organi in funzione di un ampio range di concentrazione di B nella soluzione nutritiva.

L'eccesso di B in soluzione non ha determinato alcuna deficienza minerale nelle piante di basilico. In entrambe le cultivar, infatti, il contenuto fogliare dei vari macro- e micro-elementi è apparso ottimale e non si sono osservate differenze significative tra le piante coltivate a 0,2 e 20 mg/L di B. In un esperimento il contenuto fogliare di K, Fe e Mn è stato addirittura superiore nelle piante di "Red Rubin" coltivate con 20 mg/L di B rispetto ai controlli. Pertanto, possiamo anche escludere che la minor crescita delle piante esposte all'eccesso di B sia attribuibile ad un'alterazione dello stato minerale e che la diversa tolleranza delle due varietà oggetto di studio sia legata alla capacità di mantenere un favorevole stato azotato e la normale omeostasi ionica (bilancio elettrochimico e aggiustamento osmotico).

Rimane perciò aperto l'interrogativo su quali siano i meccanismi responsabili della maggiore tolleranza della cultivar "Red Rubin" all'eccesso di B. Un possibile meccanismo è quello osservato da Reid e Fitzpatrick (2009) in uno studio con due diverse cultivar di orzo, una tollerante e una sensibile all'eccesso di B. Questo meccanismo consiste nella redistribuzione del B dal simplasto verso l'apoplasto (parete cellulare e spazi intercellulari), che limiterebbe le conseguenze dello stress ossidativa a livello intra-cellulare.

Landi et al. (2012 e 2013) attribuisce la diversa tolleranza al B delle due varietà "Red Rubin" e "Tigullio" alla maggiore capacità antiossidante delle foglie "rosse", che allevierebbe lo stress ossidativo provocato dall'eccesso di B. Questa maggior capacità antiossidante è determinata da un contenuto costitutivamente superiore non solo di antociani, ma anche di acido ascorbico, glutazione e fenoli totali.

Il B può influenzare il metabolismo dei fenoli e condizioni di carenza o al contrario di eccesso di B possono aumentare il contenuto fogliare di fenoli (e.g. Camacho-Cristóbal et al., 2002; Ruiz et al., 1998). L'acido rosmarinico è uno tra i composti fenolici più abbondanti presenti nei tessuti di basilico (Jayasinghe et al., 2003; Li et al., 2007; Makri e Kintzios, 2007; Lee e Scagel 2009). La sintesi e l'accumulo di questo metabolita dipendono molto dal genotipo e sono influenzate da diversi tipi di stress, come ad es. un'alterazione nella nutrizione azotata (Nguyen e Niemeyer, 2008, Kiferle et al., 2013), dalla salinità o dalla ipossia radicale (Tarchoune et al., 2009; Kiferle et al., 2012).

Nel basilico della cv. "Genovese" coltivata in floating in condizioni di salinità o senza aerazione della soluzione nutritiva (ipossia), Kiferle et al. (2012) hanno osservato una variazione nel contenuto radicale di acido rosmarinico. Tarchoune et al. (2009) hanno rilevato una diminuzione nel contenuto fogliare di acido rosmarinico in risposta al NaCl (50 mM).

Per quanto riguarda la nutrizione azotata, è stato mostrato che una diminuzione nell'apporto di questo elemento (fornito esclusivamente in forma nitrica) determinava un aumento nel contenuto fogliare di acido rosmarinico (Nguyen e Niemeyer, 2008; Kiferle et al., 2013) mentre la somministrazione di azoto ammoniacale aveva un effetto opposto, anche in presenza di nitrato (Kiferle et al., 2013).

Gli esperimenti di questa tesi hanno messo in evidenza che: i) in entrambe le cultivar esaminate, il contenuto di fenoli totali e di acido rosmarinico non è stato influenzato dalla concentrazione di B nella soluzione nutritiva (**Tabella 2.8**); ii) i livelli di questi composti erano assai più alti della varietà con foglie rosse rispetto a quella con foglie verde, in accordo con quanto riportato da Landi et al. (2012 e 2013).

## CONCLUSIONI

La maggiore tolleranza all'eccesso di B mostrata dalla varietà di basilico a foglie rosse "Red Rubin" rispetto alla varietà "Tigullio" non è legata alla capacità di ridurre l'assorbimento radicale del B né la traslocazione verso le foglie di questo elemento, grazie ad un minor caricamento del B nello xilema e/o una riduzione della traspirazione e quindi del flusso di acqua e B verso le foglie.

Le ragioni della differente risposta al B delle due varietà sembrano quindi riconducibili alla maggiore capacità antiossidante delle foglie "rosse", che allevierebbe lo stress ossidativo provocato dall'eccesso di B, come dimostrato da Landi et al. (2012 e 2013). Negli esperimenti condotti per questa tesi, la tolleranza all'eccesso di B della varietà a foglie rosse sembrerebbe di tipo costitutivo, almeno in parte, in quanto lo stress da B non ha indotto significative variazioni del contenuto fogliare di fenoli e di acido rosmarinico, che è stato molto più alto in "Red Rubin" che in "Tigullio".

Non possiamo però escludere che nelle foglie di "Red Rubin" sia attivo un processo di redistribuzione del B dal simplasto verso l'apoplasto (parete cellulare e spazi intercellulari) in grado di alleviare le conseguenze dello stress ossidativa a livello intra-cellulare. Per chiarire questo punto occorrono ulteriori studi con tecniche avanzate di microscopia elettronica e micro-analisi (TEM-EDS).

## BIBLIOGRAFIA

- Alpaslan M, Gunes A. (2001) Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant and Soil* 236: 123–128.
- Bastias EI, Gonzales-Moro M.B, Gonzales-Murua C. (2004). Zea Mays L. amylacea from the Lluta Valley (Arica-Chile) tolerates salinity stress when high levels of boron are available. *Plant and Soil* 267: 73-84.
- Ben-Gal A, Shani U. (2002). Yield, transpiration and growth of tomatoes under combined excess boron and salinity stress. *Plant and Soil* 247: 211-221.
- Ben-Gal A, Shani U. (2003). Water use and yield of tomatoes under limited water and excess boron *Plant and Soil* 256: 179–186, 2003.
- Bingham F.T, Page A.L, Coleman N.T, Flach K. (1971). Boron adsorption characteristics of selected soils from Mexico and Hawaii. *Soil Science Society of America Journal* 35: 546-550.
- Boremed (2006). Antonio Muti. Inquinamento da boro un problema non solo italiano: Progetto BOREMED.
- Brown P.H, Bellaloui N, Wimmer M.A, Bassil E.S, Ruiz J, Hu H, Pfeiffer H., Dannel F, Romheld V. (2002). Boron in plant biology. *Plant Biology* 4: 205-223.
- Brown P.H, Shelp B.J. (1997). Boron mobility in plants. *Plant and Soil* 193: 85-101.
- Camacho-Cristóbal J.J., Anzellotti D., González-Fontes A. (2002). Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 997–1002.
- Canter P., H. Thomas, E. Ernst, (2005): “Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology”, *Trends in biotechnology*, vol.23, n.4 pp: 180-185, April 2005.
- Carmassi G., Romani M., Diara C., Massa D., Maggini, R., Incrocci L., Pardossi A. (2012). Response to NaCl salinity and excess boron in greenhouse tomato grown in semi-closed substrate culture in a Mediterranean climate. *Journal of Plant Nutrition* 36 (7), 1025-1042.
- Collin , 2001: “Secondary product formation in plant tissue culture”, *Plant Growth Regulation*, vol.34, 119-134.

- Edelstein M., Ben-Hue M., Cihen R., Burger Y., Ravina I., (2005). Boron and salinity effects on grafted and non grafted melon plants. *Plant Soil*, 269: 273-284.
- Elrashidi M.A., O'Connor G.A. (1982). Boron sorption and desorption in soils. *Soil Science Society of America Journal* 46: 27-31.
- Eraslan F., Inal A., Gunes A., Alpaslan M. (2007). Boron toxicity alters nitrate reductase activity, proline accumulation, membrane permeability, and mineral constituents of tomato and pepper plants. *Journal of Plant Nutrition* 30, 981–994.
- Eraslan F., Inal A., Savasturk O., Günes A., (2007b). Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Sci. Hortic.*, 114: 5-10.
- European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM). 2002. Narrow-leaved coneflower root. *Pharmaceutica* 14 (1): 135-137.
- Falcone A. M., 1990: “La coltura in vitro applicata alle specie aromatiche”. *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale*, 3: 377-386.
- Falvo, 2004. Metabolismi secondari delle piante e “molecular pharming”, Università degli studi di Torino.
- Gupta U.C., Jame Y. W., Campbell C. A., Leyshon A. J., Nicholaichuk W. (1985). Boron Toxicity and Deficiency - a Review. *Canadian Journal of Soil Science* 65: 381-409.
- Ho L.C., Grange R.I., Picken A.J.. (1987). An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant, Cell and Environment* 10: 157–162.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207,604–611.
- Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S (2003) Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4442-4449.
- Johnson A. L. (2005). Boron. *Annu Rep Prog Chem Sect A* 101: 34-53.
- Juliani HR, Koroch AR, Simon JE (2008) Basil: a new source of rosmarinic acid. In: Ho CT, Simon JE, Shahidi F, Shao Y (eds) *Dietary Supplements*, American Chemical Society Symposium Series 987. A.C.S. Washington D.C., USA. pp 129-143.
- Kang and Saltveit (2002) Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding.

- Kiferle C, Lucchesini M, Mensuali-Sodi A, Maggini R, Raffaelli A, Pardossi A. (2011) Rosmarinic acid content in basil plants grown in vitro and in hydroponics. Central European Journal of Biology 6: 946-957.
- Kiferle C., Maggini R., Pardossi A. (2013). Influence of nitrogen nutrition on growth and accumulation of rosmarinic acid in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in hydroponic culture. Australian Journal of Crop Science 7(3), 321-327.
- Kiferle C., Maggini R., Pardossi A. (2013). Influence of root hypoxia and NaCl salinity on sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) grown hydroponically for the production of rosmarinic acid. Agrochimica 41: 257-267.
- Kot S.F., (2008). Boron sources, speciation and its potential impact on health. Reviews Environ. Sci. Biotechn., 8 (1). 3–28.
- Landi M. , Degl’Innocenti, Pardossi A., Guidi L. (2012) Antioxidant and photosynthetic response in plant under boron toxicity: a review. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 2012, 7 (3), 255-270.
- Landi M., Pardossi A., Remorini D., Guidi L. (2013) Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess. Environmental and Experimental Botany 85 (2013) 64– 75.
- Landi M., Remorini D., Pardossi A., Guidi L. (2013). Boron excess affects photosynthesis and antioxidant apparatus of greenhouse Cucurbita pepo and Cucumis sativus. Journal of Plant Research, doi 10.1007/s10265-013-0575-1.
- Landi M., Remorini D., Pardossi A., Guidi L. (2013). Sweet basil (*Ocimum basilicum*) with green or purple leaves: which differences occur in photosynthesis under boron toxicity? Journal of Plant Nutrition and Soil Science, in press. doi: 10.1002/jpln.201200626.
- Lichtenthaler and Buschmann., 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy.
- Maffei, “Metabolismo e prodotti secondari delle piante”, 1999 UTET.
- Maggini R., Kiferle C., Pardossi A. : Chapter 3 “Hydroponic Production of Medicinal Plants”. In: Medicinal Plants: Antioxidant Properties, Traditional Uses and Conservation Strategies. NOVA Publishers. In press [www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=46118](http://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=46118).
- Mahboobi H, Yücel M. & Öktem H.A.(2002). Nitrate reductase and glutamate

dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *Journal of Plant Nutrition* 25: 1829-1837.

- Makri O, Kintzios S (2007) *Ocimum* sp. (basil): botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 13: 123-150.
- Martinez-Valverde, Periago, Ros, “Nutritional meaning of the phenolic compounds from the diet”, *Achivos latinoamericanos de nutricion* 2000.
- Miwa, K., and T. Fujiwara. 2010. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Annals of Botany* 105: 1103-1108.
- Miwa K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K., Fujiwara T. (2007). Plants tolerant of high boron levels. *Science* 318: 1417-1417.
- Nable R.O., Bañuelos G.S., Paull J.G., (1997). Boron toxicity. *Plant Soil*, 193, 181-198.
- Nable R.O. (1988). Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant Soil* 112: 45–52.
- Nguyen P, Niemeyer E (2008) Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8685-8691.
- Noguchi K., Dannel F., Pfeffer H., Romheld V., Hayashi H., Fujiwara T. (2000). Defect in root-shoot translocation of boron in *Arabidopsis thaliana* mutant bor1-1. *Journal of Plant Physiology* 156: 751-755.
- O’Prey, Brown, Fleming, Harrison, “Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells”, *Biochemical pharmacology* 2003.
- Pardossi A., Malorgio F., Incrocci L., Tognoni F. (2006). Hydroponic technologies for greenhouse crops. In "Crops: Quality, Growth and Biotechnology". Editor : Ramdane Dris (Ed.) WFL Publisher, Meri-Rastilan tie 3 C, 00980 Helsinki, Finland. ISBN : 952-91-8601-0. Pp. 360-378.
- Paull J.G., Cartwright B., Rathjen A. (1988). Responses of wheat and barley genotypes to toxic concentrations of soil boron. *Euphytica* 39, 137–144.
- Pengelly A., 1996. The constituents of medicinal plants: An introduction to the chemistry and Therapeutics of Herbal Medicines. Muswellbrook: Sunflower Herbals.
- Pichersky, Gang, “Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective”, *Trends in plant sciences* Octobre 2000, vol.5, n°10 pp.439-445.

- Reid R., Fitzpatrick K. (2009). Influence of leaf tolerance mechanisms and rain on boron toxicity in barley and wheat. *Plant Physiology* 151: 413-420.
- Renzulli C., Galvano F., Pierdomenico L., Speroni E., Guera M.C. Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) *J. Appl. Toxicol.*, 24 (4):289-96 15300717.
- Rose-Koga E.F., Sheppard S.M.F., Chaussidon M., Carignan J. (2006). Boron isotopic composition of atmospheric precipitations and liquid-vapour fractionations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 1603-1615.
- Ruiz J.M., Bretones G., Baghour M., Ragala L., Belakbir A., Romero L. 1998. Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry* 48(2), 269-272.
- Smith T.E., Grattan S.R., Grieve C.M., Poss J.A., Suarez D.L. (2010). Salinity's influence on boron toxicity in broccoli: I. impacts on yield, biomass distribution and water use. Doi: 10.1016/j.agwat. 2010.01.014.
- Takano J., Miwa K., Fujiwara T. (2008). Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in Plant Science* 13: 451-457.
- Tanaka M., Fujiwara T. (2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 456: 671-677.
- Tarchoune I., Incerti A., Lachaal M., Ouerghi Z., Izzo R., Navari, F. 2009. Relations between antioxidant activity and salinity in basil (*Ocimum basilicum* Mill.). *Agrochimica* 53, 56-65.
- Tyler V.E., Brady L.R., Robbers J.E., 1988. *Pharmacognosy*, 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger.
- Verlet N., 1994. An overview of the medicinal and aromatic plant industry. Proceedings International Meeting on "Cultivation and Improvement of medicinal and aromatics plants", Trento, 2-3 giugno 1994.
- Yermiyahu U, Ben-Gal A, Keren R, Reid R J (2008) Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield. *Plant and Soil* 304: 73-87.

## **RINGRAZIAMENTI**

*Prima di tutti vorrei ringraziare i miei cari genitori, senza i quali tutto questo non sarebbe stato possibile.*

*Ringrazio la mia ragazza Paola che mi è sempre stata accanto, sostenendomi, incoraggiandomi e dandomi la forza per andare avanti.*

*Ringrazio il professor Alberto Pardossi per la pazienza e per l'aiuto nella realizzazione di questa tesi.*

*Ringrazio tutto il dipartimento di ortofloricoltura di Villa Victorine per il piacevole periodo passato insieme ed in particolare Mirco e Rita per la loro grande disponibilità ed assistenza.*

*Ringrazio tutti gli amici vecchi e nuovi, lontani e vicini che hanno manifestato la loro presenza ed affetto.*

*Vi ringrazio tutti di cuore.*