

“Valutazione della tolleranza al sale in specie vegetali presenti nella
Riserva naturale statale ”Saline di Tarquinia”

Responsabile della Ricerca:

Prof. Cinzia Forni

Laboratorio di Botanica e Fitotecnologie

Dipartimento di Biologia

Università di Roma “Tor Vergata”

Via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma

Tel: 0672594345; E-mail: forni@uniroma2.it

Collaboratori

Dott. Patrizia Di Cori

Laboratorio di Botanica e Fitotecnologie

Dipartimento di Biologia

Università di Roma “Tor Vergata”

Via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma

Tel: 0672594345; E-mail: patrizia.dicori@virgilio.it

**Questo studio è stato promosso e finanziato dal
Corpo Forestale dello Stato – Ufficio per la Biodiversità**

Scopo del Progetto di Ricerca

La Riserva di Tarquinia, unica salina della Regione Lazio, è di particolare interesse per la presenza di specie vegetali rare e di specie tipiche della macchia mediterranea, e rappresenta un ambiente naturale ideale per effettuare studi sulla risposta delle piante alla salinità (Fig. 1).

Il progetto di ricerca ha avuto l'obiettivo di valutare la tolleranza allo stress salino di alcune specie presenti in riserva. La specie selezionata in questo primo anno di studio è stata il *Myrtus communis* L., in quanto bene adattata in aree della riserva soggette a diversi livelli di esposizione al sale e ad erosione del terreno.

Il mirto è un arbusto diffuso nel bacino del Mediterraneo, appartenente alla vegetazione dell'Oleo-ceratonion spesso associato a *Pistacia lentiscus* L., *Fillirea* e *Arbutus unedo* L., che si adatta bene a diverse tipologie pedologiche. Possiede foglie coriacee e persistenti. Fioritura estiva a seguito della quale vengono prodotte bacche sferiche di colore blu-viola (Perrone, 1990). Numerosi lavori scientifici hanno messo in luce le sue proprietà antimicrobiche (Deriu *et al.*, 2007; Tretiakova *et al.*, 2008), anti-iperglicemiche (Mimika-Dukić, 2010) e cosmetiche. Il liquore prodotto in Italia dalle sue bacche viene esportato in quantitativo pari a 3 milioni di litri/anno (Mulas *et al.*, 2012).

Lo studio è stato condotto attraverso l'analisi delle variazioni morfologiche e biochimiche osservate nella parte epigea delle piante, in quanto la presenza di stress biotici o eventuali fattori di disturbo ambientali generano una risposta nella pianta che è possibile rilevare. I marcatori fisiologici di stress sono molecole la cui produzione può essere incrementata o ridotta a seguito di uno stress. Nel primo caso il fattore di stress funge da elicitore verso quella molecola e la conseguente iperproduzione ne attesta il suo effettivo coinvolgimento nel meccanismo di difesa contro lo stress. Fanno parte di questa categoria i metaboliti secondari quali antociani e fenoli. Sono una classe di molecole che non sono coinvolte direttamente nel metabolismo primario delle piante, ma il cui ruolo è importante per ridurre lo stress ossidativo, per conferire colore a foglie e frutti con conseguente azione vessillare nei confronti degli insetti pronubi. Inoltre, nelle piante l'esposizione allo stress salino può ridurre la concentrazione delle clorofille e di conseguenza l'attività fotosintetica.

Il progetto prevedeva 4 rilievi in campo che coincidevano con l'alternanza stagionale, e successive analisi di laboratorio dei campioni prelevati durante ciascun rilievo (Tab. 1).

La RNS Saline di Tarquinia

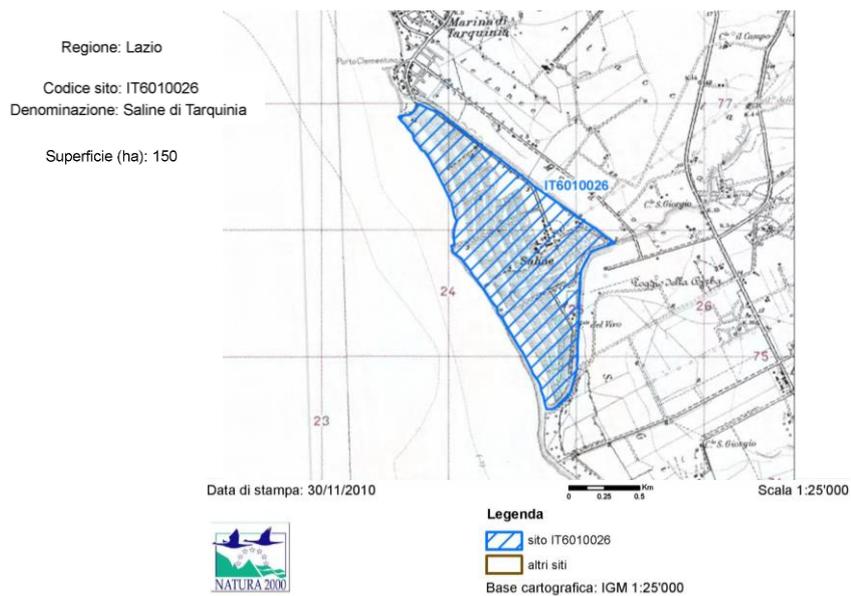


Figura 1. Mappa dell'area protetta Saline di Tarquinia.

Tabella 1 Scheda temporale dei rilievi e campionamenti effettuati nel 2014

Specie	Periodo dei rilievi	Analisi
<i>Myrtus communis</i> L.	Giugno Luglio Ottobre Dicembre	Crescita Polifenoli Carotenoidi Clorofille Valutazione dei solidi disciolti nel frutto.

I dati ottenuti saranno riportati in una tesi di Dottorato in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia, e in Pubblicazioni e comunicazioni a Congressi Nazionali ed Internazionali allo scopo di diffondere il più possibile i risultati.

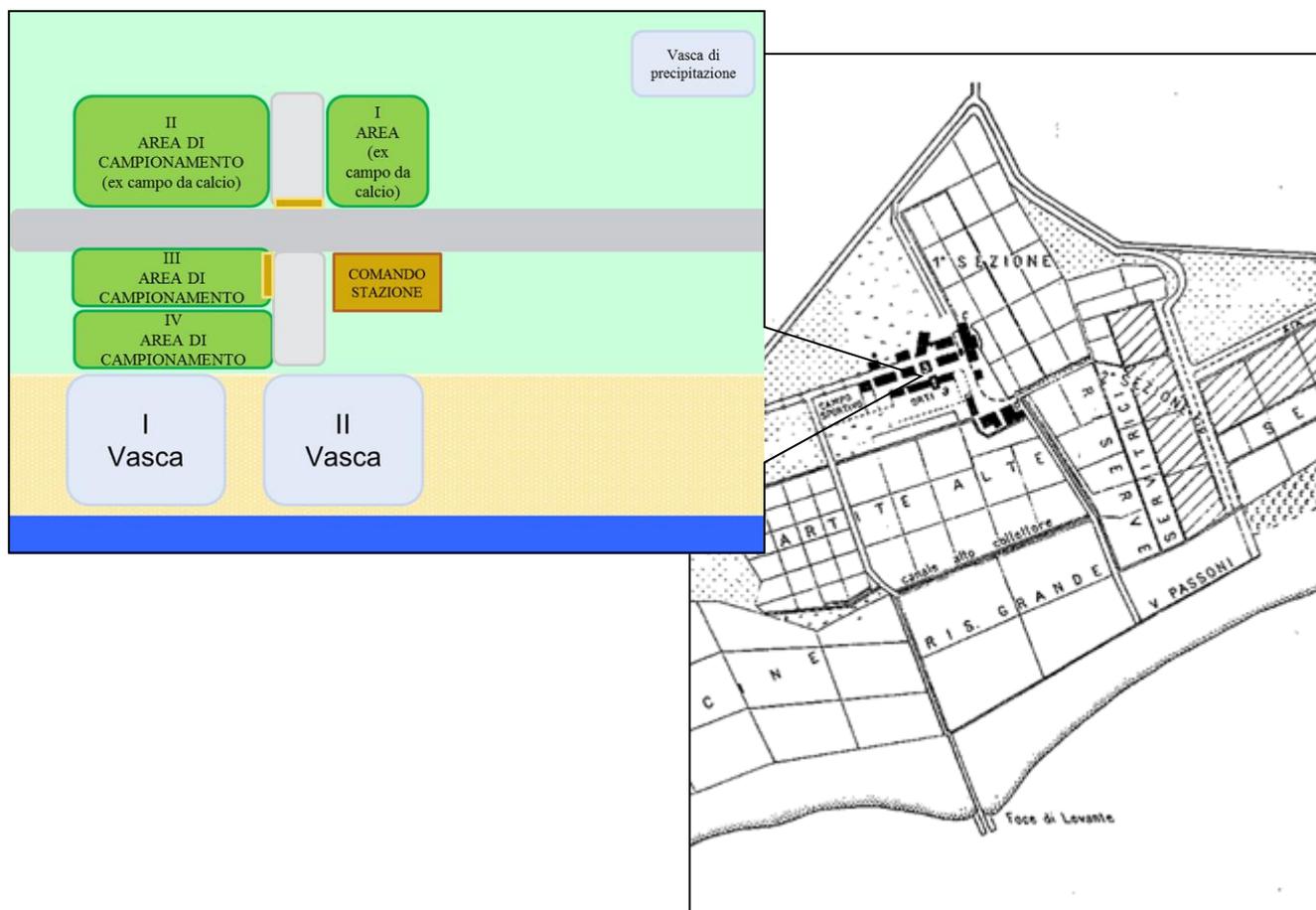


Figura 2. Mappa dei rilievi.

Materiali e Metodi

Rilievi in campo

Le piante sono state individuate e numerate mediante etichettatura in quattro aree limitrofe che si distinguono tra di loro sulla base delle caratteristiche del suolo e per la maggiore o minore vicinanza al mare (Fig.2). L'Area 1 e 2 sono assai simili tra loro per i due caratteri distintivi precedentemente menzionati, essendo aree adiacenti, posizionate nell'entroterra, il suolo è composto da argilla e pozzolana. L'Area 3 è posizionata tra l'Area 2 e l'Area 4, è proiettata verso il mare ed il suolo è formato prevalentemente da argilla e sabbia. L'area 4 è la più esposta ad aerosol marino e salinità in quanto è adiacente ad una delle vasche di evaporazione.

I campioni raccolti sono stati lavati, congelati in azoto liquido e mantenuti a -80°C fino al loro utilizzo per le analisi.

Analisi biochimiche

L'estrazione dei pigmenti fotosintetici è stata effettuata in etanolo 95%. La concentrazione di clorofilla a (C_a), clorofilla b (C_b) e carotenoidi (C_{x+c}) è stata calcolata usando i valori di assorbanza, ottenuti mediante lo spettrofotometro, rispettivamente a 664,2 nm ($A_{664,2}$), 648,6 nm ($A_{648,6}$) e 470 nm (A_{470}) nelle seguenti formule (Lichtenthaler, 1987).

La determinazione del contenuto in polifenoli è avvenuta in accordo con il metodo Folin-Ciocalteu (Booker and Miller, 1998). I campioni venivano omogeneizzati in azoto liquido e mantenuti per 1 ora in sospensione in 0.1 N HCl a 5°C in agitazione (Forni *et al.*, 2012). La concentrazione dei fenoli è stata calcolata sulla base di una retta di taratura ottenuta mediante la preparazione di soluzioni a concentrazione nota di acido clorogenico. I valori sono espressi come μg acido clorogenico equivalenti/mg peso fresco.

Tra i metaboliti secondari con funzione antiossidante è stata posta l'attenzione sugli antociani. L'estrazione è stata effettuata con metanolo acidificato con 1% HCl. L'estratto ottenuto dall'epicarpo dei frutti è stato centrifugato e diluito prima della lettura allo spettrofotometro alle seguenti lunghezze d'onda: 530 e 657 nm (Mancinelli, 1990).

L'impiego di un rifrattometro ha consentito di stimare la concentrazione in gradi Brix dei solidi totali disciolti nel succo ottenuto da 4 bacche di mirto. L'omogenato è stato centrifugato per ottenere un succo privo di pellet. L'operazione è stata ripetuta al fine di ottenere un estratto privo di particolato. Le misurazioni sono state effettuate su 5 ripetizioni biologiche.

Risultati

Nel primo anno di osservazione (Maggio 2013 - Giugno 2014) lo sviluppo medio in altezza delle piante di mirto era 23 cm. I successivi rilievi, effettuati con periodicità stagionale, hanno messo in evidenza due picchi di crescita media delle piante nei periodi Maggio-Luglio 2014 (11.6 cm) e Ottobre-Dicembre 2014 (10 cm; Fig. 3). Tali intervalli temporali coincidono rispettivamente con i periodi di fioritura e fruttificazione. Non sono state osservate differenze nello sviluppo in altezza delle piante in funzione dell'area di crescita. L'incidenza di fenomeni di senescenza e mancata crescita osservata in alcuni individui, fa supporre che la diminuzione dello sviluppo in altezza degli arbusti sia da attribuire all'età della pianta piuttosto che alla maggiore o minore vicinanza al litorale, in quanto è stato rilevato che il 50 % delle piante messe a dimora da meno di un anno (Area 1) mostravano una riduzione della crescita in altezza dovuta a senescenza dei rami più sviluppati. Tale andamento non è stato rilevato nell'Area 2, con pedologia simile, ma con esemplari messi a dimora da più di 5 anni.

Il contenuto in clorofilla a e b (Fig. 4) nel rilievo di Ottobre variava in funzione del sito di campionamento, in quanto le piante più esposte alla salinità (verso la piscina di raccolta del sale, Area 4) hanno una concentrazione di clorofilla minore rispetto ai primi due siti di prelievo (Area 1 e 3). Il rapporto tra clorofilla a/b è di 2,1 nell'Area 1 e 2,4 nell'Area 4. Nel mese di Dicembre il contenuto in clorofilla nelle piante non variava rispetto al precedente campionamento. Non è stata osservata variazione nel contenuto in carotenoidi in tutti i rilievi (Fig. 4).

Il contenuto in polifenoli aumentava nei mesi di Luglio (48,9 µg/mg peso fresco) e di Dicembre (55µg/mg peso fresco), periodo in cui le bacche sono giunte completamente a maturazione (Fig. 5). Il contenuto in solidi totali disciolti dei frutti non mostrava variazioni significative in relazione ai siti di campionamento delle bacche (Fig. 6).

Una riduzione della pigmentazione del frutto è stata osservata nel solo campione presente sulla duna sabbiosa in località Punta delle Quaglie, tale dato è da associare al basso contenuto di antociani (Figg. 7,8). Nel mese di Ottobre, periodo in cui la maggior parte delle piante avevano frutti bruno violacei, questo campione mostrava bacche bianco-verdi, che maturavano nel mese di Dicembre senza mai raggiungere una pigmentazione uniforme (Fig. 9).

Conclusioni

Le piante di mirto mostrano un elevato grado di adattamento a diverse tipologie pedologiche (pozzolana, sabbia e suolo costituito da torba) completando il loro ciclo produttivo anche se esposte a condizioni avverse di vento, salinità e siccità. Tuttavia, tali forzanti ambientali sono causa della riduzione della pigmentazione dei frutti, come verificato in questo studio dalla riduzione del contenuto in antociani. Inoltre, l'esposizione al sale incide sul contenuto in clorofilla nel rilievo di Ottobre, mentre l'assenza di variazioni nella concentrazione di carotenoidi fa ipotizzare il fatto che essi non prendano parte ai meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo della pianta, confermando i dati ottenuti con la stessa specie *in vitro* (Di Cori *et al.*, 2013).

La stagionalità sembra essere la principale causa che induce variazioni nel contenuto in polifenoli totali. Il mirto possiede un elevato livello costitutivo di polifenoli, con valori paragonabili al contenuto di polifenoli nell'estratto di *Rosmarinus officinalis* L. (34-119 mg acido gallico/g estratto) (Yesil Celiktas *et al.*, 2007), una pianta officinale con elevato potere antiossidante. L'elevato contenuto di questi composti antiossidanti rende la specie adatta a colonizzare habitat litorali quali le dune sabbiose e le aree costiere interne interessate da continui apporti di sale.

Questi risultati confermano la buona tolleranza del mirto all'ambiente salino della Riserva, che è un ex sito industriale. Ulteriori studi volti a quantificare il contenuto di ioni in pianta, potranno chiarire se il mirto adotta eventuali meccanismi di esclusione nei confronti del sodio e se la presenza di sale ha effetto sulle proprietà nutritive del frutto, influenzando l'appetibilità delle bacche da parte dell'abbondante avifauna presente nel sito. Attraverso l'ampliamento delle indagini fisiologiche sulle altre specie alofile, sarà possibile determinare la loro soglia di tolleranza nei confronti del sale. Tali indagini consentiranno di selezionare specie con l'obiettivo di recupero e ripristino dell'area naturale protetta che è stata utilizzata per la produzione di sale fino al 1998. Le attività di estrazione del sale e quelle antropiche nel loro insieme hanno inevitabilmente creato un impatto negativo che ha cambiato radicalmente l'aspetto naturale della zona. Tuttavia a pochi anni dalla cessazione delle attività industriali e dall'istituzione della riserva, gli interventi di riqualificazione, effettuati dal Corpo Forestale, si aggiungono alle capacità di resilienza di un ecosistema che spontaneamente ha già innescato un processo successionale in cui la vegetazione spontanea, a partire dalle specie pioniere, va a ricolonizzare gli habitat naturali. In questa prospettiva di riqualificazione si rivela fondamentale un approccio eco-fisiologico per la selezione di specie adattate agli habitat iperalini e al fine di ripristinare le fitocenosi originarie caratterizzate sia da specie alofile e sia da quelle più strettamente associate al bioma di macchia mediterranea. Si procederà alla stesura di un protocollo finale volto a definire i marker di stress e la dinamica delle popolazioni delle specie che colonizzano la RNS Saline di Tarquinia, con particolare attenzione alle specie incluse nella direttiva Habitat.

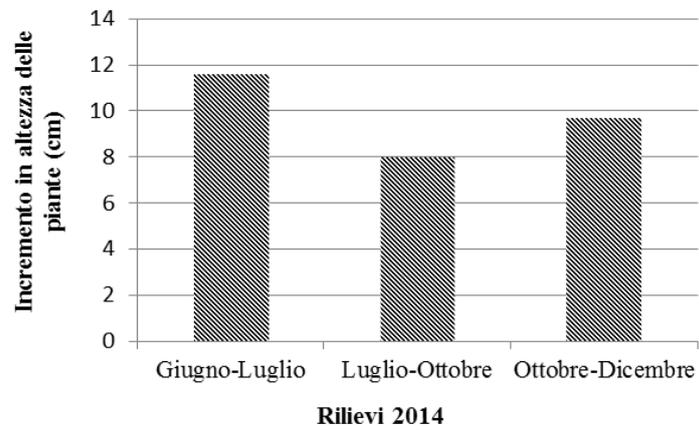


Figura 3. Incrementi della crescita delle piante. I valori rappresentano le medie degli incrementi rilevati.

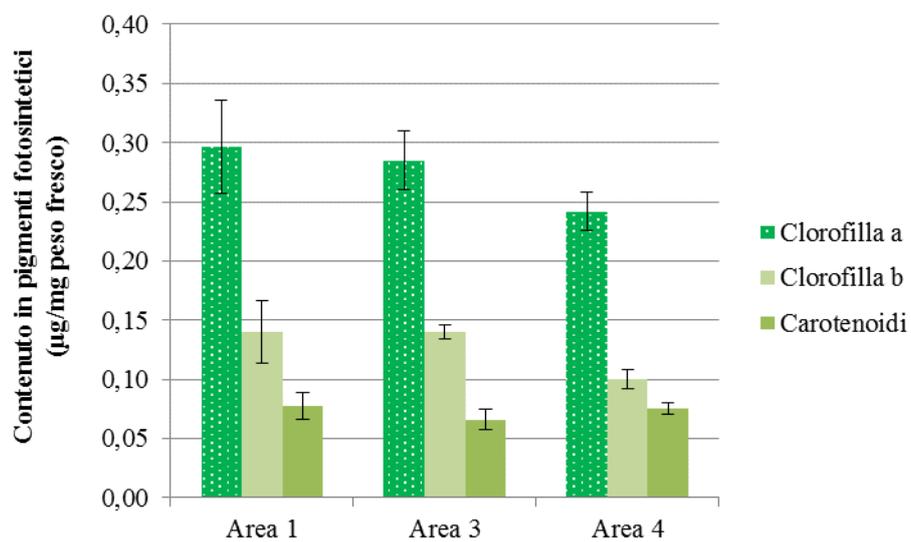


Figura 4. Contenuto in clorofilla e carotenoidi delle foglie nei campioni raccolti in ottobre.

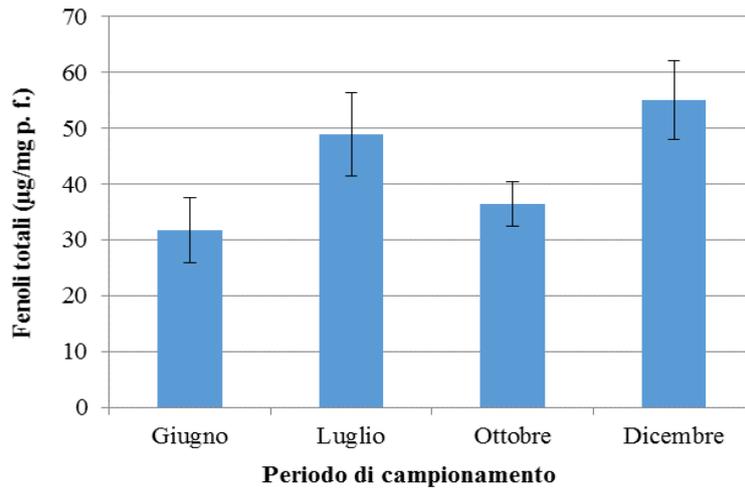


Figura 5. Contenuto in polifenoli in campioni di foglie di mirto nell'anno 2014. I valori sono espressi come µg acido clorogenico equivalenti/mg peso fresco.

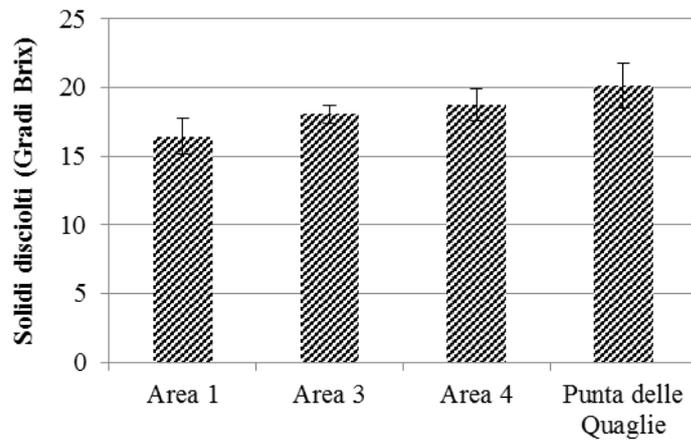


Figura 6. Contenuto in solidi disciolti nei frutti.

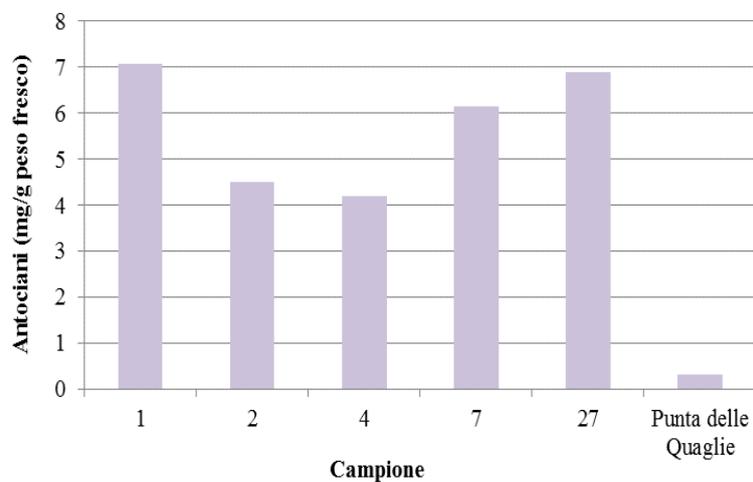


Figura 7. Quantificazione degli antociani nei frutti in esemplari di mirto presenti nelle saline.



Figura 8. Sito di campionamento in località Punta delle Quaglie (Tarquinia) e fenologia del mese di Ottobre del campione di mirto (sinistra).

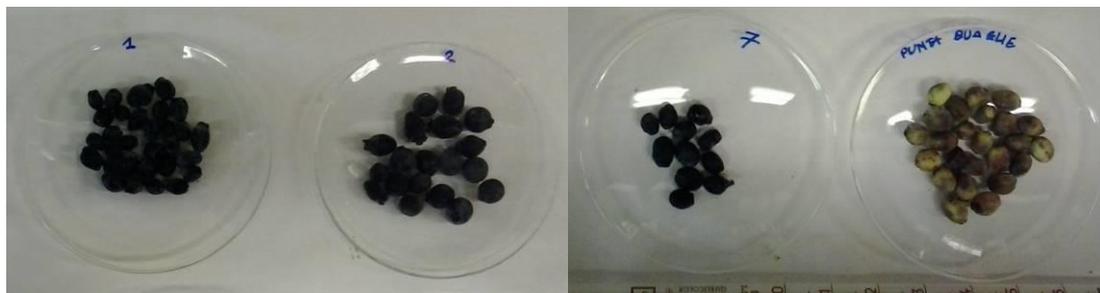


Figura 9. Stadi di maturazione di frutti raccolti dalle piante dell'Area 1 (1, 2) e Area 2 (7) e in località Punta delle Quaglie, rilievo di Dicembre.

Bibliografia

- Booker F. L. and Miller J. E. (1998). Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) leaves following exposure to ozone. *Journal of Experimental Botany* 49 (324), 1191-1202.
- Deriu, A., Branca, G., Molicotti, P., Pintore, G., Chessa, M., Tirillini, B., Paglietti, B., Mura, A., Sechi, L.A., Fadda, G., Zanetti, S. (2007). *In vitro* activity of essential oil of *Myrtus communis* L. against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 562-563.
- Di Cori P., Luciola S., Frattarelli A., Nota P., Tel-Or E., Benyamini E., Gottlieb H., Caboni E., Forni C. (2013). Characterization of the response of *in vitro* cultured *Myrtus communis* L. plants to high concentrations of NaCl. *Plant Physiology Biochemistry* 73, 420-426.
- Forni C., Braglia R., Harren F.J.M. and Cristescu S.M. (2012). Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecylsulphate (SDS). *Aquatic Toxicology* 110-111, 107-113.
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology*, S.P. Colowich and N.O. Kaplan. eds 148, pp. 350-382. Academic Press.
- Mancinelli, A.L. (1990). Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production. *Plant. Physiol.* 92, 1191-1195.
- Mimika-Dukić, N., Bugarin, D., Grebovi, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, D., Jovin, E., Couladis, M. (2010). Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules*, 15, 2759-2770.
- Mulas, M. (2012). The myrtle (*Myrtus communis* L.) case: from a wild shrub to a new fruit crop. *ISHS Acta Horticulturae* 948, 235-242.
- Perrone, V. (1990). *Latifoglie, guida al riconoscimento degli alberi*. (Roma: Collana Verde).
- Tretiakova, I., Blaesius, D., Maxia, L., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, Jr. K., Cinalt, J., Michaelis, M., Werz, O. (2008). Myrtucommulone from *Myrtus communis* L. induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis* 13, 119-131.
- Yesil Celiktas, O., Bedir, E., Vardar Sukan, F. (2007). *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry* 101, 1474-1481.