

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia vegetale

Ciclo XXVIII

STUDIO DEI MECCANISMI DI RISPOSTA ALLA SALINITA' IN
SPECIE ENDEMICHE LIGURI

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Marcello Tomaselli

Tutor:
Chiar.mo Prof. Ada Ricci

Tutor esterno:
Dott.ssa Barbara Ruffoni

Dottorando: Dott.ssa Debora Di Silvestro

Università degli studi di Parma



Scuola di dottorato di ricerca in biologia vegetale
Ciclo XXVIII

STUDIO DEI MECCANISMI DI RISPOSTA ALLA SALINITA' IN SPECIE ENDEMICHE
LIGURI



Candidata:
Dott.ssa Debora Di Silvestro

Relatore (Tutor):
Prof.ssa Ada Ricci

Tutor esterno:
Dott.ssa Barbara Ruffoni

Coordinatore di dottorato:
Prof. Marcello Tomaselli

Anno accademico 2015-2016

Indice

Capitolo 1 Introduzione:	4
1.1 Stress ambientale.....	5
1.2 Meccanismi di resistenza e risposta agli stress abiotici	6
1.3 Stress da salinità.....	7
1.4 Strategie di resistenza allo stress salino	9
1.5 Descrizione botanica e dell'habitat	12
1.5.1 La Liguria.....	12
1.5.2 <i>Limonium cordatum</i> (L.) Mill.	14
1.5.3 <i>Convolvulus sabatius</i> (1824 Viv.) subsp. <i>sabatius</i>	15
1.6 Concetto di conservazione	16
1.6.1 Conservazione <i>in situ</i>	17
1.6.2 Conservazione <i>ex situ</i>	19
Capitolo 2 Scopo del lavoro:	27
2. Obiettivi della ricerca e approccio sperimentale	28
Capitolo 3: Materiali e metodi	29
3.1 Esperimenti <i>in vitro</i>	30
3.2 Coltura <i>in vivo</i> di <i>Convolvulus sabatius</i>	34
3.3 Quantificazione della prolina	35
3.4 Analisi morfologiche all'ESEM in entrambe le specie cresciute sia <i>in vivo</i> sia <i>in vitro</i>	36
Capitolo 4: Risultati	38
4.1 Risultati esperimenti <i>in vitro</i>	39
4.2 Risultati esperimenti <i>in vivo</i> su <i>Convolvulus sabatius</i>	58
4.3 Risultati quantificazione della prolina.	61
4.4 Risultati analisi morfologiche all'ESEM in entrambe le specie cresciute sia <i>in vivo</i> sia <i>in vitro</i>	65
Capitolo 5: Conclusioni	73
5.1 Conclusioni <i>Limonium cordatum</i>	74
5.2 Conclusioni <i>Convolvulus sabatius</i>	74
Bibliografia	76

Capitolo 1:
Introduzione

1.1 Stress ambientale

Le piante sono frequentemente sottoposte a stress, cioè a condizioni esterne che influiscono sfavorevolmente sulla crescita, lo sviluppo o la produttività; tale concetto è strettamente collegato a quello di tolleranza allo stress, che è il modo per la pianta di adattarsi all'ambiente sfavorevole (Taiz L., Zeiger E., 2002) (Short Oxford English Dictionary, 1983)

Gli stress possono essere biotici, dovuti all'interazione con altri organismi, o abiotici, risultanti da un eccesso o da una carenza dei fattori che determinano le caratteristiche fisiche o chimiche dell'ambiente. Tra le condizioni ambientali che possono provocare danno vi sono l'allagamento, la siccità, le alte o le basse temperature, l'eccessiva salinità del suolo, uno squilibrio dei nutrienti minerali del terreno e un'eccessiva o scarsa intensità luminosa. La resistenza o la sensibilità allo stress dipende dalla specie, dal genotipo, e dallo stadio di sviluppo della pianta (Fig.1).

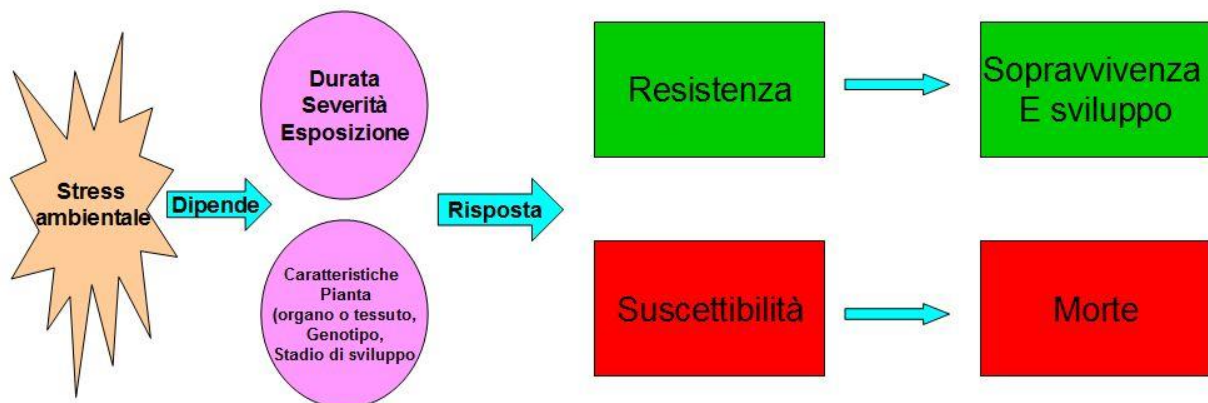


Figura 1 molti fattori determinano il modo in cui la pianta risponde agli stress ambientali: durata, intensità ed esposizione allo stress, e fattori propri della pianta stessa, come il genotipo, lo stadio di sviluppo e l'organo colpito dallo stress. Le piante rispondono allo stress attraverso svariati meccanismi, l'incapacità di far fronte ad uno o più stress, può determinare la morte dell'individuo.

Nelle piante gli stress inducono un'ampia gamma di risposte, a partire da modificazioni dell'espressione genica e del metabolismo cellulare fino ad arrivare a cambiamenti della velocità di crescita e delle rese dei raccolti (Wang et al. 2001). La durata, l'intensità e la velocità con cui uno stress colpisce una pianta sono tutti fattori che influenzano la risposta della pianta stessa. La combinazione di diverse condizioni sfavorevoli può provocare una risposta diversa da quella che si ha in seguito a un singolo tipo di stress. Le caratteristiche della pianta, comprese l'identità degli

organi e dei tessuti, lo stadio di sviluppo e il genotipo, influenzano anch'essi le risposte della pianta allo stress.

Gli studi relativi alla risposta a stress abiotici, come carenza idrica e/o salinità, sono molti e indicano l'esistenza di meccanismi di risposta spesso comuni e collegati tra loro. Viene osservata la stretta correlazione tra diversi agenti di stress abiotici e come essi spesso riconducano agli stessi meccanismi adattativi. In particolare, stress quali carenza idrica, elevata salinità, freddo o caldo eccessivo ed inquinamento sono fattori primari di stress, ma che si riconducono tutti a due tipologie di stress secondario: stress iperosmotico e stress ossidativo (Vinocur e Altman, 2005; Zhu 2001a; Serrano et al 1999). In generale l'adattamento delle piante a stress di natura ambientale è controllato da una cascata di segnali biochimici che attivano meccanismi di risposta agli stress tali da ripristinare i processi omeostatici, da proteggere e riparare le proteine e le membrane danneggiate (Wang et al., 2003).

1.2 Meccanismi di resistenza e risposta agli stress abiotici

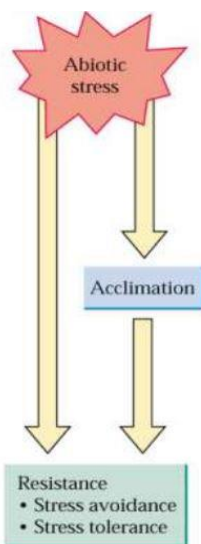


Figura 2 resistenza allo stress: meccanismi che permettono di evitare lo stress oppure di tollerare le condizioni che provocano lo stress.

I meccanismi di resistenza allo stress possono essere raggruppati in due categorie generali: meccanismi di allontanamento, che evitano l'esposizione allo stress, e meccanismi di tolleranza, che permettono alla pianta di sopportare lo stress (Fig.2).

Per esempio, un meccanismo per sfuggire alla siccità è rappresentato dallo sviluppo di radici profonde, che permettono un migliore accesso all'acqua del terreno, così le piante possono sopravvivere a lunghi periodi di assenza di pioggia. Un altro adattamento è la germinazione di alcune piante del deserto che avviene quando è disponibile una quantità di acqua sufficiente.

Gli stress ossidativi che frequentemente accompagnano alte temperature, alte concentrazioni saline, o siccità, possono causare la denaturazione di proteine funzionali o di struttura (Smirnoff 1998).

Come conseguenza questi diversi stress ambientali, spesso attivano vie di segnalazione tra cellule (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki

2000; Knight and Knight 2001; Zhu 2001b, 2002) e risposte cellulari molto simili, come la produzione di proteine da stress, la regolazione di antiossidanti e l'accumulo di soluti compatibili (Vierling and Kimpel 1992; Zhu et al. 1997; Cushman and Bohnert 2000).

Se l'ambiente sottopone costantemente l'individuo ad un tipo di stress specifico, che abbia sempre la stessa durata ed intensità, possono verificarsi due situazioni differenti: adattamenti costitutivi o

acclimatazione. I primi sono perfezionamenti evolutivi ereditabili, come alcune modificazioni morfologiche, quali stomi infossati e spine che riflettono la luce; sono tratti geneticamente determinati per la resistenza allo stress e sono espressi indipendentemente dal fatto che le piante siano sottoposte a stress oppure no. I secondi sono meccanismi di resistenza ottenuti attraverso l'acclimatazione, cioè una risposta di adattamento dei singoli individui ai cambiamenti ambientali. Durante tale fase, un organismo modifica la propria omeostasi, cioè il proprio equilibrio fisiologico, per adattarsi ai cambiamenti esterni, tratti che non sono ereditabili dalle generazioni future e che terminano di essere utilizzati al momento in cui lo stress viene meno.

1.3 Stress da salinità

Solitamente i livelli di salinità del suolo sono definiti dai valori di conducibilità elettrica (EC_e) dei sali disciolti (NaCl è quello maggiormente presente e quello più solubile) in condizioni di suolo saturo. Il suolo viene classificato salino quando il valore di EC_e risulta essere di $4dS\ m^{-1}$ o più elevato (USDA-ARS, 2008), valore che corrisponde ad una concentrazione di circa 40 mM NaCl (Munns and Tester 2008). L'alta salinità è un fattore ambientale critico che ha effetti sulla produttività delle piante attraverso una diminuzione della crescita della stessa, sul bilancio ionico e sulla relazione con l'acqua, coinvolgendo importanti processi metabolici (Hasegawa et al. 2000). Durante lo stress da salinità lo ione Na^+ entra nelle cellule e l'eccessivo accumulo induce uno stress ionico ed osmotico nella pianta (Zhang et al. 2009). Vengono inoltre modificati i lipidi e la composizione proteica della membrana cellulare e di conseguenza viene disturbato il normale accrescimento e sviluppo della pianta (Rodriguez-Milla and Salinas 2009). I meccanismi fisiologici, morfologici e molecolari attuati dalle piante in risposta allo stress salino sono molto simili e



Figura 3 esempi di pianta glicofita (A) grano *Triticum* L., 1753 e alofita (B) *Salicornia strobilacea* *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb., 1819.

ricorrenti. Le piante vengono distinte in due grandi gruppi in funzione della loro tolleranza alla salinità: alofite e glicofite (Fig. 3). Le alofite sono costituite da poche famiglie di cormofite con determinati caratteri morfologici e anatomici, che culminano in una fisionomia pronunciata

xeromorfica, a seconda della ricchezza del substrato in sali solubili (Warming, 1918). Al contrario, le glicofite sono un gruppo di piante che mostrano una resistenza bassa o nulla rispetto all'esposizione in terreni ricchi di sali. Le piante coltivate fanno tutte parte delle glicofite, quindi

risultano molto sensibili alla concentrazione salina presente nel suolo. Differenti valori soglia sono stati definiti per distinguere le alofite dalle glicofite. Aronson (1989) ha classificato le alofite come quelle piante capaci di sopravvivere a concentrazioni superiori a 80 mM NaCl (7.8dS m^{-1}), ma Flowers e Colmar (2008) considerarono questo valore soglia troppo basso e quindi lo settarono a 200 mM NaCl. In accordo con questo valore le alofite che sono in grado di tollerare questi livelli di NaCl nel suolo, non sono più del 0,25% delle angiosperme conosciute, e la lista delle 350 specie comprende le succulente e le rampicanti distribuite all'interno di diversi ordini (Flowers and Colmar 2008).

Come riportato da Zhu (2001), i meccanismi di tolleranza al sale nelle alofite, sono sostanzialmente identici a quelli esistenti nelle glicofite, ma sottili differenze nella loro regolazione causano grandi variazioni nella tolleranza o sensibilità. Le alofite, infatti, hanno un background evolutivo che ha permesso di creare degli adattamenti morfologici e fisiologici per sopravvivere a tali condizioni (Flowers et al. 1986). La sopravvivenza degli individui in ambienti ostili è permessa grazie ad una serie di reazioni metaboliche quali: accumulo e compartimentalizzazione aspecifica degli ioni, sintesi di soluti compatibili per il bilancio osmotico (osmoliti come prolina, mannitolo, ecc.), accumulo di elementi nutritivi essenziali come K^+ e Ca^{2+} in presenza di alte concentrazioni di Na^+ , limitazione dell'ingresso di ioni salini durante la traspirazione in presenza di alte concentrazioni di Na^+ e Cl^- , produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si formano durante alcune reazioni redox e durante la riduzione incompleta dell'ossigeno o l'ossidazione dell'acqua da parte delle catene di trasporto degli elettroni dei mitocondri o dei cloroplasti (es: perossido di idrogeno, anione superossido ecc) (Flowers et al. 2010).

Gli effetti che può causare un'eccessiva presenza di sale nel suolo sono suddivisi in primari e secondari: come primario si intende lo stress osmotico che limita l'assorbimento dell'acqua e secondario lo stress ionico che porta ad alti livelli di concentrazione degli ioni Na^+ e Cl^- (Zhu, 2001b). Lo stress osmotico comporta l'inibizione della crescita delle nuove foglie, mentre in concomitanza, lo stress ionico porta ad un maggiore tasso di senescenza delle foglie più vecchie, questo processo è stato dimostrato essere controllato da ormoni quali l'acido abscissico e le citochinine (Pérez-Alfocea et al. 2010). Anche la morfologia fogliare subisce un cambiamento durante lo stress osmotico, infatti, è stato visto da James et al. (2002) come l'area fogliare si riduca, contemporaneamente aumenti la lunghezza e lo spessore fogliare, indicando come le cellule cambino forma e dimensione. Lo stress ionico, al contrario dello stress osmotico, ha meno effetti sul tasso di crescita specialmente a bassa concentrazioni saline (Munnus and Tester 2008), comunque ad alti livelli di sale o in specie particolarmente sensibili, provoca più danni rispetto allo stress osmotico. Nel caso in cui lo stress fosse prolungato o molto intenso, si creerebbe un secondo stadio

di danneggiamento dell'individuo con la produzione di ROS, originati durante il metabolismo aerobico, e quindi l'individuo verrebbe sottoposto anche ad uno stress ossidativo. Per evitare l'accumulo di questi composti tossici, le piante posseggono degli antiossidanti utilizzati come sistemi di difesa, come l'acido ascorbico, i carotenoidi ed alcuni enzimi, come la perossidasi e la superossido desmutasi. Molti studi, infatti, dimostrano l'esistenza di una correlazione tra capacità antiossidante e tolleranza al sale, come riscontrata nelle alofite (Yildiztugay et al. 2011).

1.4 Strategie di resistenza allo stress salino

Le piante, per tollerare la presenza di sale, utilizzano diverse strategie tra di loro interconnesse (Zhu, 2001a; Munns and Tester 2008), anche se la resistenza dipende da individuo, specie, varietà e durata dello stress, si possono considerare due strategie importanti: elusione dello stress e/o tolleranza allo stress.

1. Elusione dello stress: necessita di meccanismi capaci di evitare un deficit idrico interno. Il flusso di Na^+ dall'ambiente esterno verso le cellule avviene per mezzo di movimento passivo lungo un gradiente elettrochimico e lo stress da sale può essere evitato con i seguenti meccanismi:

a) esclusione passiva: la resistenza dipende dalla capacità della pianta di mantenere la impermeabilità al sale esterno quando questo sia presente ad alti livelli. All'interno della cellula, in assenza di stress, il rapporto tra cationi monovalenti (K^+ , Na^+) e bivalenti (Ca^{2+}) è di circa 10:1, quando la concentrazione dei monovalenti aumenta il rapporto viene alterato, di conseguenza la loro permeabilità aumenta e si verifica il danno. Così, se una pianta attua questo meccanismo di resistenza deve avere una ridotta permeabilità ai sali sodici anche alle alte concentrazioni, accompagnata da un preferenziale assorbimento di Ca^{2+} . Nelle glicofite l'esclusione rappresenta la strategia dominante perché aumenta la modulazione della funzione delle cellule di guardia degli stomi;

b) estrusione attiva, escrezione, secrezione: il trasporto di Na^+ dall'ATPasi è stato postulato come meccanismo base per la resistenza al sale nelle glicofite e alofite. L'influsso di Na^+ (Na^+/H^+ contro scambio) dipende dal potenziale di membrana e l'efflusso è mediato dal rapporto Na^+/K^+ e Ca^{2+} risulta attivo nel favorire la pompa che estrude Na^+ . In molte alofite il meccanismo di estrusione è localizzato nelle "ghiandole saline", presenti in maggior numero a livello delle foglie adulte. Le cellule ghiandolari accumulano il sale all'interno dei propri vacuoli espellendolo sulla superficie fogliare da dove può successivamente essere allontanato dalla pioggia o dalla rugiada. Senza un controllo della quantità di sale che raggiunge le foglie la compartimentazione cellulare sarebbe una

soluzione assai limitata. La compartimentazione evita che il sale raggiunga tessuti o parti della cellula sensibili;

c) diluizione: la diluizione del succo cellulare dovuta all'assorbimento di acqua può prevenire l'aumento della concentrazione dei sali nei tessuti e la chiusura stomatica può contribuire all'effetto diluizione.

2. Tolleranza allo stress: richiede lo sviluppo di specifici adattamenti fisiologici ed è considerato un meccanismo più evoluto del precedente

- compartimentando i sali nel vacuolo, analogamente al sistema messo in atto per la tolleranza allo stress osmotico.
- sopportando l'alterazione del bilancio ionico: richiede che composti e organelli siano capaci di mantenere le normali proprietà anche nella situazione alterata.

Questi due sistemi di tolleranza dei danni, possono essere ancora suddivisi in tolleranza indiretta, che si verifica per mezzo di un rapido cambiamento del metabolismo della pianta (se il prodotto è tossico la tolleranza può essere dovuta alla capacità di metabolizzare le tossine), e tolleranza diretta, che coinvolge le proprietà delle biomembrane, in particolare di lipidi e proteine. La proprietà più caratteristica è la permeabilità cellulare. Il Ca^{2+} è molto importante nel mantenere l'integrità di membrana e nel regolare il trasporto ionico, in particolare per la selettività K^+/Na^+ . Sembra che il Na^+ rimuova il Ca^{2+} dai gruppi polari delle membrane le quali perdono la loro integrità favorendo l'efflusso del K^+ citosolico.

La parziale disidratazione è considerata il primo meccanismo messo in atto in risposta a un

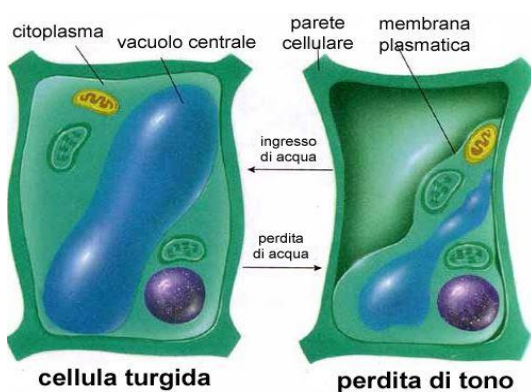


Figura 4 aggiustamento osmotico dovuto alla perdita di acqua, primo effetto dello stress salino.

improvviso aumento della salinità del mezzo. Questa risposta viene definita omeostasi ed è un aggiustamento del potenziale idrico (Fig. 4), che è l'energia potenziale dell'acqua per unità di volume, rispetto ad acqua pura in condizioni di riferimento. Quantifica la tendenza dell'acqua di spostarsi da una zona all'altra, verso la matrice con il potenziale osmotico più negativo. L'equazione del potenziale idrico afferma che il potenziale idrico totale (ψ_w) è dato dalla somma dei contributi del potenziale di

pressione (ψ_p), del potenziale di soluto (ψ_s), del potenziale gravitazionale (ψ_g) e del potenziale di matrice (ψ_m). Il **potenziale osmotico** o **potenziale di soluto** è generato dalla tensione osmotica, forza con cui un soluto lega l'acqua. L'acqua nel terreno non è mai allo stato puro, bensì è una soluzione in cui le molecole e gli ioni disciolti esercitano forze di attrazione elettrostatica sulle

molecole d'acqua riducendone l'attività. La tensione osmotica è sempre negativa. In condizioni standard, il potenziale idrico che si forma nel *continuum radice – foglia*, richiama l'acqua dal suolo all'interno delle radici, poi attraverso i tessuti conduttori si muove verso le foglie dove fuoriesce sotto forma gassosa. Lo stress osmotico indotto dal sale, agisce prontamente sulla pianta quando la concentrazione ionica all'esterno delle radici supera quella interna. Lo stress osmotico può determinare veloci modifiche: l'espansione dell'apice radicale, la crescita e l'espansione di nuove foglie di piccole dimensioni, l'apertura, l'aumento dell'area e la densità stomatica, inoltre può aumentare lo scambio gassoso a livello degli stomi e l'attività fotosintetica (Munns and Tester 2008). Questi fattori sono interconnessi in relazioni di causa-effetto difficili da districare. L'aumento della salinità nel terreno determina un abbassamento del potenziale idrico che richiamerà l'acqua fuori dalle radici verso l'ambiente ipertonico. La perdita di turgore che ne risulterà è provvisoria. Infatti, la pianta può ripristinare il turgore aumentando la produzione di soluti osmoprotettori nell'apoplasto (Fig. 5). Gli osmoprotettori sono composti implicati

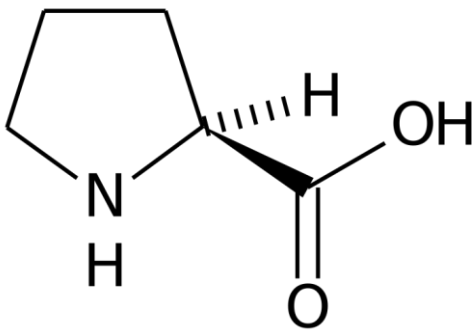


Figura 5 struttura della prolina: composto prodotto durante lo stress causato da elevata salinità.

nell'osmoregolazione durante gli stress salini (Chen et al. 2007). Questi soluti mitigano gli effetti del sale in molti modi. Quando gli ioni raggiungono alte concentrazioni, gli osmoprotettori possono controbilanciare lo sbilancio osmotico che viene a formarsi nello spazio intracellulare. Alla concentrazione ionica presente nell'apoplasto si aggiunge il sale escluso dall'interno della cellula. Questo accumulo negli spazi intercellulari, crea a sua volta un potenziale osmotico tra la parete e la membrana cellulare. I soluti compatibili, vengono così accumulati nel citoplasma in risposta

all'alta concentrazione apoplastica, per prevenire la disidratazione cellulare (Yancey 1994, Orcutt and Nilsen, 2000). Oltre alla loro funzione di aggiustamento osmotico, molti soluti compatibili, tra cui il mannitolo, il trialosio, la prolina e la glicinbetaina, hanno dimostrato avere una funzione di eliminazione delle ROS (Reactive Oxygen Species) (Shen et al. 1997). In alcune piante la prolina si accumula in presenza di suolo salino. Inan et al. (2004) per esempio hanno scoperto che la prolina si accumula in grandi quantità (150 moli/ grammo di peso secco) per riequilibrare il bilancio osmotico. Quindi è stata identificata come il principale soluto compatibile responsabile nell'osmoprotezione, mentre altri metaboliti si accumulano in quantità troppo inferiori per avere un impatto tanto significativo.

1.5 Descrizione botanica e dell'habitat

1.5.1 La Liguria

Il bacino del Mediterraneo è stato riconosciuto come uno dei 25 hotspots di biodiversità del mondo con le sue 25.000 specie vegetali di cui 13.000 endemiche, ma è anche una delle zone del pianeta in cui il peso dell'uomo si sente maggiormente e da più tempo. Questo comporta tutta una serie di problemi tra cui non ultima è la salvaguardia del territorio e del patrimonio in esso contenuto. Poiché non è possibile difendere l'intero bacino del Mediterraneo trasformandolo in una zona protetta, sono state individuate al suo interno alcune zone ad alta biodiversità, cioè aree nelle quali si concentra la maggiore quantità di specie, in particolare endemiche. La Liguria è stesa a formare un teatro appena accennato, con i monti disposti ad arco, circonda la costa arcuata del mar Ligure (il golfo di Genova), posto a sud. I due grandi sistemi di monti che la ricoprono costituiscono, nell'entroterra, la Riviera di Ponente e quella di Levante e si congiungono alle spalle di Genova, in coincidenza del punto più interno del golfo. Frédéric Médail e Pierre Quézel nel 1997 definirono 10 zone prioritarie per la salvaguardia del Mediterraneo e tra queste indicarono anche le Alpi



Figura 6 paesaggio tipicamente ligure, rappresentato dalle montagne alle spalle dei centri abitati che si affacciano sul mare, che crea un clima mite per piante, animali ed essere umano.

Marittime e Liguri. Le Alpi Marittime e Liguri hanno la particolarità di correre parallele alla costa per buona parte della loro lunghezza, e questo fa sì che da picchi di notevole altezza come l'Argentera (3297m), il Marguareis (2651m) e il Mongioie (2630m) si discenda rapidamente verso il mare (Fig 6). Questa conformazione crea particolari condizioni climatiche che hanno permesso l'instaurarsi, in un

territorio dalle dimensioni limitate, di un'ampia gamma di ambienti in cui le piante possono crescere. Infatti è grazie alla ripidità dei pendii che i venti provenienti da nord si scaldano scendendo verso il mare, conferendo ad alcune zone della riviera ligure un clima fra i più miti d'Italia, mentre le cime dei monti sovrastanti restano innevate per molti mesi all'anno. Un altro fattore ambientale che influenza la flora di questo hotspots è la composizione delle sue rocce, che vanno da calcaree a calcareo-silicee a silicee. Un ultimo elemento che deve essere considerato nella valutazione della ricchezza botanica di questo territorio è l'evoluzione del clima, infatti periodi climatici caldi alterni ad altri freddi hanno favorito l'affermazione di diversi tipi di flore che hanno

lasciato traccia in quella attuale; la mutazione climatica che più di tutte ha lasciato un segno è stata l'ultima glaciazione. La regione gode di un clima particolarmente favorevole: la temperatura dei mesi più freddi delle Riviere di Ponente e di Levante è comparabile a quella di alcune zone del sud Italia. Eccezionali sono le neviccate e, in genere, le giornate con temperatura inferiore allo zero; modesta è l'escursione termica e la piovosità si concentra in un numero limitato di giornate; quasi non esistono le nebbie. Di contro, le zone situate all'estremità settentrionale dell'arco costiero e in corrispondenza dei valichi verso la valle Padana hanno inverni meno miti. A causa della diversa esposizione alle perturbazioni provenienti dall'Atlantico, la piovosità è distribuita diversamente sulle due riviere e va da un minimo di circa 600 mm annui sulla Riviera di Ponente ad un massimo di circa 1.500 mm annui su quella di Levante. In tutta la regione le precipitazioni si concentrano in piogge di breve durata ma di forte intensità, con massimi in autunno e, seppur di minor entità, in primavera, e minimi nelle altre stagioni. Un discorso a parte si deve fare per le aree del versante padano, che godono di un clima quasi continentale: le temperature invernali sono ben inferiori a quelle del litorale, con escursioni termiche assai più accentuate. I venti dominanti nella regione, a parte quelli generati dalle configurazioni bariche a grande scala, sono rappresentati dalle brezze di mare sul litorale, generate dal differente riscaldamento diurno e notturno tra il suolo e il mare. Le Alpi Marittime e Liguri furono oggetto di studi da parte dei botanici già a partire dalla fine del '700. Carlo Allioni, Giovan Battista Balbis, Giuseppe De Notaris, Emile Burnat, Clarence Bicknell, Ottone Penzig, Pier Quezel, Paul Ozenda, Giuseppe Bono ed Enrico Maritini (Gallino e Pallavicini, 2000) furono i principali autori di ricerche botaniche nel territorio. Grazie agli studi condotti da questi botanici si è potuta valutare in maniera particolarmente accurata

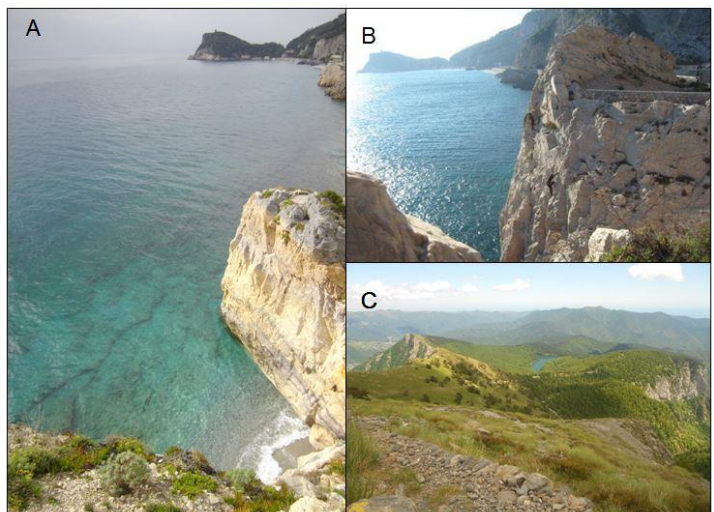


Figura 7 scorcio delle rocce calcaree di Capo Noli, con sullo sfondo l'isola di Bergeggi (A-B) e alpi Liguri nell'entroterra savonese (C).

la ricchezza di specie vegetali di quello che Pawlowski (1970) considera il solo centro d'endemismi delle Alpi Occidentali e il più importante delle Alpi. Quindi la protezione della biodiversità presente in Liguria ha lo scopo di salvaguardare i geni, le specie, gli habitat e gli ecosistemi caratteristici, come nella zona di Capo Noli (Fig. 7). Questo tratto di costa della riviera di ponente è racchiuso in un'insenatura delimitata ad est dall'isola di Bergeggi ed a sud-ovest dall'omonimo capo. All'interno di quest'area è presente un sito di interesse comunitario (SIC) proposto dalla rete Natura 2000 della Liguria, per il suo particolare interesse naturale, faunistico e

geologico al cui interno sono segnalate delle specie vegetali a rischio di estinzione come il *Limonium cordatum* (L.) Mill. e il *Convolvulus sabatius* (Viv.)

1.5.2 *Limonium cordatum* (L.) Mill.

Limonium Mill. (Plumbaginaceae) è un genere cosmopolita, che comprende più di 400 specie alofile. Il centro di differenziazione, con più di 250 specie, è il bacino del Mediterraneo, dove questo genere riveste un ruolo molto importante negli ecosistemi costieri, dagli acquitrini salati alle rupi marittime (Lledò et al. 2003). Il *L. cordatum* appartiene alla famiglia delle Plumbaginaceae ed è conosciuto anche come Limonio Ligure (Nicolini and Moreschi 1990). Nella delimitazione più completa il gruppo include 2 specie ad ampia distribuzione (*L. articulatum* (Loisel.) Kuntze e *L. contortirameum* (Mabille) Erben e numerose specie a distribuzione più ridotta (*L. caprariae* Rizzotto, *L. coralliforme* Alf.Mayer, *L. corsicum* Erben, *L. strictissimum* (Salzm.) Arrigoni, *L. ursanum* Erben), spesso puntiforme (*L. dolcheri* Pignatti, *L. florentinum* Arrigoni & Diana e *L. tarcoense* Arrigoni & Diana). Le differenze morfologiche tra i vari taxa sono ridotte ed hanno spesso portato a confusione sulla loro delimitazione tassonomica e geografica (Domina et al. 2014).



Figura 8 esempio di *Limonium cordatum* (L.) Mill. a Capo Noli, su una rupe calcarea molto esposta agli aerosol marini.

Le specie italiane hanno generalmente un fusto legnoso che termina con i rami portanti le foglie, nelle descrizioni solo questo viene chiamato fusto, mentre le ramificazione al di sopra delle foglie vengono chiamate pannocchie. Le foglie possono, nel loro complesso, formare una rosetta povera con 5-12 foglie, densa con 10-30 foglie, una rosetta a cuscinetto. L'infiorescenza fondamentale è la spighetta,

avvolta da almeno 3 brattee ben evidenti dall'esterno e contenente di calici. Il *L. cordatum* (Fig. 8) è una pianta perenne, alta 15-30 cm, pubescente, con fusti legnosi brevi, terminanti in una rosetta densa di foglie lineari-spatolate lunghe fino a 3 cm, da cui partono le ramificazioni, chiamate nel loro insieme pannocchia corimbosa. Le foglie appaiono tondeggianti, cordate all'apice, assottigliate gradatamente in basso, quasi in un picciolo, un po' convesse e con un solco longitudinale al di sopra, un nervo longitudinale al di sotto, con i margini rovesciati in giù, di colore verde cinerino e

un po' rugose. I fiori sono presenti soprattutto nei rami superiori riuniti in rudimentali spighe lunghe 1 cm al massimo, con circa 7 spighette circondate da 3 brattee pubescenti: una inferiore, piccolissima, ovata; quella a metà, più lunga, di circa 3,5 mm; ed infine l'ultima ottusa, membranacea, scura sul dorso. Il calice ha una lunghezza pari a 4,5 mm (Pignatti, 1981). Il *L. cordatum* ha una distribuzione molto limitata, infatti, è presente in Italia solo in Liguria, precisamente a Capo Noli (SV), fino alla frontiera con la Francia e sul promontorio di Portofino (GE) (Conti et al. 2005). A causa dell'areale limitatissimo e della presenza decisamente rara, questa specie prevede livelli di protezione della Regione Liguria, e delle autorità francesi, infatti è inserita nella lista rossa delle specie a rischio di estinzione regionali italiane e dal Dept. des Alpes Maritimes (F) (I.U.C.N., 1998) (Conti et al. 2005; Savona et al. 2009).

1.5.3 *Convolvulus sabatius* (1824 Viv.) subsp. *sabatius*

Il genere *Convolvulus* è cosmopolita, anche se è presente in gran parte nei climi temperati, comprende approssimativamente 200 specie. Più della metà di queste specie si ritrova nel bacino del Mediterraneo, nella Macaronesia e nell'Asia dell'ovest (Carine and Robba 2010). La moderna identificazione del genere è stata stabilita alla fine del 18° secolo basata su alcuni parametri quali gli stigmi filiformi, la presenza di fiori ascellari sottesi da ovario biloculare (Wood et al. 2015). Il genere convolvolo ha relativamente poca importanza a livello economico, anche se alcune specie sono segnalate per la loro importanza come alimento per gli animali da pascolo in zone desertiche ed aride, diverse specie sono coltivate per la bellezza dei loro fiori, (Wood et al. 2015). Nella classificazione del gruppo Convolvulaceae sono stati utilizzati due termini distinti per identificare specie simili:

1) Sottospecie: viene utilizzato per indicare due specie strettamente connesse, che sono separate geograficamente, ma che possono avere delle sovrapposizioni. Di solito sono separate da uno o due caratteri.

2) Varietà: si intende un insieme vegetale nell'ambito di un unico taxon botanico del più basso grado conosciuto, a condizione che la pianta differisca da tutte le altre e presenti le medesime caratteristiche rispetto agli altri esemplari della medesima specie.

Questa distinzione ha permesso di identificare il *Convolvulus sabatius* come sottospecie *sabatius* in quanto differisce per pochi caratteri dal *mauritanicus* infatti l'areale di distribuzione del primo

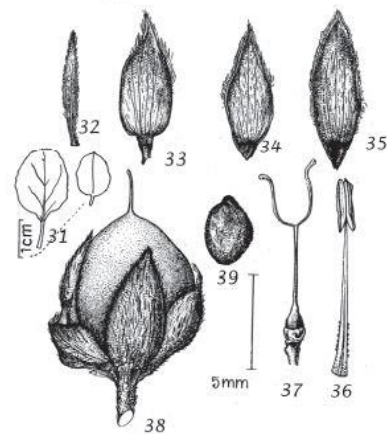


Figura 9 tavola per la caratterizzazione del *C. sabatius*. 31: foglie; 32: brattee; 33: sepalio esterno; 34: sepalio centrale; 35: sepalio interno; 36: stame; 37: ovario e stilo; 38: capsula; 39: seme (Wood et al. 2015).

risulta essere solo la Liguria, al contrario il secondo è distribuito nel nord Africa, Algeria e Marocco



Figura 10 *C. sabatius*: fiore e suo aspetto generale e una vista di Capo Noli, unico sito in Italia.

(Wood et al. 2015).

Il *C. sabatius* Viv. è conosciuto anche come Villucchio savonese o Villucchio della Riviera (Fig. 10), il nome generico deriva dal verbo latino “convolvere” ossia avvolgere con il riferimento al portamento rampicante di molte specie appartenenti al genere; il nome specifico invece fa riferimento alla zona in cui è presente in Liguria, quella di Capo Noli, nei pressi di Vado Ligure, che un tempo era chiamata *Vado Sabatia*. Si presenta sotto forma di

geofita rizomatosa, ossia una pianta che possiede un rizoma, che ogni anno emette radici e fusti avventizi. I fusti sono perenni, legnosi alla base, con corteccia bruno-marrone. Si sviluppa come un’erbacea strisciante o un po’ volubile sul terreno, lunga fino ad 70-80 cm, di colore verde chiaro, con fitti peli rivolti verso il basso. Le foglie hanno un picciolo di 6-10 mm e lamina ellittica, quelle inferiori spesso sono subspatolate. Raggiungono dimensioni di 11-16 mm di lunghezza per 22-27 mm di larghezza, di forma arrotondata. I fiori si presentano su peduncoli ascellari unilaterali di 2-4 cm, riuniti a fascetti di 2-5; le brattee sono lineari da 8-12 mm, il calice è di 6-7mm con corolla azzurra-violacea, gialla sul fondo di dimensioni pari a 13-15mm (Pignatti, 1981).

Proprio a causa della sua rarità il *Convolvulus sabatius* è inserito nelle liste rosse della direttiva “Habitat” europea 92/43 (Direttiva del Consiglio del 21 maggio 1992: Conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche detta Direttiva "Habitat", e la Direttiva Uccelli che diedero vita alla politica comunitaria in materia di conservazione della biodiversità e sono la base legale su cui si fonda Natura 2000) ed inserita da una legge regionale ligure (LR. n. 28/2009: Disposizioni in materia di tutela e valorizzazione della biodiversità) nell’elenco delle specie a tutela integrale.

1.6 Concetto di conservazione

Dalla consapevolezza che le realtà del mondo naturale e in particolare di quello vegetale stanno cambiando molto, negli ultimi decenni si è iniziato un lento percorso di maturazione del concetto di conservazione, che è passato ufficialmente attraverso numerosi incontri internazionali, i quali hanno tracciato il cammino verso una sensibilizzazione ambientale mondiale. A partire dalla prima convenzione sulla conservazione della flora e della fauna stipulata a Londra già nel lontano 1933, si è giunti negli anni '70 a maturare una coscienza del problema della conservazione della natura e del

movimento ecologista. Anni in cui sono state stipulate numerose convenzioni tra nazioni per la protezione e la salvaguardia di aree naturalistiche con importante impatto ambientale, quali per esempio, la convenzione sulle aree umide del 1971, la convenzione sul commercio internazionale di specie in pericolo della fauna e della flora spontanee (CITES: convenzione di Washington, 1975) che in Italia entrerà in vigore solo negli anni '90. Questa serie di normative, che continuano ad essere emanate ancora oggi, e recepite dagli stati membri dell'unione europea, ha comportato la protezione di numerosi territori, che risultano però essere molto differenti tra loro, con necessità ben distinte, poiché presentano habitat naturali differenti, popolati da flora e fauna altrettanto varia. La forte antropizzazione del vecchio continente pone in pericolo la biodiversità e per questo motivo l'UE ha predisposto tramite la Direttiva Habitat, nuovi strumenti per la salvaguardia dell'ambiente. L'UE indica, sempre in questa direttiva, anche come mantenere o ripristinare alcuni habitat e specie che si trovano in stato di conservazione insoddisfacente, avendo cura inoltre di tenere conto “ delle varie esigenze economiche sociali e culturali, nonché delle particolarità regionali e locali”.

La protezione della biodiversità ha lo scopo di salvaguardare geni, specie, habitat ed ecosistemi. Ciò implica un meccanismo a catena dove per conservare i geni bisogna conservare tutte le popolazioni di una specie, la quale per essere mantenuta deve vivere in un habitat protetto, che si ottiene dalla salvaguardia dell'ecosistema a cui appartiene. Preservare dalla degradazione habitat ed ecosistemi è quindi uno degli aspetti fondamentali di questa strategia e prende il nome di conservazione *in situ*, cioè nell'ambiente naturale. Un'altra componente dello stesso processo è quella di conservare in un ambiente artificiale le specie più a rischio, in modo da poterle successivamente reintrodurre nel loro habitat, questo tipo di conservazione viene definita *ex situ*.

1.6.1 Conservazione *in situ*

Per una buona conservazione *in situ* è necessario adottare delle misure atte a salvaguardare la rete di relazioni che caratterizzano l'ambiente da proteggere. Il presupposto base per la gestione dell'ecosistema sta nel riconoscere che esso non può non cambiare, ma è un'entità viva formata da esseri viventi che interagiscono fra di loro. I piani di gestione per essere funzionali alla protezione devono tener conto di questo presupposto. I cambiamenti gradualmente di un ecosistema sono quelli che gli ecologi chiamano “successioni”. Le interrelazioni fra le varie specie e l'ambiente che le circonda cambiano in continuazione: ad esempio le giovani foreste che forniscono l'habitat idonei per determinate specie di uccelli, quando crescono sono più adatte ad altre specie, e quindi la fauna ornitologica cambia (Bowes, 1999). Eventi naturali come le piogge torrenziali, le tempeste, le siccità, gli incendi e altri fenomeni simili, possono provocare dei cambiamenti in un ecosistema, ma secondo molti ecologi queste influenze rientrano nei normali processi che caratterizzano un

ecosistema. Fra gli agenti esterni che inducono cambiamenti in un ecosistema rientrano anche le attività antropiche, poiché da sempre l'uomo modifica gli ambienti per utilizzarli secondo il suo interesse, la gestione ambientale prevede la possibilità di mitigare questo cambiamento o addirittura indirizzarlo in modo vantaggioso per l'ambiente. Uno dei problemi principali che si trova ad affrontare la gestione ambientale è la scelta tra l'intervento e il mantenimento. In questi casi, normalmente si ricorre al principio di precauzione, ossia è meglio evitare azioni potenzialmente negative che potrebbero creare danni di cui non siamo a conoscenza (Dichiarazione di Rio, 1992, principio n°15: *“al fine di proteggere l'ambiente, un approccio cautelativo dovrebbe essere ampiamente utilizzato dagli Stati in funzione delle proprie capacità. In caso di rischio di danno grave o irreversibile, l'assenza di una piena certezza scientifica non deve costituire un motivo per differire l'adozione di misure adeguate ed effettive, anche in rapporto ai costi, dirette a prevenire il degrado ambientale”*). Per mettere in atto ciò che è stato stabilito nelle varie convenzioni stipulate durante gli anni, l'Unione Europea, con la Direttiva 92/43/CEE "Habitat", ha dato vita ad una rete europea chiamata “Natura 2000”. Si tratta di una rete ecologica diffusa su tutto il territorio dell'Unione, atta a garantire il mantenimento a lungo termine degli habitat naturali e delle specie di flora e fauna minacciati o rari a livello comunitario. La rete Natura 2000 è costituita dai Siti di

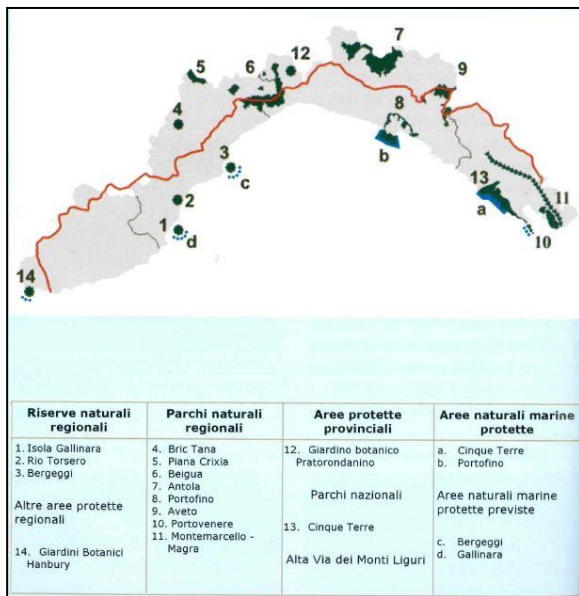


Figura 11 elenco dei parchi e delle aree protette nella Regione Liguria, istituite grazie al progetto “Natura 2000”

Interesse Comunitario (SIC), identificati dagli Stati Membri secondo quanto stabilito dalla Direttiva Habitat, che vengono successivamente designati quali Zone Speciali di Conservazione (ZSC), e comprende anche le Zone di Protezione Speciale (ZPS) istituite ai sensi della Direttiva 2009/147/CE "Uccelli" concernente la conservazione degli uccelli selvatici. Un altro elemento innovativo è il riconoscimento dell'importanza di alcuni elementi del paesaggio che svolgono un ruolo di connessione per la flora e la fauna selvatiche (art. 10). Gli Stati membri sono invitati a mantenere o all'occorrenza sviluppare tali elementi per migliorare la coerenza ecologica della rete Natura 2000. In Italia, i SIC, le

ZSC e le ZPS coprono complessivamente circa il 19% del territorio terrestre nazionale e quasi il 4% di quello marino (Fig.11).

Nell'attuazione di una concreta conservazione *in situ* di habitat e specie in pericolo la Regione Liguria si è mossa da alcuni anni con numerosi procedimenti legislativi e amministrativi. Nel 1984

a riconoscimento della sua flora la Regione Liguria ha elaborato una legge sulla protezione delle piante rare e in pericolo (L.R. 9/84) che ne proibisce o limita la raccolta in natura. Sono stati istituiti numerosi parchi regionali e aree protette per una superficie complessiva di 60.000 ettari, fino ad arrivare alla costituzione della Rete Natura 2000, che ha identificato per la regione Liguria 14 siti della regione biografica alpina e 11 siti della regione biografica continentale. La rete ligure copre circa 138.000 ettari con i SIC terrestri e 20.000 ettari con le ZPS, che tuttavia sono in gran parte sovrapposte ai primi per un totale di circa 140.000 ettari di rete terrestre. A questi vanno inoltre aggiunti i circa 7.000 ettari dei 26 siti marini, per un totale di 147.000 ettari, corrispondenti al 26,8% del territorio ligure (Minuto and Casazza 2006).

1.6.2 Conservazione *ex situ*

L'espressione "conservazione *ex situ*" indica la conservazione delle risorse genetiche fuori dal loro ambiente naturale. L'articolo 9 della CBD (Convenzione sulla Diversità Biologica, 1993), trattando la conservazione *ex situ*, sottolinea l'importanza di integrare la conservazione *in situ* con attività *ex situ* e invita gli stati firmatari ad adottare provvedimenti per la conservazione *ex situ* dei componenti della diversità biologica, di preferenza nel loro paese di origine. Per fare ciò è necessario installare e mantenere strutture per la ricerca e la conservazione *ex situ* di piante, animali e microrganismi; è importante inoltre adottare misure per assicurare la ricostituzione ed il risanamento delle specie minacciate ed il loro re-insediamento negli habitat naturali. L'obiettivo primario della conservazione *ex situ* delle popolazioni è quello di coadiuvare il mantenimento di taxa minacciati, della diversità genetica e del loro habitat. I programmi di conservazione *ex situ* sono complementari e forniscono un valore aggiunto a quelli *in situ*. Le decisioni sull'opportunità di iniziare programmi di conservazione *ex situ* si possono basare su criteri della Lista Rossa della IUCN. E' quindi consigliabile intraprendere iniziative di conservazione quando siano presenti taxa o popolazioni sottoposti agli effetti delle attività antropiche e quando vi siano dei taxa o popolazioni estinti in natura o a rischio di estinzione in tempi molto brevi. Tale conservazione è presa in considerazione anche per piante di particolare interesse culturale, economico e scientifico, per rafforzare le popolazioni naturali. Tutto il materiale conservato *ex situ* dovrebbe essere gestito in modo da minimizzare i rischi in caso di catastrofi naturali, problemi tecnici, danni biologici o sconvolgimenti politici. Le procedure di salvaguardia quindi prevedono continui monitoraggi del materiale e in particolare la conservazione di duplicati del germoplasma in differenti località. Per le popolazioni *ex situ* conservate *in vivo* si deve anche cercare di ridurre il rischio di invasività; le specie quindi dovrebbero essere valutate anche in base alla loro potenziale invasività e, dove sia necessario, dovrebbero essere condotti periodici controlli per evitare la naturalizzazione di specie esotiche.

La gestione delle popolazioni *ex situ* deve essere volta a minimizzare tutti gli effetti intrinseci a questa metodica che minano l'integrità genetica e la vitalità di materiale, quali la riduzione della diversità genetica, la selezione artificiale, la trasmissione di agenti patogeni e l'ibridazione.

Va posta attenzione particolare alle tecniche di raccolta che devono essere pensate per raccogliere la maggior variabilità genetica possibile delle popolazioni in natura. Le pratiche *ex situ* dovrebbero essere coerenti con le linee guida di gestione prodotte dalle agenzie che si occupano di gestione *ex situ* della diversità. La conservazione della diversità *ex situ* avviene nelle banche dei geni che possono essere divise in quattro categorie principali:

- Collezioni *in vivo*;
- Banche dei semi;
- Banche di crioconservazione (DNA, polline);
- Banche *in vitro*.

Tutte queste attività di conservazione della biodiversità vegetale, sono frequentemente proposte come componenti integranti di programmi di conservazione per la salvaguardia sia di piante selvatiche (Falk, 1990) che di piante coltivate (Choen et al. 1991).

1) Collezioni *in vivo*:

per collezioni *in vivo* si intende piante raccolte in natura e mantenute in ambienti controllati, quali giardini botanici, serre, arboreti, giardini alpini, vivai ecc. La salvaguardia delle specie selvatiche è operata principalmente dai giardini botanici che, a partire dall'epoca coloniale, hanno raccolto numerose piante spontanee nelle diverse parti del mondo, in un primo tempo per fini collezionistici e solo successivamente per fini conservativi. Le collezioni *in vivo* rivestono ancora un ruolo importante nella protezione delle specie o cultivar di interesse economico. Esistono circa 2.500 giardini botanici in più di 150 paesi distribuiti in tutto il mondo, anche se più del 45% di questi è concentrato nell'Unione Europea e in Nord America. Tutti aderiscono all'associazione Botanic Gardens Conservation International (BGCI). Le collezioni dei giardini botanici sono una sintesi della diversità vegetale del mondo ma sono particolarmente ricche di determinati gruppi quali orchidee, cactus e altre succulente, palme, bulbose, conifere, alberi e arbusti di zone temperate e specie selvatiche minacciate. Inoltre sono ben rappresentate le cultivar di importanza economica e i loro progenitori selvatici, gli alberi da frutta e le piante medicinali. I livelli di variabilità genetica all'interno dei giardini botanici sono generalmente molto bassi poiché la maggior parte delle specie sono rappresentate da un limitato numero di individui. Un buon numero di specie sono scampate alla completa estinzione solo perché conservate in giardini botanici (Bowes, 1999). I giardini botanici europei conservano la più grande e diversificata collezione di piante *ex situ*, tra cui numerose specie europee in pericolo. 532 delle 1755 specie minacciate europee sono registrate dalla

BGCI come coltivate nei giardini botanici d'Europa. Le specie conservate nelle collezioni *ex situ* non sono omogenee nè a livello tassonomico nè a livello geografico, ma alcune famiglie sono meglio rappresentate di altre. Famiglie europee minacciate e poco rappresentate sono le *Graminaceae* con sole 3 delle 63 specie presenti nelle liste rosse, al contrario altre famiglie come le *Amaryllidaceae* sono rappresentate con il 100% delle specie conosciute. Circa il 40% dei taxa europei minacciati e conservati nei giardini botanici sono rappresentati in una sola collezione, e la maggior parte delle accessioni è costituita da un numero ridotto di individui, esposti spesso a ibridazioni, selezioni artificiali e deriva genetica (Maunder et al. 2001). Nell'Unione Europea vi sono quasi 700 giardini botanici, che sono visitati da più di 50 milioni di persone all'anno e sono la principale via di accesso a informazioni sulla



Figura 12 alcune immagini dei Giardini Hanbury di Ventimiglia

diversità e l'importanza dei vegetali nel mondo (Bowes, 1999). In Italia l'interesse per gli orti botanici risale al 16° secolo, con la fondazione del primo orto botanico universitario a Pisa negli anni 1543-1544; un anno dopo viene istituito l'orto botanico di Padova (Minelli, 1995). Genova e la Liguria sono state terre di marinai ma anche di botanici illustri. Nell'Ottocento la capacità dei ricercatori e dei collezionisti era tale che in tutta l'Europa si guardava alla Liguria come a un paradiso verde, adatto all'acclimatazione di molte piante tropicali. Giardinieri di prestigio e soluzioni tecniche avanzate in serra permisero di creare collezioni eccezionali. Proprio in questi anni ebbero vita alcuni tra i più importanti giardini botanici ancora oggi conosciuti come, per esempio, i giardini botanici Hanbury (Fig. 12), situati sul promontorio di Capo Mortola, al confine con la Francia.

2) *Banche dei semi:*

il metodo principale per conservazione *ex situ* è la banca dei semi, poiché con essa è possibile conservare adeguatamente sia la diversità intra-popolazione sia la diversità inter-popolazione. I semi rappresentano la struttura più facile da conservare dell'intero organismo vegetale perché è possibile accumulare un grosso quantitativo di materiale in uno spazio ridotto. Questa modalità di conservazione viene sfruttata per la sua praticità ed economicità, in quanto comporta meno lavoro rispetto alla conservazione di piante *in vivo* ed è meno suscettibile a disastri naturali, inoltre può offrire all'occorrenza materiale di partenza per altri tipi di conservazione. In alcuni casi la conservazione del seme può essere la sola opzione disponibile quando gli ultimi esemplari sopravvissuti di una specie dovessero essere in via di estinzione. Le tecniche utilizzate permettono

la conservazione dei semi anche per tempi molto lunghi, grazie ai numerosi studi condotti sulla conservazione e sulla germinazione (Bowes, 1999). Non è un caso che i Kew Gardens di Londra abbiano incrementato le loro attività di conservazione di semi sviluppando e sostenendo il progetto Millennium Seed Bank Project (MSBP). Tale progetto aveva come scopo quello di conservare entro il 2010 i semi di 24.000 specie. Nelle banche dei semi presenti in Europa, sono ormai presenti specie estinte durante questi anni e, quindi, appare subito chiaro il valore che rappresentano queste istituzioni per la salvaguardia della biodiversità. In Italia è nata una rete nazionale di banche del germoplasma, nel dicembre 2005, chiamata RIBeS (Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione *ex situ* della flora spontanea). All'interno di questa rete sono nate diverse banche situate in tutta Italia, alcuni esempi sono la banca di Trento (Bedini et al. 2005), che si occupa di progetti per la salvaguardia di specie a rischio di estinzione e specie utili per interventi di rinaturalizzazione, la Lombardy Seed Bank (LSB), struttura realizzata nello stesso anno all'interno del Centro per la tutela della Flora Autoctona (CFA) della Regione Lombardia, situata presso l'Università di Pavia. Un anno dopo è stata fondata la banca del germoplasma dei Giardini Botanici Hanbury (IM), sempre all'interno della rete RIBeS, gestita dall'Università di Genova.

3) Banche di crioconservazione:

Il termine crioconservazione, o conservazione criogenica, si riferisce allo stoccaggio a temperatura ultra-bassa (-196 °C temperatura dell'azoto liquido o -150 °C temperatura dell'azoto in fase di vapore), di cellule, tessuti e organi vegetali provenienti da colture *in vitro*, o di semi, assi embrionali e gemme dormienti provenienti da colture *in vivo* (Lambardi and De Carlo 2009).

L' applicazione della criogenia e della conservazione del materiale vegetale, proposta all'inizio degli anni '60 (Sakai, 1960), è ormai una realtà sperimentale e la temperatura ultra bassa (-196°C) ottenuta in azoto liquido, permette lo stoccaggio di semi, propaguli, organi, tessuti e linee cellulari. Nel processo di crioconservazione risulta essere molto importante il tipo e la dimensione dell'espianto, il contenuto di acqua negli stessi e i pretrattamenti prima dell'immersione in azoto liquido, il tipo e la concentrazione dei crioprotettori utilizzati, il metodo di crioconservazione utilizzato, il processo di raffreddamento e di scongelamento ed, infine, le condizioni in cui gli espienti vengono posti per la ricrescita (Reed, 2001; González-Benito et al. 2004; Bekheet et al. 2007). A -196°C le cellule vegetali entrano in uno stato di quiescenza assoluta, in quanto tutte le reazioni fisiche e biochimiche sono arrestate e in questa particolare condizione i tempi di conservazione divengono praticamente illimitati (Engelmann, 1997). La criobiologia degli organismi fotosintetici e le questioni operative, i rischi e le precauzioni da adottarsi nella pratica della ricerca sono stati completamente rivisti da Benson (2008). Per applicare le tecniche di crioconservazione è, perciò, necessario, diminuire il contenuto di acqua intracellulare, in modo che

la soluzione citoplasmatica si concentri diventando più viscosa. Tale soluzione, una volta esposta a temperature ultra-basse, non sarà più sottoposta a congelamento, bensì a vitrificazione. Per vitrificazione si intende la solidificazione di un liquido in uno stato amorfo e vetroso, senza che si verifichi la formazione di cristalli ghiaccio come nel caso del congelamento. Questo stato fisico si innesca quando una soluzione acquosa è talmente concentrata o raffreddata così rapidamente da aumentarne la viscosità e impedirne il riarrangiamento molecolare in forma cristallina (Lambardi and De Carlo 2009). Al fine di favorire lo stato di vitrificazione è possibile effettuare una criodisidratazione (*freeze 25 dehydration*), una osmodisidratazione (*osmotic dehydration*) e/o una evaporazione. Sono diversi gli studi che dimostrano che le sostanze crioprotettive aumentano la stabilità della membrana plasmatica sia con una interazione diretta con la stessa che con la modifica della distribuzione dell'acqua internamente ed esternamente la cellula (Uemura et al. 2009). Le sostanze crioprotettive più utilizzate sono distinte in base alla capacità di penetrare o meno all'interno della cellula; è possibile, quindi, distinguere dei crioprotettori in grado di attraversare le membrane cellulari (glicerolo e dimetilsolfossido - DMSO) e dei crioprotettori non in grado di attraversare le membrane cellulari (polivinilpirrolidone - PVP, glicole polietilenico - PEG, saccarosio). Infine, la tecnica di incapsulazione-disidratazione prevede anche una disidratazione di tipo fisico per mezzo di un flusso di aria sterile proveniente dalla cappa a flusso laminare o per mezzo di esposizione a gel di silice. La tecnica criogenica viene generalmente considerata più costosa dello stoccaggio convenzionale nelle Seed Bank. Nei fatti, lo stoccaggio in azoto liquido non è più costoso del mantenimento di cellule vegetali, tessuti, embrioni somatici e zigotici isolati *in vitro* e la crioconservazione rappresenta a questo riguardo una valida alternativa (Reed, 2008). Una efficace strategia di conservazione *ex situ* dovrebbe utilizzare tutta la gamma completa di strumenti a disposizione (Li and Pritchard 2009)



Figura 13 esempio di alcune colture *in vitro* e camera di crescita con parametri controllati.

4) *Banche in vitro*: la propagazione *in vitro*, o micropropagazione, può essere definita come un rapido clonaggio di piante in sterilità, mantenute su terreni di crescita gelificati, a composizione definita e con condizioni di luce e temperature controllate (Fig.13). La comparsa della coltura *in vitro* si può far risalire al 1902, quando Gottlieb Haberlandt, fisiologo tedesco, tentò di coltivare delle singole cellule a palizzata, isolate da foglie, in una soluzione con aggiunta di sali e zucchero. Nel suo articolo pubblicato molti anni dopo (1962), si riporta di come sia riuscito a

mantenere vitali tali cellule, senza ottenere però proliferazione cellulare (Hanerlandt, 1962). Nel 1922 Kolte è riuscito a trasferire *in vitro*, per la prima volta, meristemi apicali di radici, mantenendoli in vita senza l'aggiunta di ormoni regolatori della crescita (aggiunti per la prima volta negli anni '50). Un passo molto importante per il miglioramento della cultura *in vitro*, si ottenne con il chiarimento del funzionamento degli ormoni vegetali (auxine, citochinine) sostanze in grado di regolare la crescita e lo sviluppo, descritto da Skoog e Miller (Skoog and Miller 1975). Dopo questa scoperta si susseguirono numerosi esperimenti che contribuirono allo sviluppo della micropropagazione e alla sua applicazione. Ad oggi, in relazione al materiale vegetale che si utilizza, abbiamo a disposizione un gran numero di tipi diversi di colture *in vitro*, si possono utilizzare piante intere, embrioni, organi, callo e singole cellule, protoplasti. La coltura *in vitro* viene impiegata ai fini conservativi delle piante minacciate e per le quali sono difficili le operazioni di moltiplicazione *in vivo*. L'utilizzo di tale tecnica presenta una serie di vantaggi ed alcuni svantaggi: permette la produzione di un grande numero di individui in poco tempo e in un spazio limitato; si ottiene materiale libero da infezioni; conservando al freddo il materiale, se ne rallenta l'accrescimento, aumentando il tempo di conservazione. Gli svantaggi di questo approccio conservazionistico sono legati sia ad una questione economica che ad una pratica. La messa a punto di un laboratorio idoneo e di una camera di crescita adeguata comportano l'utilizzo di strumentazioni costose e la presenza di personale adeguatamente formato. Dal punto di vista pratico non è semplice né immediato ottenere un protocollo di coltura pienamente funzionale. Inoltre, a causa dell'elevata carica microbica che può provocare l'insorgere di contaminazioni nella prima fase di coltura, è necessario avere a disposizione molto materiale di partenza, che spesso, per specie minacciate, non è facile ottenere. Altro aspetto pratico negativo da tenere in considerazione è la possibilità che si verifichino fenomeni di variazione genetica o mutazioni, frequenti nella coltura *in vitro*. Infine l'ambientamento degli individui ottenuti spesso è reso complicato in quanto si possono verificare delle modificazioni fisiologiche, quali cuticole poco sviluppate, foglie deboli, stomi con ridotta funzionalità e radici mal collegate con il fusto e tra loro (Preece and Setter 1991), che non rendono semplice la sopravvivenza della pianta in ambiente; per questa ragione è consigliata una fase di acclimatazione ancora in ambiente controllato.

La coltura *in vitro* consta di 4 fasi (Fig.14):

a) sterilizzazione: riguarda la superficie esterna degli espianti ed è necessaria al fine di eliminare le contaminazioni microbiche che possono pregiudicare la sopravvivenza, la crescita e la proliferazione *in vitro* dei germogli. Strettamente legata a questa fase è la scelta del materiale di partenza, la stagione di prelievo e la consistenza degli espianti, dai quali dipende la scelta dell'agente disinfettante e la durata della sterilizzazione.

b) fase di micropropagazione: consiste nel trasferimento dei germogli ottenuti dagli espianti sterili, su terreni cosiddetti di moltiplicazione, caratterizzati da livelli di citochinine più elevati. Il trasferimento dei germogli va effettuato mediamente ogni 3-4 settimane a seconda della specie. Alcune specie possono essere mantenute in collezione in questa fase, con subcolture regolari, per una durata di 8-48 mesi

c) radicazione: consiste nel preparare i germogli, ottenuti nel corso della fase precedente, al trasferimento nel suolo. La radicazione *in vitro* può essere preceduta da un periodo di 15-20 giorni, detto periodo di allungamento, utile per ottenere germogli ben sviluppati. Il terreno utilizzato durante questa fase, a tal fine è, generalmente, lo stesso usato per la fase di moltiplicazione, ma con una concentrazione ridotta di citochinine, ed una concentrazione più elevata di acido giberellico, in modo da inibire l'attività delle gemme ascellari e di favorire l'allungamento dei germogli, si induce la pianta ad emettere radici, possibilmente funzionali, per poter acclimatare gli individui ottenuti dalle fasi precedenti;

d) acclimatazione: quest'ultimo passaggio, insieme al primo, è considerato molto delicato ed il fine della coltura *in vitro*. Durante questo periodo si tenta di far ambientare le piantine alla condizione naturale di autotrofia, capacità del tutto ridotta durante la coltura *in vitro*, in quanto alle piante viene somministrata una fonte di carbonio, spesso saccarosio, che porta la pianta ad una condizione di eterotrofia. Inoltre, durante questa fase, è necessario tenere comunque controllata l'umidità, per dare tempo all'individuo di riprendere la funzionalità stomatica, quasi del tutto persa nelle fasi

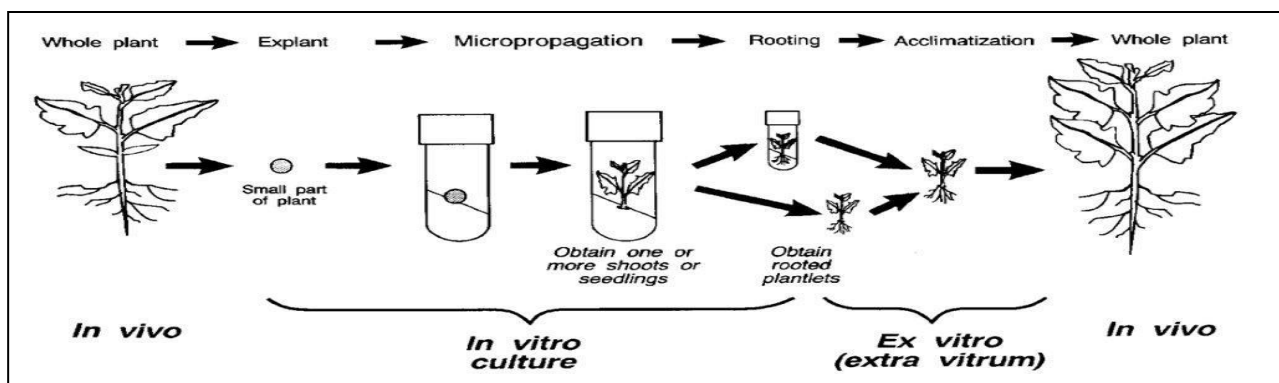


Figura 14 schema delle 5 fasi che compongono la coltura in vitro: dalla pianta madre all'ottenimento di cloni ambientati ed acclimatati (George, 1996)

precedenti, poiché gli stomi tendono a rimanere sempre aperti, grazie all'umidità sempre elevata nei diversi contenitori utilizzati.

Un'altra tecnica, che affianca la tradizionale coltura *in vitro*, viene definita T.I.S., Temporary Immersion System (Etienne and Berthouly 2002). Questa metodologia prevede un'immersione temporanea degli espianti in terreno liquido ad intervalli regolari. Il contatto tra espiante e terreno si ottiene grazie all'utilizzo di una pompa che dall'esterno immette aria sterile nel bioreattore facendo

gorgogliare il terreno che entra così in contatto fisico con gli espianti (Fig. 15). I bioreattori a tutt'oggi maggiormente utilizzati sono i Rita[®] (Alvard, 1993, Fig. 15) e i Plantform[™] (Welander et al. 2014, Fig. 16).

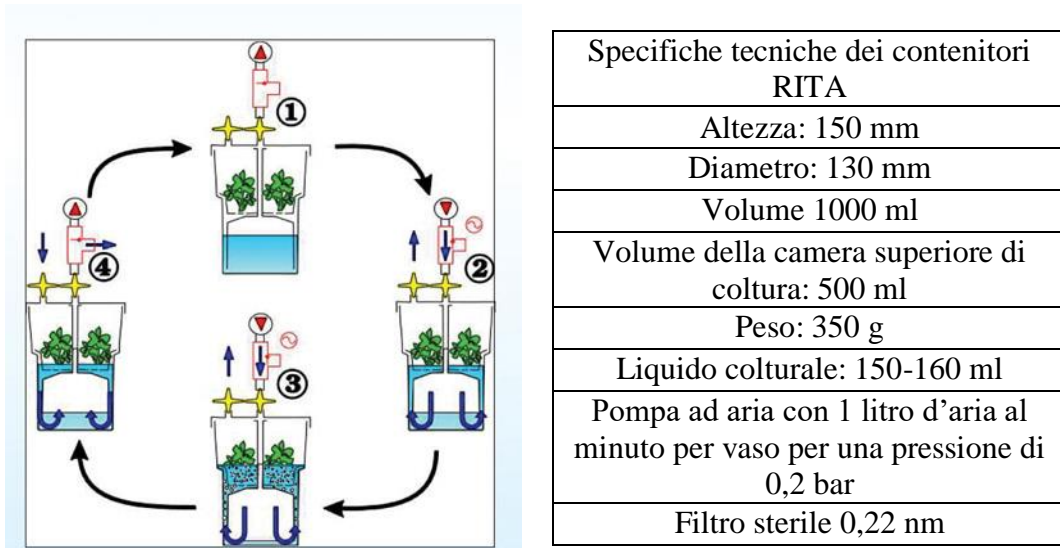


Figura 15: esempio di un bioreattore, RITA[®], nella coltura ad immersione temporanea con le sue specifiche tecniche.



Figura 16 Plantform[™]

Capitolo 2:
Scopo del lavoro

2. Obiettivi della ricerca e approccio sperimentale

Gli obiettivi della presente ricerca sono stati l'identificazione di un protocollo per la conservazione *ex situ* e lo studio delle risposte fisiologiche allo stress salino di due specie endemiche della regione Liguria, di particolare interesse poiché protette e a rischio d'estinzione.

Sia il *Limonium cordatum* che il *Convolvulus sabatius* vivono in condizioni naturali particolari, infatti, sono costantemente esposte agli aerosol marini, che presentano elevate concentrazioni di NaCl, per tali ragioni si è cercato di comprendere quali fossero i meccanismi di risposta delle due specie allo stress salino; da ultimo, se presentassero risposte simili, visto l'habitat comune che condividono.

Per capire in modo più approfondito le risposte fisiologiche delle due piante, è stato anche preso in considerazione l'habitat naturale per cogliere eventuali differenze nella zona di crescita, per esempio maggiore e/o minore esposizione agli spruzzi marini di una piuttosto che dell'altra. Per il raggiungimento di tali obiettivi si è proceduto con:

- L'utilizzo della coltura *in vitro* per comprendere i meccanismi responsabili della tolleranza e/o dell'adattamento allo stress salino, che ha permesso di confrontare le due specie in un ambiente controllato con la sola variabile della concentrazione salina. Per valutare tali risposte si sono effettuate delle indagini morfologiche, istologiche e fisiologiche;
- L'identificazione delle condizioni ambientali migliori per la possibile reintroduzione, sia con l'uso della coltura *in vitro*, che ha permesso di stabilire il valore soglia di tolleranza della concentrazione di NaCl di entrambe le specie, che con sopralluoghi *in loco*, per individuare eventuali situazioni differenti tra le due specie, che giustificassero risposte diverse tra di esse.

Nel caso del *Convolvulus sabatius*, essendo il suo areale di crescita più limitato e, volendo quindi approfondire le condizioni ambientali naturali di crescita, si è provveduto a simulare l'habitat autoctono con prove *in vivo*.

Capitolo 3:
Materiali e metodi

Di seguito vengono riportate le quattro modalità di ricerca affrontate durante gli anni di studio, che comprendono diversi esperimenti effettuati sulle specie analizzate:

1. Coltura *in vitro* per entrambe le specie;
2. Coltura *in vivo* di *Convolvulus sabatius*;
3. Quantificazione del contenuto della prolina in entrambe le specie a concentrazione saline differenti e in varie condizioni di crescita;
4. Analisi morfologiche all'ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) in entrambe le specie cresciute sia *in vitro* sia *in vivo*.

3.1 Esperimenti *in vitro*

Per entrambe le specie si sono allestiti esperimenti *in vitro*, a diverse concentrazioni saline e con tempi di somministrazione differenti.

- a) Allestimento coltura *in vitro* di *Convolvulus sabatius*;
- b) Esperimenti di resistenza e tolleranza alla salinità su entrambe le specie;
- c) Allestimento di coltura *in vitro* in T.I.S. (Temporary Immersion System)

a) Allestimento della coltura *in vitro* di *Convolvulus sabatius*:

Nel caso del *Convolvulus sabatius* è stato necessario allestire la coltura *in vitro* che ha previsto la raccolta del materiale da due piante madri: la prima ricoverata in serra, la seconda coltivata all'aperto. Per entrambe le talee si è effettuata una sterilizzazione con una soluzione di ipoclorito di sodio (NaOCl) al 1,7% per 20 minuti, con l'aggiunta di alcune gocce di TWEEN20[®], seguita da due risciacqui in acqua sterile per 10 minuti. Solo la sterilizzazione degli espianti provenienti dalla pianta ricoverata in serra ha dato risultati positivi e gli espianti sterili così ottenuti hanno costituito in nostro materiale di partenza per i successivi esperimenti, svolti sotto cappa sterile a flusso laminare orizzontale. Le talee ottenute, sono state poste su mezzo di coltura con composizione salina MS (Murashige & Skoog, 1962 Tab. 1) a cui è stato aggiunto 1 ml/L di vitamine MS stock (100 mg/L; Murashige & Skoog, 1962 Tab. 2), 30 g/L di saccarosio, 8 g/L di agar (Plant Agar) ed il pH è stato portato ad un valore pari a 5,7 (tramite l'utilizzo di soluzioni diluite di idrossido di potassio (KOH) e acido cloridrico (HCl)). Il terreno di coltura così preparato è stato sterilizzato in autoclave a 121° C per 20 minuti. La propagazione è stata stimolata a seguito della somministrazione di una citochinina, la benziladenina (BA), alla concentrazione finale di 1,33 µM. Alla prima subcoltura al terreno è stato aggiunto anche un antibiotico, il Cefotaxime, alla concentrazione finale di 100 mg/L. Le soluzioni acquose della benziladenina e del cefotaxime sono state sterilizzate per filtrazione (filtro monouso sterile da 20 µm). Nella camera di crescita in cui

sono state allevate le giovani plantule *in vitro* le condizioni di temperatura erano pari a 23 ± 1 °C e con fotoperiodo di 16 ore di luce, con intensità luminosa di $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguite da 8 ore di buio. Dopo 3 subcolture, si è verificata la capacità di radicazione *in vitro* della specie: 15 espianti sono stati posti su terreno MS in assenza di regolatori di crescita dimezzando la concentrazione di saccarosio che da 30 g/L è stata ridotta a 15 g/L. Le piantine sono state poste in un locale con condizioni di umidità controllate da un sistema programmato di nebulizzazione (Sistema Mist) di 10 secondi ciascuna ogni 30 minuti dalle 9:00 alle 19:00. Dopo 1 mese sono state valutate le risposte ottenute in termini di numero e lunghezza delle radici ottenute.

Tipologia del terreno	Murashige & Skoog, 1962
	(MS)
Macroelementi	mg/l
CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170,0
KNO ₃	1900,0
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	1650,0
Microelementi	(mg/l)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
HBO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6

Tabella 1: elenco di tutti i micro e macro elementi presenti nella composizione dei sali Murashige & Skoog (1962).

VITAMINE e AMMINOACIDI	mg/l
Glicina	2.00
Mio-inositolo	100.00
Acido nicotinico	0.50
Piridoxina HCl	0.50
Tiamina HCl	0.10

Tabella 2: Vitamine addizionate al substrato di coltura

Oltre al prelievo di talee da piante madri, è stata analizzata la germinabilità della specie tramite l'utilizzo di alcuni semi (Fig.17) forniti dalla banca del germoplasma dei Giardini Hanbury per l'allestimento della coltura *in vitro*. Il protocollo ha previsto che 20 semi di *Convolvulus sabatius* fossero sterilizzati con ipoclorito di sodio al 1 % per 20 minuti, successivamente risciacquati con acqua distillata sterile con 2 lavaggi di 10 minuti ciascuno.

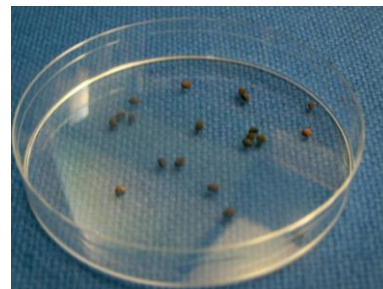


Figura 17 semi di *C. sabatius* prima della sterilizzazione.

I semi sono stati posti su terreno di crescita formato da acqua distillata gelifica con agar (7g/L) sterilizzato come sopra descritto, in capsule Petri, conservati in celle termostate a 18°C al buio per 30 giorni.

b) Esperimenti di resistenza alla salinità nelle due specie oggetto di studio.

Diversi test sono stati effettuati su entrambe le specie per verificare la capacità di resistenza e tolleranza a varie concentrazioni saline.

Su *Limonium cordatum* è stato eseguito un esperimento preliminare a basse concentrazioni di NaCl: 75 µM, 150 µM e 300 µM. Per la preparazione di questi terreni si è usata la soluzione di base MS

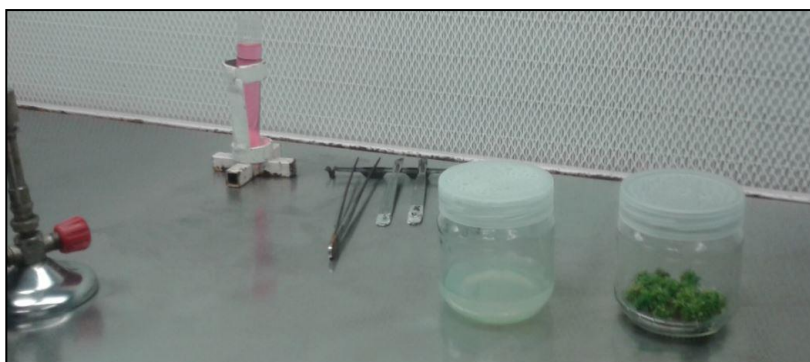


Figura 18 trasferimento sotto cappa a flusso laminare di *L. cordatum* nell'allestimento della prova di salinità.

con l'aggiunta di 0,88 µM BA, e le varie quantità di sale necessario per raggiungere la concentrazione desiderata (Fig. 18). Per allestire la coltura *in vitro* di *Limonium cordatum* si è fatto riferimento a quanto già riportato in letteratura (Savona et al, 2009). Un ulteriore dato rilevato durante la preparazione di questi medium di coltura è stata la misura della conducibilità prima e dopo la sterilizzazione in autoclave. Dopo 4 subcolture di *C. sabatius*, ottenuta la quantità di materiale necessaria, sono stati effettuati degli esperimenti di resistenza e risposta alla salinità, su entrambe le specie, ampliando il range di concentrazione di NaCl (0 mM; 75 mM; 150 mM; 300 mM; 450 mM; 600 mM pari alla concentrazione di cloruro di sodio presente nel mar Ligure). Per ogni trattamento sono state utilizzate 20 piantine; trascorsi 30 e/o 60 giorni di coltura sono stati misurati alcuni parametri morfometrici come peso, altezza, numero di foglie, presenza/assenza di radici, numero e lunghezza delle radici se presenti e percentuale di sopravvissuti. Tutti i dati raccolti nel corso degli esperimenti sono stati elaborati statisticamente come medie corredate con errore

standard della media e con analisi della varianza (ANOVA) con il programma COSTAT e il confronto è stato eseguito con il test Student Newman Keuls (SNK) calcolato a un livello di confidenza di $p < 0,5$. All'interno di ogni grafico e per ogni fattore considerato, lettere uguali corrispondono a medie non significativamente diverse tra loro. Oltre a questi parametri sono state prelevate 10 foglie per ogni trattamento sia a 30 giorni sia a 60, misurate con un analizzatore di immagini (Software Skyleaf) per i dati di dimensione dell'area fogliare.

Successivamente utilizzando organismi ottenuti dopo 4 settimane di propagazione *in vitro* si è voluta testare la loro capacità di radicazione. Le piante sono state coltivate per un totale di 4 settimane su terreno privo di ormoni in assenza di sale oppure privo di ormoni ma in presenza di sale, a settimane alterne. La concentrazione salina utilizzata è stata di 75 mM, 300 mM e 600 mM NaCl per il *L. cordatum* e 75 mM, 150 mM e 300 mM NaCl per il *C. sabatius*. Per entrambe le specie il controllo era costituito da piantine coltivate in terreno senza regolatori di crescita e senza sale, rinnovato ogni settimana. Al termine del periodo di coltura sono stati rilevati tutti i soliti parametri morfometrici, più l'eventuale presenza e/o numero di radici.

c) Allestimento di colture *in vitro* con l'utilizzo del metodo T.I.S. (Temporary Immersion Sistem).

Ulteriori indagini *in vitro* sono state effettuate utilizzando la coltura T.I.S., che ha comportato l'uso di due bioreattori, RITA[®] (Fig. 19A) e Plantform[™] (Fig. 19B), nei quali sono stati inseriti 400 ml e 160 ml di terreno liquido rispettivamente in assenza di agente gelificante. Nei Plantform[™] sono state messe in crescita 20 piantine, in quanto lo spazio a disposizione risulta maggiore rispetto ai RITA[®] in cui sono stati inseriti 16 espianti, numero massimo di individui indicato dal produttore. Per entrambe le tipologie di T.I.S., è stato utilizzato un timer collegato ad un pompa che dall'esterno immette aria sterile nel bioreattore facendo gorgogliare il terreno che entra così in contatto fisico con gli espianti. Tale timer era impostato per entrare in funzione ogni 3 ore per 3 minuti. Questo sistema è stato

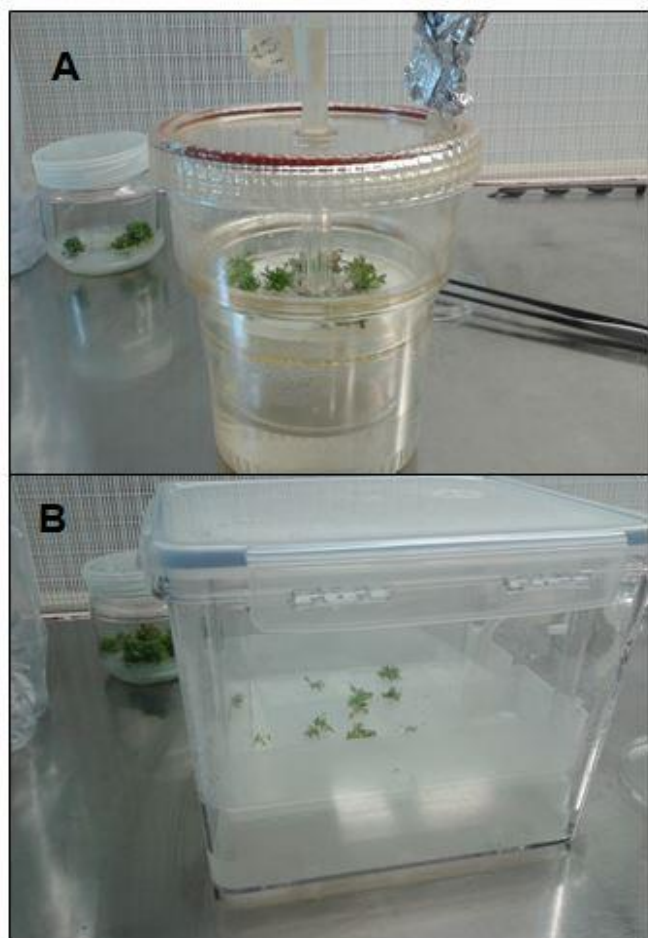


Figura 19 Allestimento coltura in terreno liquido con due bioreattori: **A** RITA[®] **B** Plantform[™] durante l'allestimento della coltura di *L. cordatum*.

posto in camera di crescita, così da avere le stesse condizioni di luce e fotoperiodo degli esperimenti precedenti eseguiti su terreno gelificato. In modo analogo a quanto fatto precedentemente, sono stati eseguiti degli esperimenti di resistenza alla salinità all'interno dei due bioreattori, al cui terreno è stato addizionata una concentrazione di NaCl pari a 150 mM, 300 mM e 600 mM per il *C. sabatius* e 150 mM e 300 mM per il *L. cordatum*; per entrambe le specie è stato previsto un controllo in terreno liquido senza l'aggiunta di sale. Contemporaneamente l'esperimento è stato effettuato anche utilizzando terreno solido per verificare eventuali modificazioni nelle risposte dovute al solo trattamento in liquido. In tutti i terreni di coltura è stata inserita la citochinina BA alle concentrazioni precedentemente indicate, per entrambe le specie. Poiché risulta elevata la percentuale di inquinamenti all'interno di questi contenitori, si è provveduto ad aggiungere 10 ml/L di Cefotaxime, preparato come precedentemente descritto, allo scopo di prolungare la permanenza degli espianti negli esperimenti e di ridurre la percentuale di contaminanti. Dopo 21 giorni di trattamento, sono stati raccolti i parametri morfometrici, come eseguito per gli altri esperimenti per poter confrontare le tipologie di coltura *in vitro* e valutare quale fosse più idonea alla crescita, moltiplicazione e risposta alla salinità delle due specie oggetto di studi.

3.2 Coltura *in vivo* di *Convolvulus sabatius*

A seguito dei risultati ottenuti con gli esperimenti *in vitro* in presenza delle diverse concentrazioni saline, si sono allestiti per questa sola specie alcuni esperimenti *in vivo*. Quindici piantine radicate *in vitro* sono state poste in alveolari da 60 fori, con substrato composto da una mistura di perlite e terriccio commerciale per semina con rapporto 70:30 v/v, trasferite in serra di ambientamento, caratterizzata da una temperatura di $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ e da un valore di umidità pari all'80% per verificare il funzionamento dell'apparato radicale. Il locale di ambientamento è dotato di un sistema programmato (Sistema Mist) di

nebulizzazione di 10 secondi ciascuna ogni 30 minuti dalle 9:00 alle 19:00. Trascorsi 30 giorni le piantine sopravvissute sono state travasate in vasi

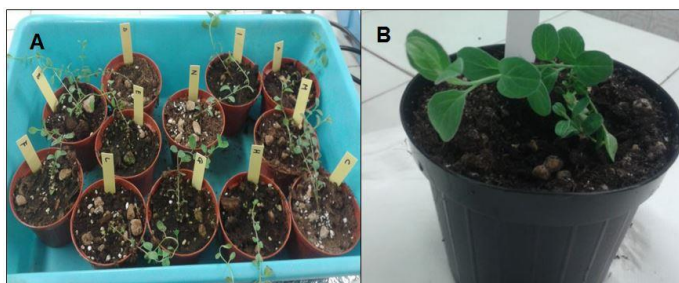


Figura 20 Esempio di prova *in vivo* del *Convolvulus sabatius*

da 11 cm di diametro con pomice e terriccio commerciale e mantenute in

serra con umidità pari al 60%. Un secondo esperimento è stato effettuato utilizzando 30 piantine derivate da ambientamenti precedenti, con la stessa modalità descritta sopra, le quali una volta trasferite nei vasi da 11 cm di diametro, sono state trasportate all'interno della camera di crescita, con condizioni di luce, temperature e umidità controllate. Le piante sono state suddivise in 3 gruppi

omogenei ciascuno sottoposto a bagnatura con 50 ml di acqua distillata ogni due giorni e nebulizzazione delle parti aeree degli individui con 2,5 ml di acqua distillata, soluzione acquosa a 300 mM e 600 mM NaCl, rispettivamente (Fig. 20). Dopo 30 giorni sono stati valutati i parametri morfometrici.

Allo stesso modo si è allestito un ulteriore esperimento in cui 36 piantine radicate *in vitro*, acclimatate come sopra descritto, sono state trasferite in camera di crescita, suddivise in 3 gruppi omogenei, ciascuno bagnato ogni 2 giorni con 30 ml di acqua distillata per il controllo e di soluzione acquosa a 300 mM e 600 mM NaCl, rispettivamente. Al termine dell'esperimento sono stati raccolti i parametri morfometrici, come precedentemente evidenziato. Così pure si è misurato il rapporto tra il peso delle radici e della parte aerea di ogni piantina. Tale materiale è stato conservato in freezer alla temperatura di -80°C per analisi successive sul quantitativo di prolina presente per valutare l'eventuale coinvolgimento dell'apparato radicale nella risposta allo stress salino.

3.3 Quantificazione della prolina

Le analisi sul quantitativo di prolina libera presente nelle piantine coltivate in presenza di diverse concentrazioni di NaCl sono state svolte seguendo il protocollo di Williams & Frank (1974) con alcune modificazioni. Gli espianti provenienti da ogni trattamento erano raccolti, polverizzati in azoto liquido con mortaio e pestello, dopodiché 50 mg della polvere ottenuta sono risospesi in 1 ml di soluzione acquosa al 3% di acido 5-solfosalicilico diidrato. La sospensione ottenuta viene centrifugata a 14.000 giri per 15 minuti. Il surnatante ottenuto, previo congelamento, è stato successivamente analizzato presso il laboratorio del Prof. Giuseppe Forlani (Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Vegetale del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara) per la determinazione del contenuto della prolina e degli amminoacidi totali. Il test della ninidrina acida prevede che 15 µl di una opportuna diluizione di ciascun campione vengano distribuiti in una piastra a 96 pozzetti, tamponati a pH 4 con 15 µl di una soluzione 3 M sodio acetato, successivamente addizionati con 200 µl di una soluzione allo 0,15% di ninidrina in acido acetico glaciale. La piastra ottenuta viene immediatamente utilizzata per una prima lettura mediante un lettore di piastre Ledetect 96 (Labexim, Lengau, Austria), equipaggiato con filtri a lunghezza d'onda pari a 352 e 540 nm. Quindi la piastra contenente i campioni viene posta a 50 °C per 12 minuti e 30 secondi, permettendo la reazione dei gruppi amminici primari e secondari con la ninidrina, sviluppando rispettivamente dei prodotti di colore blu e giallo; successivamente i campioni vengono raffreddati per 2 minuti e 30 secondi, da ultimo si effettuano 3 letture consecutive a distanza di 2 minuti e 30 secondi l'una dall'altra alle due lunghezze d'onda di 352 e 540 nm. Alla media delle 3 letture si sottrae quindi il valore ottenuto prima dell'incubazione a 50°C,

in modo da eliminare l'assorbanza dovuta ad altri composti presenti nei diversi estratti. Per calcolare la concentrazione di prolina e degli amminoacidi totali i dati ottenuti sono interpolati con quelli ricavati allo stesso modo con una soluzione di riferimento contenente 1 mM prolina e 25 mM complessivamente degli altri 19 amminoacidi proteino-genici (ognuno 1 mM, tranne glutammina 5 mM, glutammico, aspartico e asparagina 2 mM, assente la cisteina).

I campioni in cui determinare la quantità di prolina presente nell'estratto fogliare sono stati ottenuti da organismi coltivati *in vitro* per 30 giorni in presenza di differenti concentrazioni di NaCl (0, 75 mM, 150 mM, 300 mM, 450 mM e 600 mM). Un secondo set di esperimenti ha previsto l'utilizzo di concentrazioni saline fisse (0, 75 mM NaCl per *C. sabatius*, 0, 300 mM NaCl per *L. cordatum*) con prelievi effettuati ogni 5 giorni fino al raggiungimento dei 30 totali di coltura.

Un ulteriore esperimento è stato effettuato utilizzando piante di *C. sabatius* coltivate *in vivo*, irrigate con tre concentrazioni saline, 0 mM NaCl, 300 mM NaCl e 600 mM NaCl. Dopo i primi 10 giorni sono state raccolte, unificate e congelate le parti aeree e radicali, rispettivamente, di 4 piante per trattamento. Si è proceduto allo stesso modo ogni 5 giorni per un totale di 30 giorni di trattamento. La determinazione del contenuto di prolina e amminoacidi nelle porzioni aeree e radicali è stata eseguita secondo il protocollo precedentemente descritto.

3.4 Analisi morfologiche all'ESEM in entrambe le specie cresciute sia *in vivo* sia *in vitro*.

Campioni fogliari di *L. cordatum* e *C. sabatius* provenienti da organismi coltivati *in vitro* in presenza delle diverse concentrazioni saline e/o prelevati *in vivo* in località Capo Noli (SV) sono stati analizzati tramite ESEM (consorzio SITEIA, presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Parma). Per entrambe le specie, il campionamento *in vivo* ha riguardato individui situati in 2 posizioni differenti uno posto nelle immediate vicinanze dello strapiombo a mare, l'altro molto vicino alla strada provinciale, arretrato di circa 50 m dal precedente. Le foglie raccolte sono state immerse, *in loco*, in glutaraldeide al 3% in 0,1 M tampone fosfato. Trascorse 24 ore dall'immersione dei campioni in fissativo, sono stati effettuati i seguenti lavaggi:

- 3 lavaggi da 30 minuti ciascuno in 0,1 M tampone fosfato
- 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno in 25% di acetone,
- 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno in 50% di acetone,
- 1 lavaggio da 10 minuti in 75% di acetone,
- 1 lavaggio da 10 minuti in 100% di acetone.

Terminata questa procedura, i campioni sono stati trasferiti nel pozzetto del Critical Point Dryer (CPD), dove la CO₂ liquida viene sostituita all'acetone, e si esegue il Critical Point, che consiste

nello scaldare il pozzetto in modo tale che la CO₂ evapori, completando così la disidratazione. Le foglie così disidratate, sono state poste sugli stubs (Fig. 21) per essere osservate in un secondo momento all'ESEM.

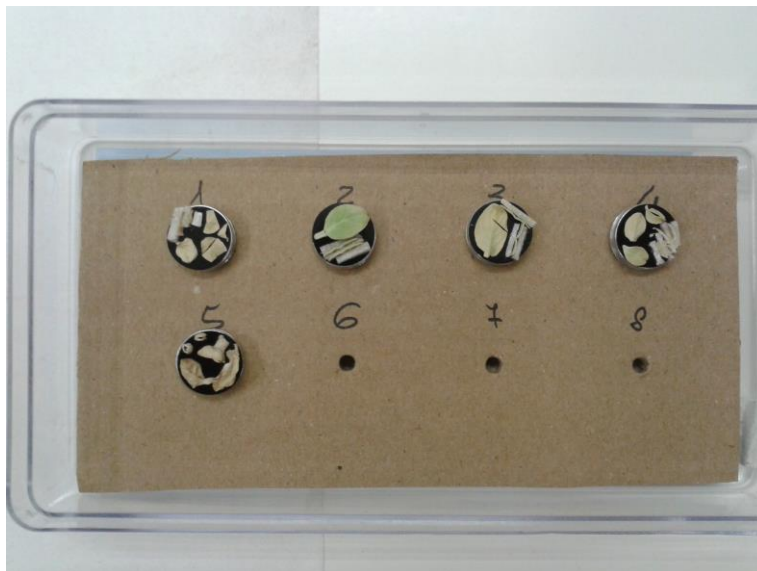


Figura 21 campioni di *Convulvulus sabatius* disidratati e posti sugli stubs per la visualizzazione all'ESEM.

Capitolo 4:

Risultati

4.1 Risultati esperimenti *in vitro*

a) Allestimento della coltura *in vitro* di *C. sabatius*

Per l'allestimento della coltura *in vitro* del *Convolvulus sabatius* si è partiti da materiale proveniente da due piante madri, la prima coltivata all'aperto, la seconda ricoverata in serra. Le talee prelevate hanno mostrato una diversa risposta alla procedura di sterilizzazione, infatti, si è ottenuto materiale sterile solo da talee provenienti da pianta madre ricoverata in serra.

Tali espianti dopo 30 giorni di coltura *in vitro* hanno dato buoni risultati in termini di sviluppo e sterilità acquisita ed è stato possibile iniziare delle subcolture successive per moltiplicare la specie ed ottenere un numero di espianti sufficiente per testare la capacità di radicazione, ambientamento e risposta alla salinità.

Il terreno idoneo per ottenere un tasso di moltiplicazione elevato è composto da sali MS a concentrazione intera, con l'aggiunta di 1 ml/L di vitamine MS stock, 30 g/L di saccarosio, 8 g/L di agar (Plant Agar), in presenza di 1,33 μ M BA (Fig 22). Questa composizione del substrato ha permesso di ottenere un tasso di moltiplicazione pari a 1,8 germogli per mese per espianto (Tab. 3).

<i>Convolvulus sabatius</i>	Tasso di moltiplicazione
Luglio/agosto	1,78
Agosto/settembre	1,83
Settembre/ottobre	1,85
Ottobre/novembre	1,84
Media	1,82

Tab. 3: elenco di tassi di moltiplicazione *in vitro* di *C. sabatius* durante 4 mesi.



Figura 22: esempio di espianti di *C. sabatius* dopo un mese di subcoltura.

Dopo 3 subculture, si è proceduto a verificare la capacità di radicazione di questa specie *in vitro*, (Fig.23). Trascorso un mese dall'inizio del esperimento, il *C. sabatius* ha mostrato una buona capacità di radicazione, infatti, tutti gli espianti messi in coltura hanno prodotto radici (Tab. 4).



Figura 23: piantine di *C. sabatius* radicate *in vitro* dopo 30 giorni di coltura.

Numero medio radici	3
Lunghezza media/radice (cm)	7

Tabella 4: radici del *C. sabatius* con lunghezza media e numero medio prodotto per espianto.

Le piante radicate sono state poste nel locale ambientamento per testare la funzionalità delle radici prodotte *in vitro*. Trascorsi 30 giorni tutte le piante erano sopravvissute e ben sviluppate, segno evidente di come le radici fossero completamente funzionali (Fig. 24).

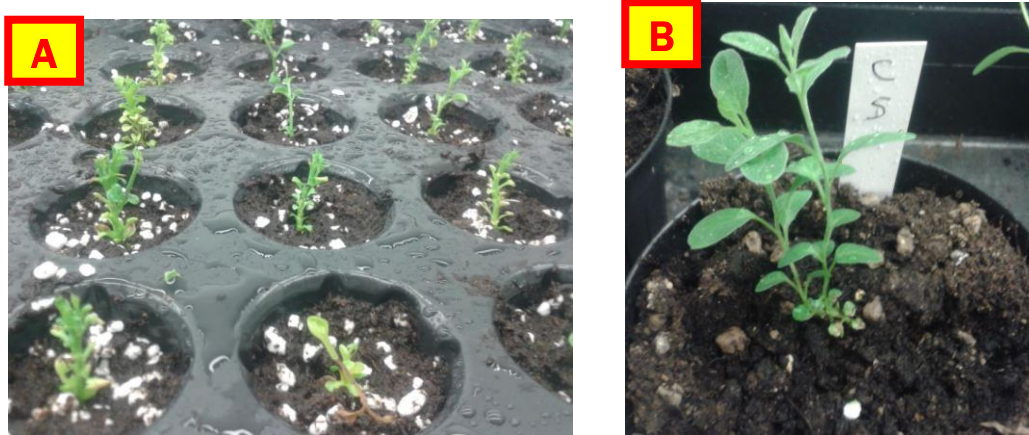


Figura 24: A piantine di *C. sabatius* appena trasferite *in vivo* per l'ambientamento; B pianta trasferita in vaso da 11 dopo un mese, trascorso in ambientamento in serra.

Al contrario di quanto atteso, il tentativo di ottenere piante sterili tramite germinazione di semi ricevuti dai Giardini Hanbury, non ha portato risultati positivi. Infatti dopo 30 giorni non si è verificata alcuna germinazione, in quanto da un'analisi successiva i semi sono risultati privi di embrione.

b) Esperimenti di resistenza alla salinità nelle due specie *in vitro*.

Convolvulus sabatius

Trascorsi 30 giorni dall'inizio dell'esperimento si sono ottenute diverse percentuali di sopravvivenza di questa specie, correlate con la concentrazione salina come è evidenziato nel grafico 1, dove all'incremento della concentrazione salina consegue un aumento della mortalità degli espianti. Questo fenomeno è ben rappresentato nella figura riportata di seguito (Fig. 25) dove a partire dalla concentrazione 300 mM NaCl si verifica un sempre più evidente danno che provoca la morte di tutti gli espianti alla concentrazione massima (600 mM NaCl).

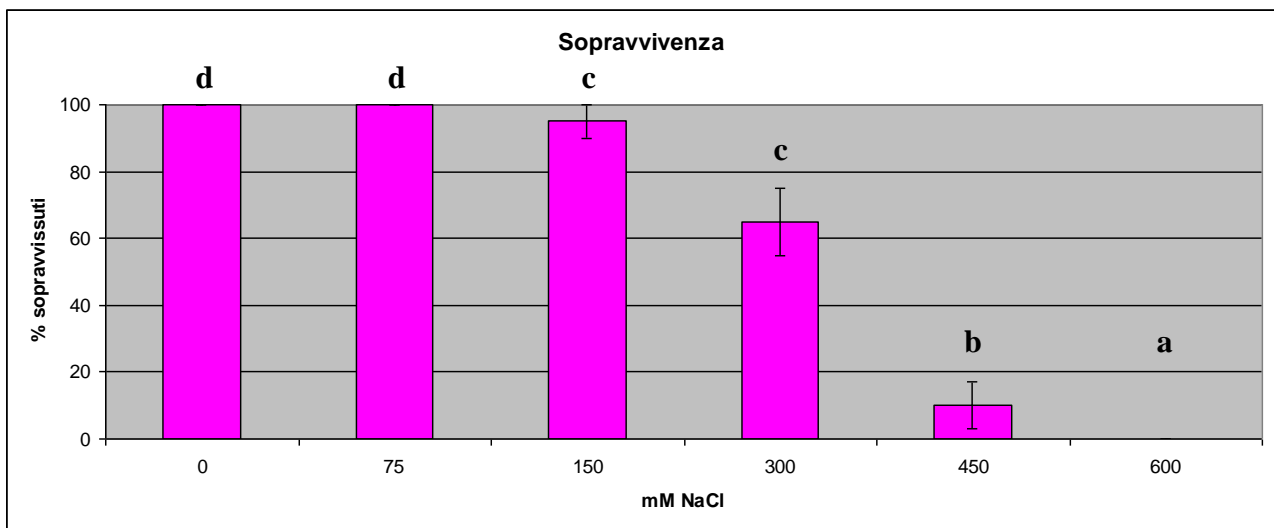


Grafico 1: percentuale di sopravvivenza degli espianti dal controllo alla concentrazione salina più elevata (600 mM NaCl).

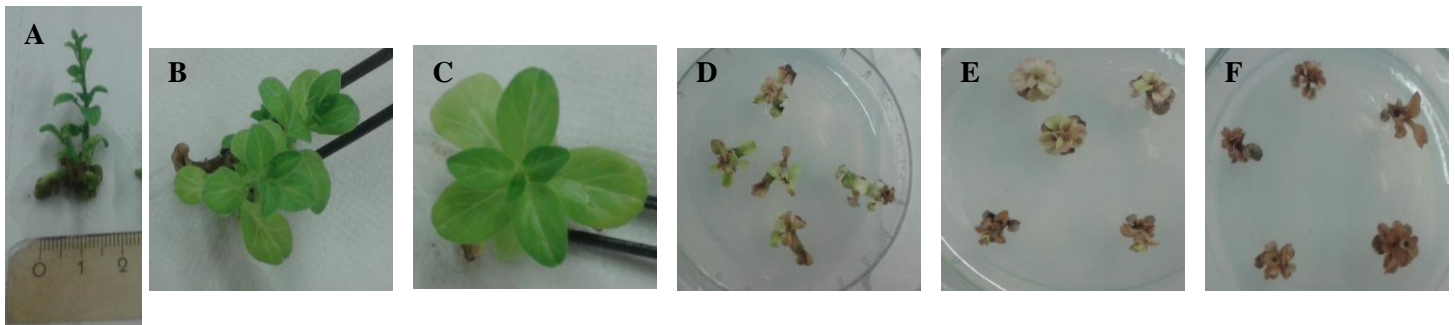


Figura 25: esempi di espianti trattati con cloruro di sodio a diverse concentrazioni: A controllo; B 75 mM NaCl; C 150 mM NaCl; D 300 mM NaCl; E 450 mM NaCl; F 600 mM NaCl dove le piantine sono tutte morte.

Al termine di questo esperimento sono stati misurati alcuni parametri morfologici: peso fresco, altezza, numero di nuovi espianti prodotti per ogni singolo germoglio e numero totale delle foglie. I valori medi ottenuti sono stati riportati in grafico (Grafico 2) per analizzarne le significatività statistiche, dai quali si evidenzia lo stesso andamento riscontrato nel grafico precedente, ossia riduzione nel numero di nuovi espianti prodotti e nell'altezza (Grafico 2: A; B) alle concentrazioni più alte di cloruro di sodio.

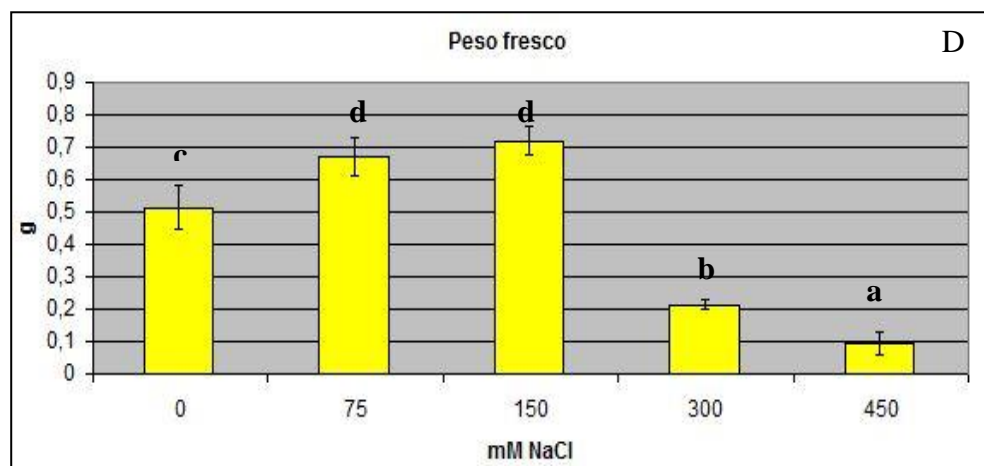
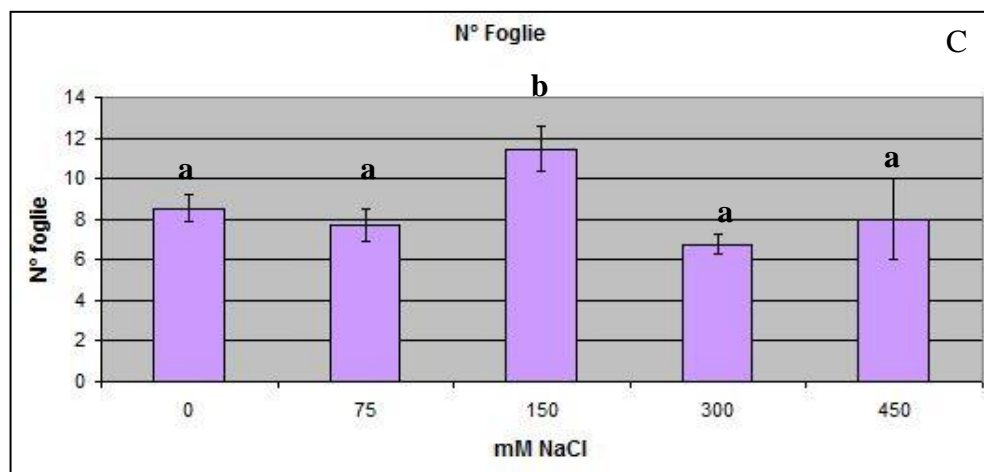
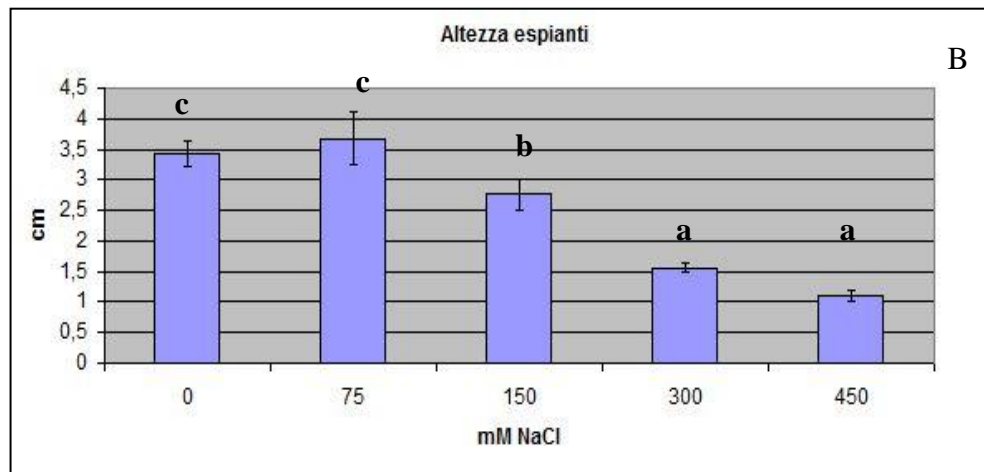
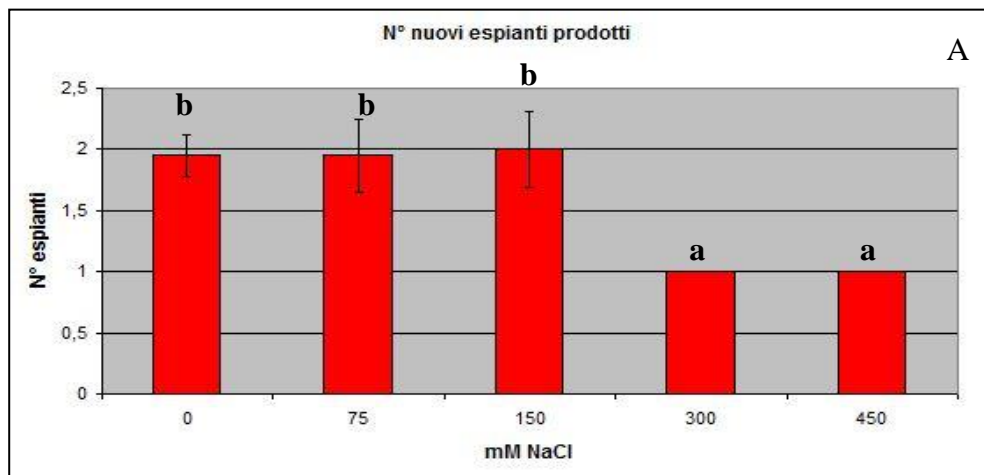


Grafico 2: grafici delle medie di parametri morfologici a concentrazione salina crescente. A: numero di nuovi espianti prodotti per germoglio; B: altezza degli espianti; C: numero di foglie; D: peso fresco.

Dal grafico 2 C si può notare un aumento significativo nel numero totale delle foglie in corrispondenza di 150 mM NaCl che si riflette nel significativo aumento di peso fresco (vedi grafico 2 D). Un ulteriore esperimento è stato effettuato prolungando la permanenza dello stress fino a 60 giorni, dove la risposta è decisamente più netta, come si può notare dai grafici e dalle foto riportate di seguito:

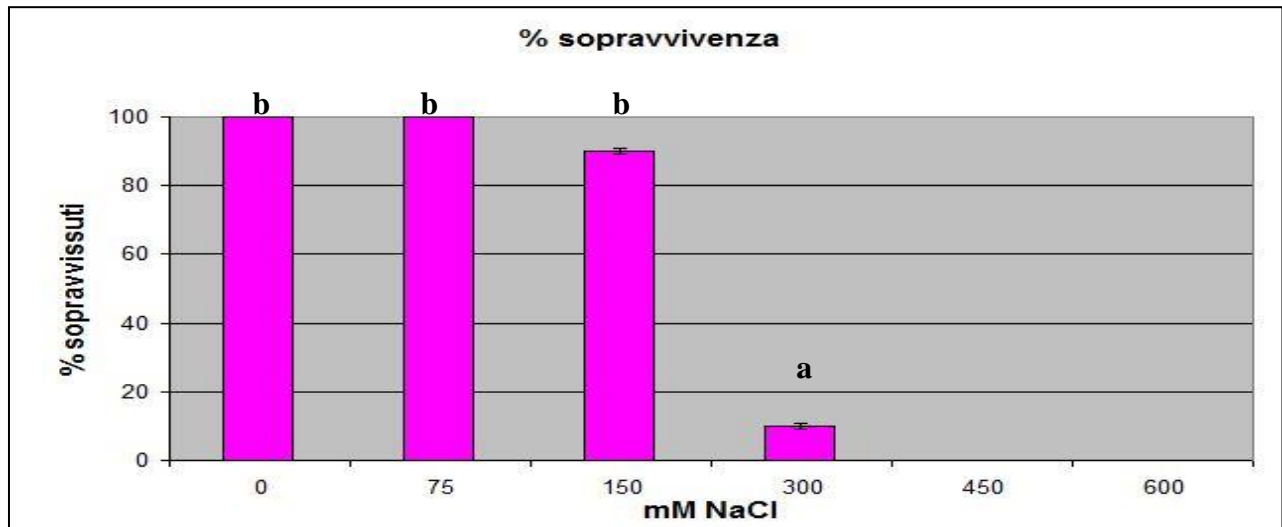


Grafico 3: percentuali di sopravvivenza del *C. sativus* in vitro, dopo 60 gg, all'aumentare della concentrazione salina.

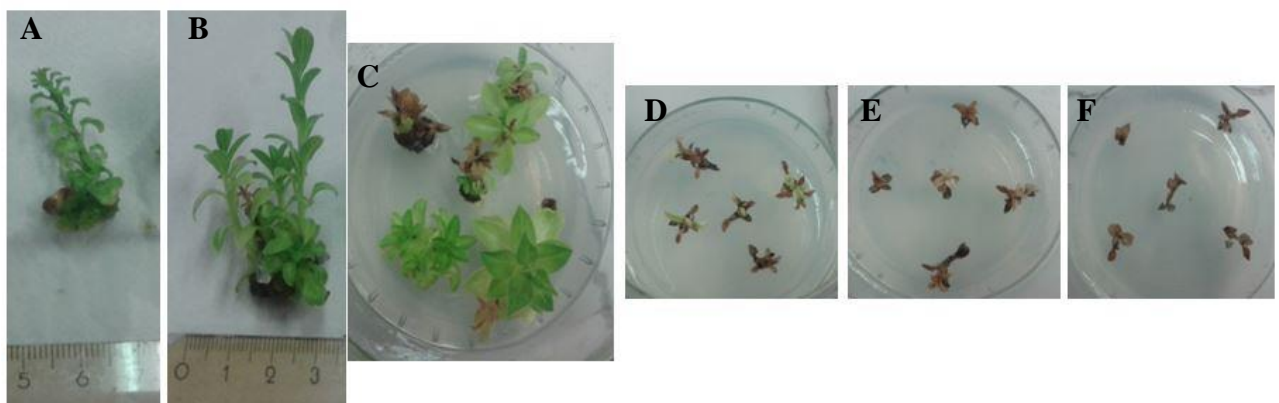


Figura 26: esempi di espianti trattati con cloruro di sodio a diverse concentrazioni dopo 60 gg di trattamento: A controllo; B 75 mM NaCl; C 150 mM NaCl; D 300 mM NaCl; E 450 mM NaCl; F 600 mM NaCl dove le piantine sono tutte morte.

Al termine di questo esperimento come effettuato precedentemente, sono state misurati gli stessi parametri morfologici. I valori medi ottenuti sono stati riportati in grafico (Grafico 4) per analizzarne le significatività statistiche, dalle quali si evidenzia che come per la sopravvivenza, anche i parametri morfometrici hanno un andamento più netto e si evidenzia come la concentrazione limite risulti essere quella di 150 mM (Grafico 4: A; B; C; D).

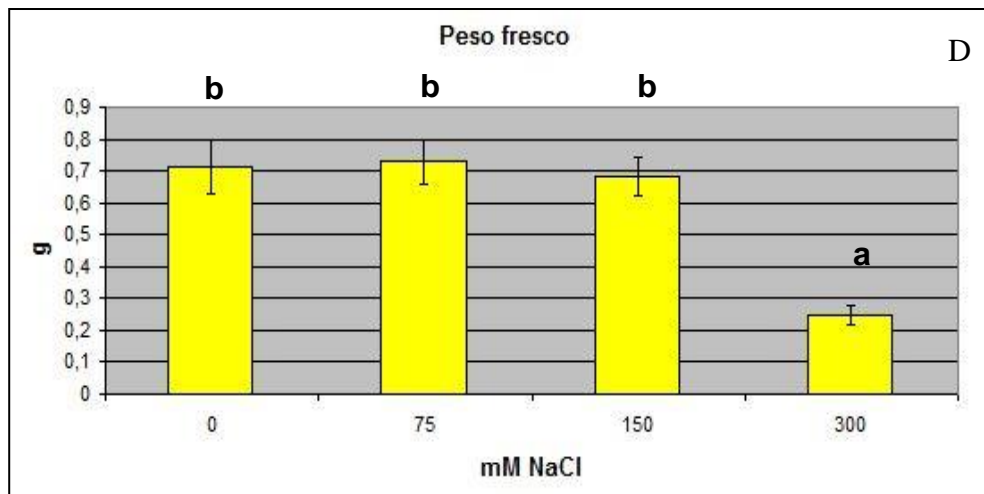
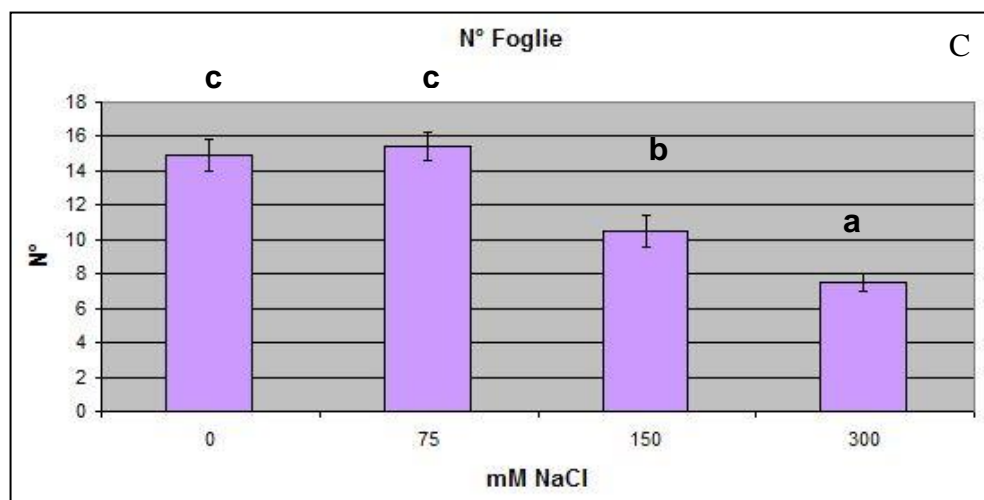
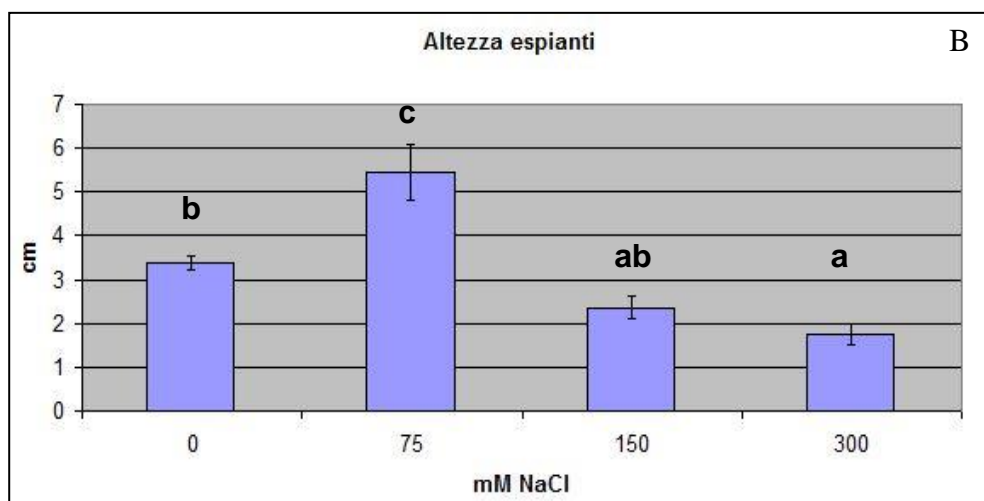
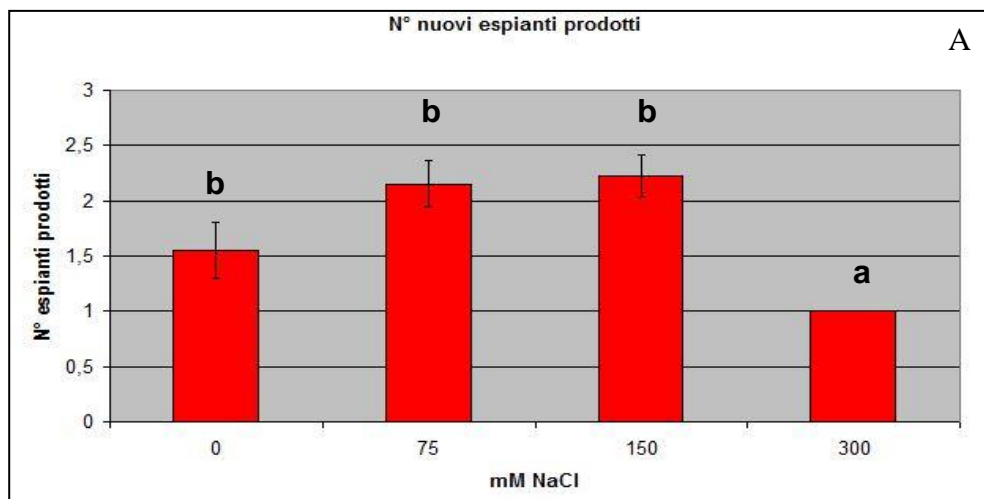


Grafico 4: grafici delle medie di parametri morfologici a concentrazione salina crescente dopo 60gg. A: numero di nuovi espianti prodotti per germinoglio; B: altezza degli espianti; C: numero di foglie; D: peso fresco.

Limonium cordatum

Per questa specie sono stati allestiti i medesimi esperimenti eseguiti su *C. sabatius*, quindi è stata valutata la risposta a diverse concentrazioni di NaCl *in vitro*, dopo 30 giorni e 60 giorni di trattamento, determinando la sopravvivenza e i parametri morfometrici già analizzati per la specie precedente.

Trascorsi 30 giorni dall'inizio dell'esperimento, la tolleranza di *L. cordatum* alla salinità risulta essere molto più elevata rispetto a quella rilevata per *C. sabatius*, come è visibile nel grafico 5, dove si può notare come la mortalità alla concentrazione salina più elevata sia solo del 40%.

Questa situazione appare evidente anche nelle immagini in figura 27.

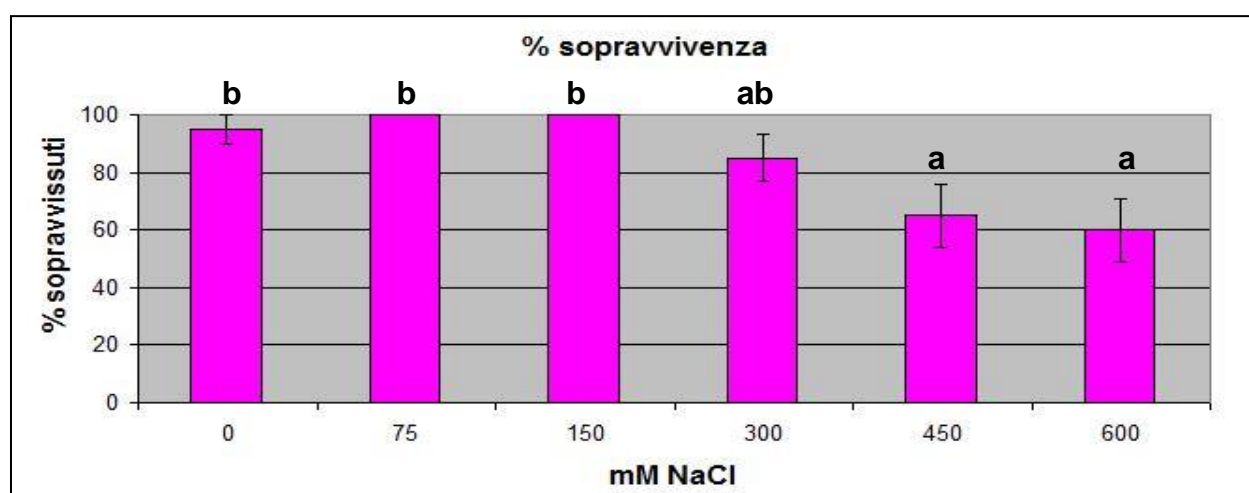


Grafico 5: percentuali di sopravvivenza del *L. cordatum in vitro*, dopo 30 gg, all'aumentare della concentrazione salina.



Figura 27: esempi di espianti trattati con cloruro di sodio a diverse concentrazioni dopo 30 gg di trattamento: A controllo; B 75 mM NaCl; C 150 mM NaCl; D 300 mM NaCl; E 450 mM NaCl; F 600 mM NaCl.

Dai dati del grafico 6 si riscontra una buona tollerabilità alla salinità. Infatti, la significativa riduzione nel numero di foglie che si registra alla concentrazione di 150 mM NaCl rimane costante all'aumentare della concentrazione salina (Grafico 6A); i valori relativi all'altezza degli espianti subiscono un calo alle concentrazioni intermedie (Grafico 6B).

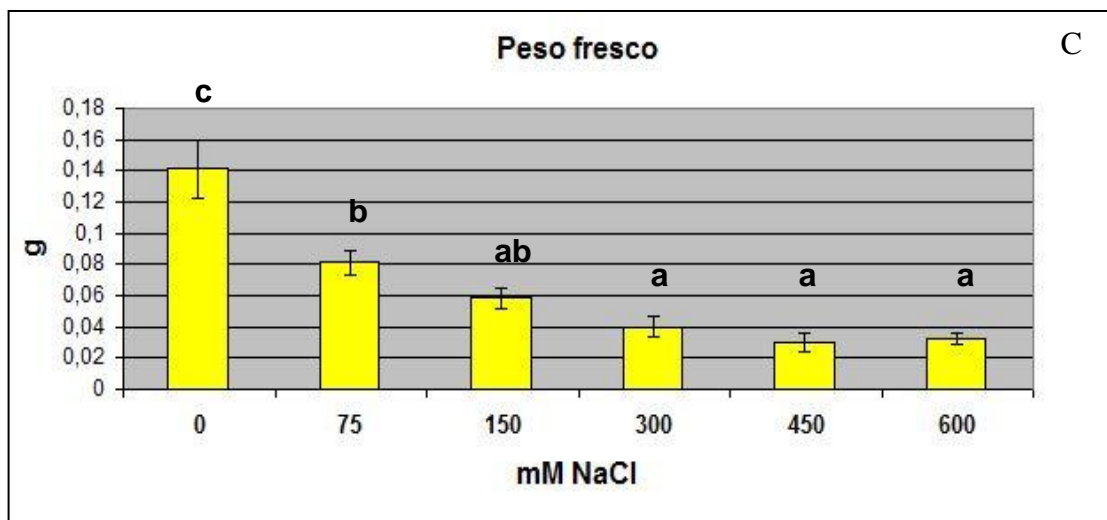
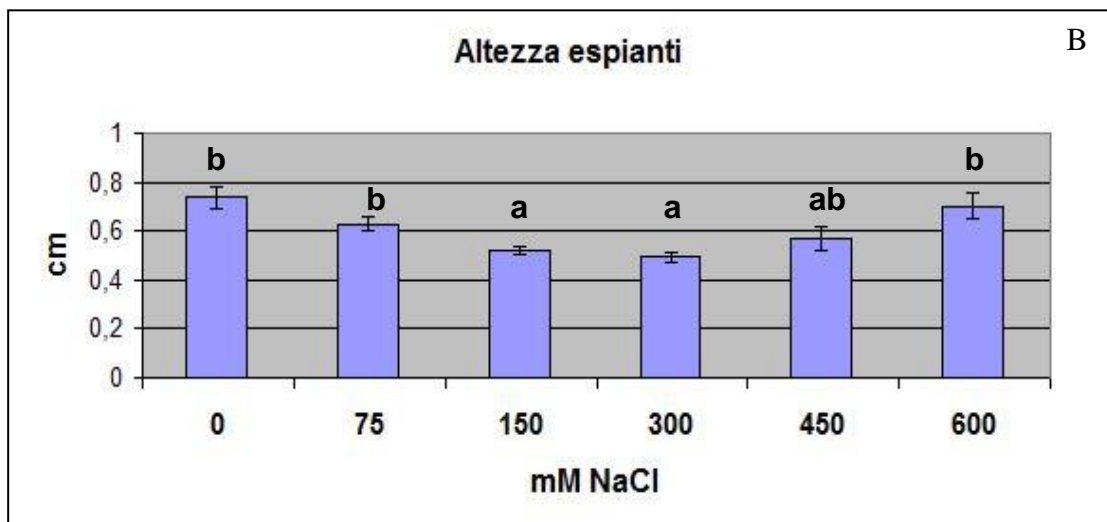
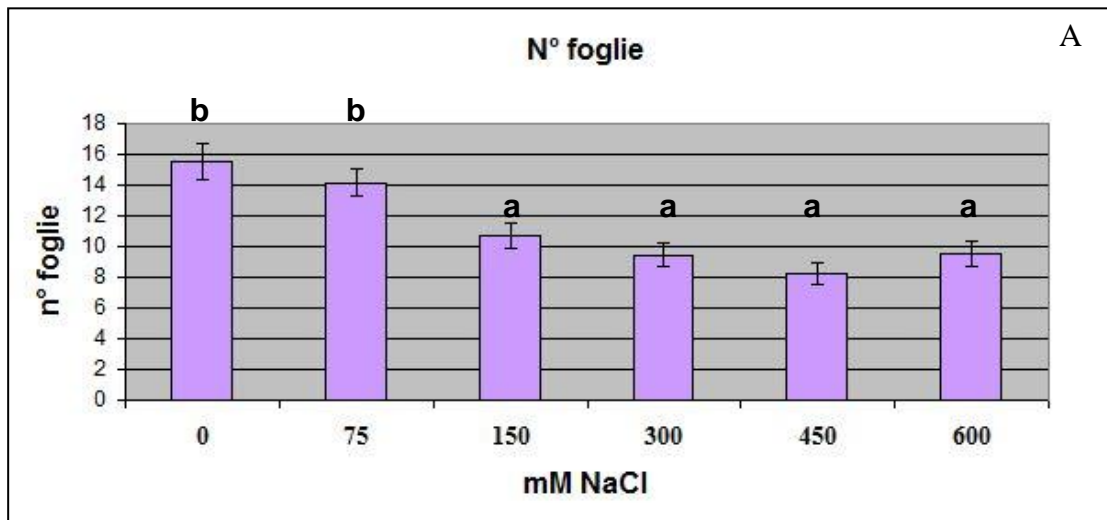


Grafico 6: grafici delle medie di parametri morfologici a concentrazione salina crescente dopo 30gg. A: numero di foglie; B: altezza degli espianti; C: peso fresco.

Nel grafico 6 C è possibile notare come già a basse concentrazioni saline, il peso fresco delle piantine sottoposte a trattamento, risulti avere un decremento significativo, che rimane costante a 150 mM NaCl, e decresce ancora a 300 mM NaCl, concentrazione dopo la quale non si rileva una significativa perdita di peso.

E' stato effettuato un ulteriore esperimento con le medesime concentrazioni saline, prolungando il tempo di trattamento sino a 60 giorni, trascorsi i quali è stata valutata la sopravvivenza delle piantine (Grafico 7). A questo proposito si può notare un consistente aumento della mortalità alle concentrazioni più elevate. Questo andamento discendente della percentuale di sopravvivenza è ben evidente anche dai danni presenti sulle piantine, come riportato nelle immagini sottostanti (Fig. 28).

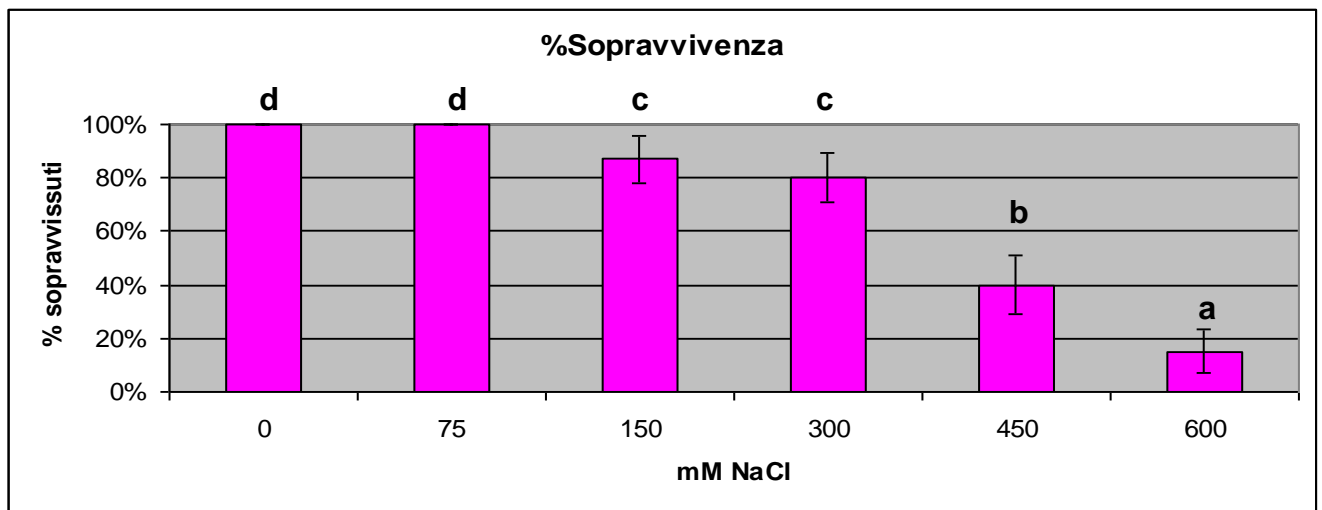


Grafico 7: percentuali di sopravvivenza del *L. cordatum in vitro*, dopo 60 gg, all'aumentare della concentrazione salina.



Figura 28: esempi di espianti trattati con cloruro di sodio a diverse concentrazioni dopo 60 gg di trattamento: A controllo; B 75 mM NaCl; C 150 mM NaCl; D 300 mM NaCl; E 450 mM NaCl; F 600 mM NaCl.

Per quanto riguarda gli altri parametri misurati, riportati nei grafici 8 A-B-C, si può notare come la concentrazione di 150 mM NaCl per il numero di foglie (Grafico 8A) sia il valore soglia dopo la quale si registra un calo significativo della quantità fogliare; al contrario, per gli altri due valori misurati (Grafico 8 B-C) è possibile riscontrare come la concentrazione soglia sia minore, 75 mM NaCl, superata la quale si ha una diminuzione significativa sia dell'altezza sia del peso fresco.

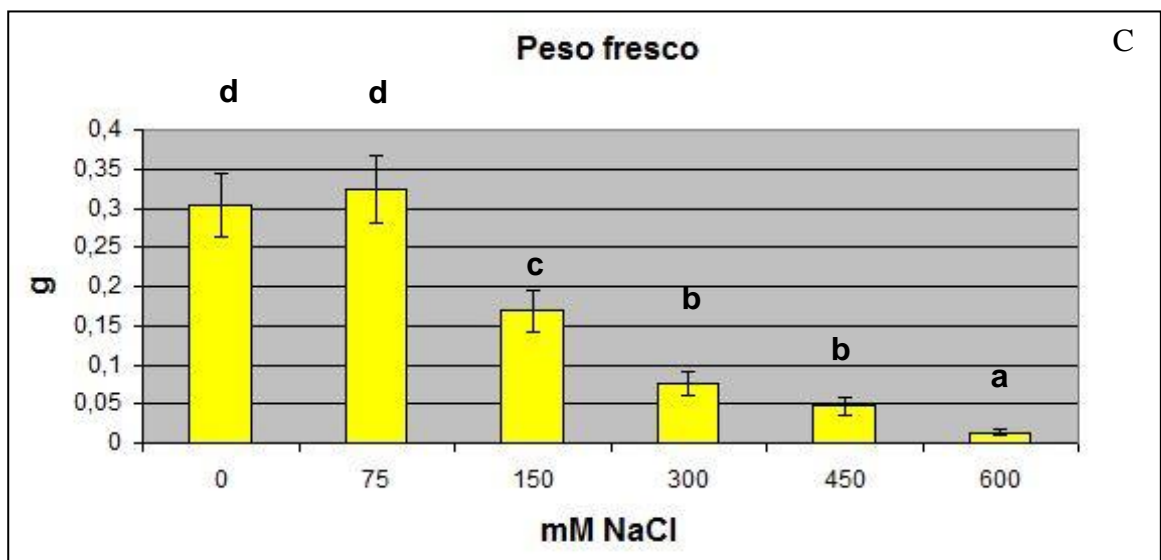
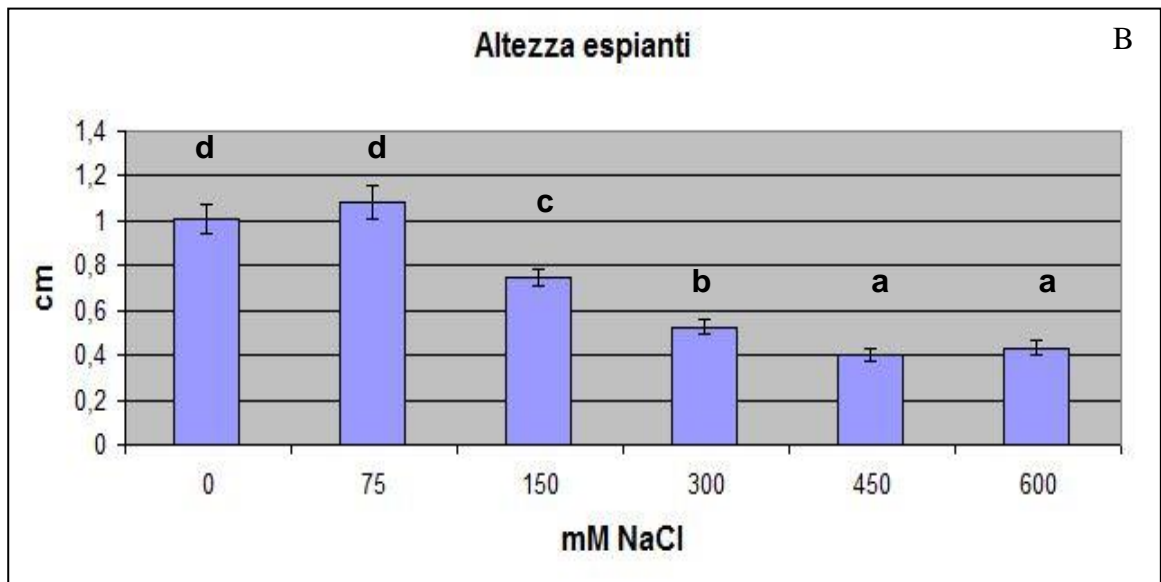
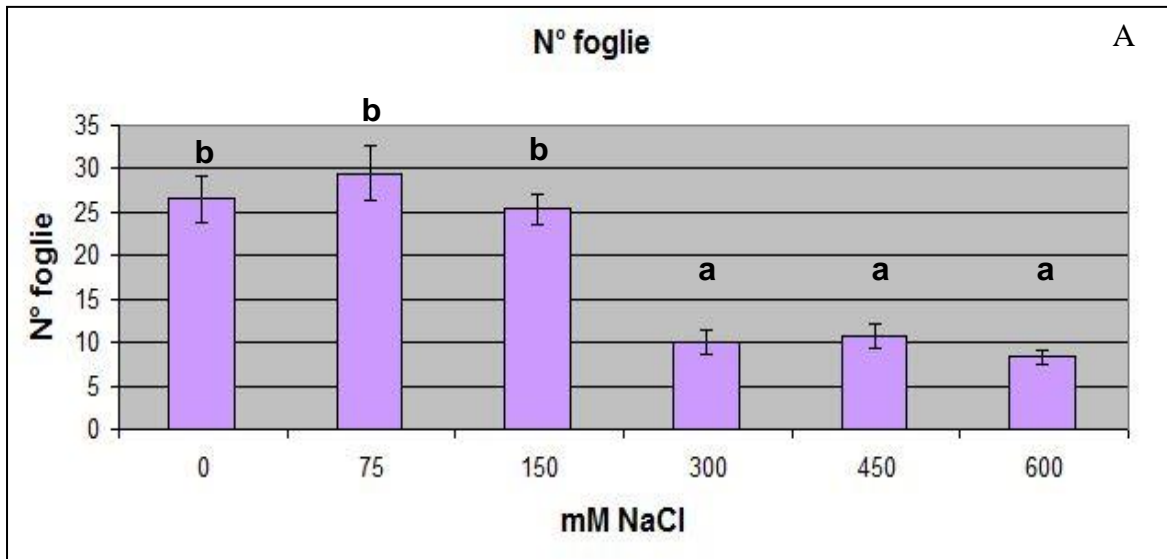


Grafico 8: grafici delle medie di parametri morfologici a concentrazione salina crescente dopo 60gg. A: numero di foglie; B: altezza degli espianti; C: peso fresco.

Per entrambe le specie è stata valutata l'area fogliare, trascorsi sia 30 giorni che 60 giorni. Dalle immagini (Fig. 29-30) e dai grafici (Grafico 9-10) presentati in *C. sabatius* è ben evidente la tendenza ad incrementare l'area fogliare all'aumentare della concentrazione salina, dopo 30 giorni di trattamento, risposta alla salinità che si presenta più nettamente dopo 60 giorni. Infatti, alla concentrazione di 150 mM NaCl si riscontra un valore medio di area fogliare che risulta essere maggiore di 3 volte rispetto a quello del controllo. A concentrazioni più elevate, l'area si riduce notevolmente.

Area Fogliare *C. sabatius* a 30 giorni

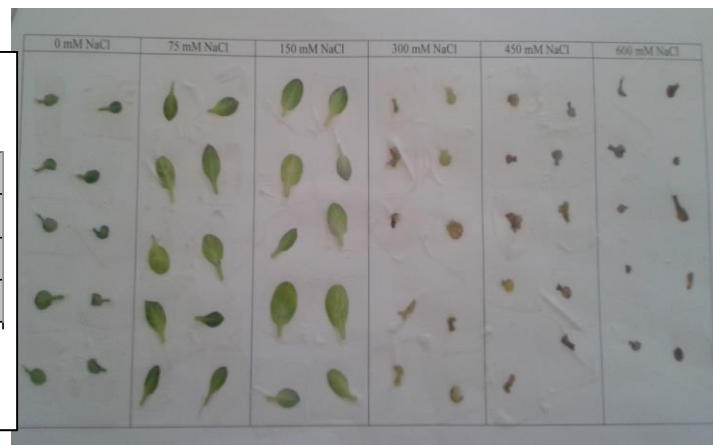
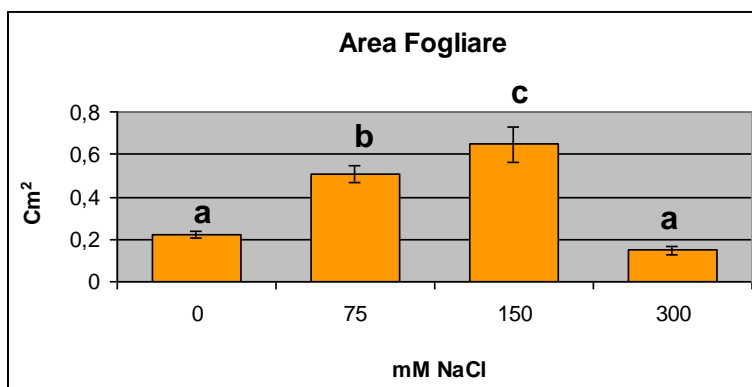


Grafico 9: misura dell'area fogliare, dopo 30gg, in correlazione alla concentrazione salina; **Figura 29**: immagine delle foglie raccolte e misurate di *C. sabatius* dal controllo fino alla concentrazione massima dopo 30 giorni di trattamento.

Area Fogliare *C. sabatius* a 60 giorni

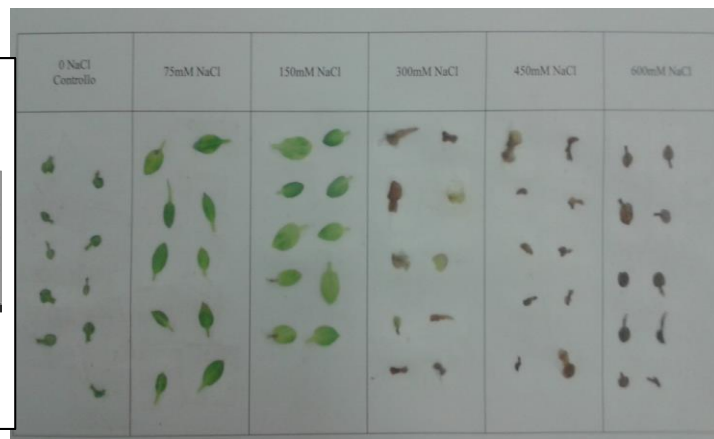
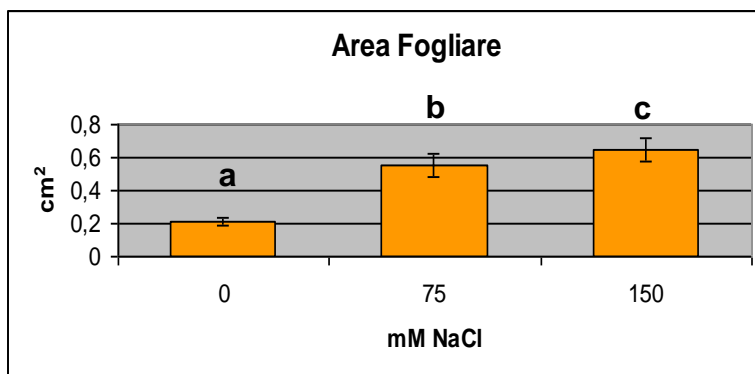


Grafico 10: misura dell'area fogliare, dopo 60gg, in correlazione alla concentrazione salina; **Figura 30**: immagine delle foglie raccolte e misurate di *C. sabatius* dal controllo fino alla concentrazione massima dopo 60 giorni di trattamento.

Per quanto riguarda il *Limonium cordatum* si è proceduto allo stesso modo.

In questo caso la risposta del *L. cordatum* appare differente, come si può notare dai grafici 11-12 e dalle figure 31-32. Il *Limonium cordatum* ha la tendenza a restringere l'area fogliare, modificando la forma della foglia, che con il passare del tempo tende ad assumere un aspetto aghiforme.

Questa tendenza è evidente dopo 30 giorni di trattamento, in cui la dimensione delle foglie diminuisce già alla concentrazione di 75mM NaCl, e risulta costante nelle altre concentrazioni; trascorsi 60 giorni questo andamento è sicuramente più netto, infatti le prime due concentrazioni saline, 75 mM e 150 mM NaCl mostrano una diminuzione dell'area fogliare rispetto al controllo, a 300 mM si ha nuovamente un valore significativamente minore rispetto alle prime concentrazioni, che rimane costante fino alla concentrazione di 600 mM NaCl.

Area Fogliare *L. cordatum* a 30 giorni

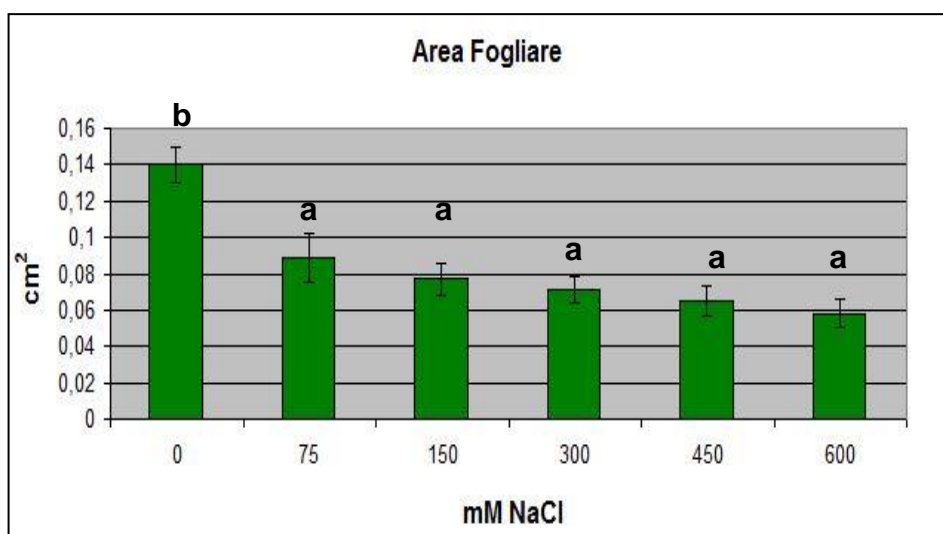


Grafico 11: misura dell'area fogliare, dopo 30gg, in correlazione alla concentrazione salina; **Figura 31:** immagine delle foglie raccolte e misurate di *L. cordatum* dal controllo fino alla concentrazione massima dopo 30 giorni di trattamento.

Area Fogliare *L. cordatum* a 60 giorni

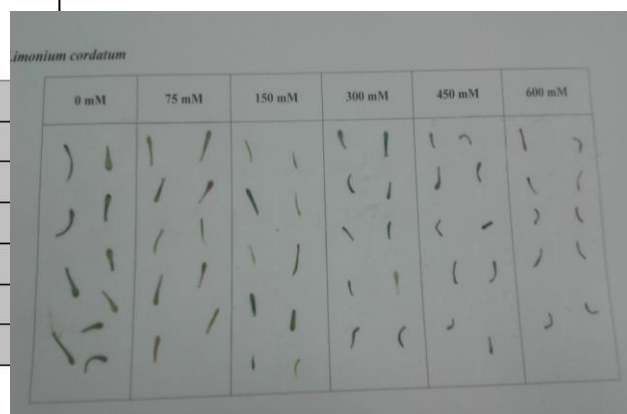
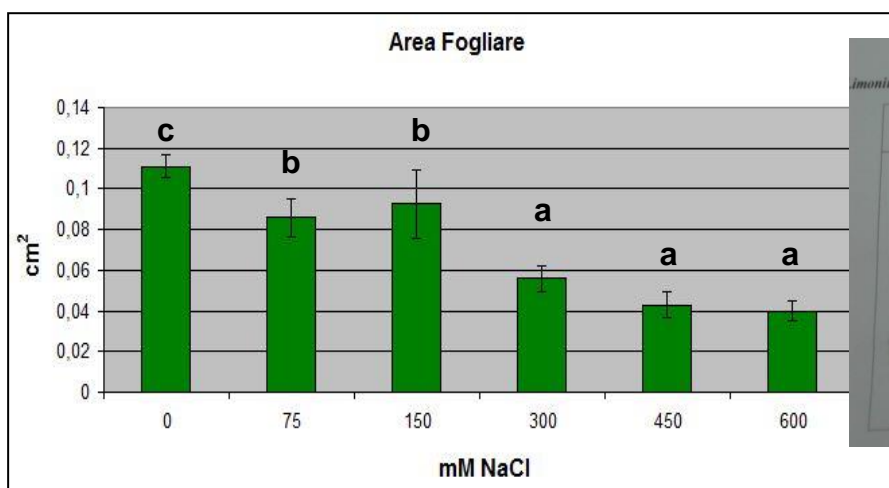


Grafico 12: misura dell'area fogliare, dopo 60gg, in correlazione alla concentrazione salina; **Figura 32:** immagine delle foglie raccolte e misurate di *L. cordatum* dal controllo fino alla concentrazione massima dopo 60 giorni di trattamento.

Riguardo agli esperimenti di radicazione effettuati alternando la presenza-assenza di NaCl nel terreno di coltura, i dati ottenuti permettono di definire che nessuna delle due specie abbia prodotto radici. *L. cordatum* mostra una sopravvivenza non particolarmente elevata (Grafico 13A), che a tutte le concentrazioni rimane costante attorno al 70%; il numero di foglie e l'altezza degli espianti (Grafico 13B-C) mostrano come ci siano differenze significative tra il controllo e le tre concentrazioni saline testate; per il peso fresco (Grafico 13D), invece si ha un andamento decrescente dal controllo fino alla concentrazione salina massima di 600 mM NaCl.

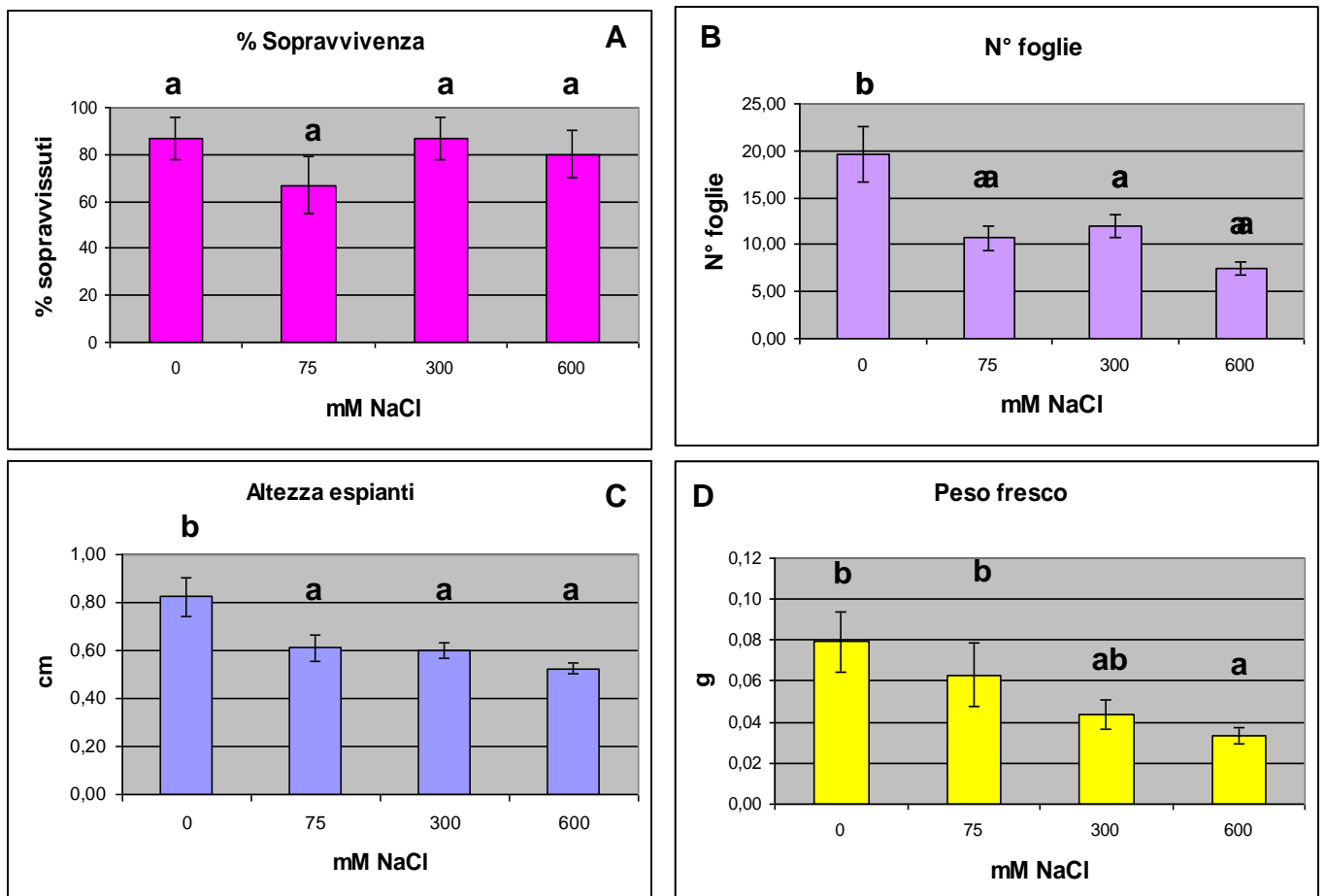


Grafico 13: grafici delle medie di parametri morfologici di *L. cordatum* a concentrazione salina crescente dopo 28 gg a settimane alterne. **A**: % di sopravvivenza; **B**: numero di foglie; **C**: altezza degli espianti; **D**: peso fresco.

Nel caso del *C. sabatius* si può notare come non ci siano degli espianti sopravvissuti alla concentrazione di 300 mM NaCl (Grafico 14A), e per le altre due concentrazioni testate, 75 mM e 150 mM, si evince come il numero delle foglie aumenti in modo significativo rispetto al controllo (Grafico 14B), l'altezza degli espianti (Grafico 14C) rimanga costante a tutte le concentrazioni saline, come l'andamento del peso fresco (Grafico 14D).

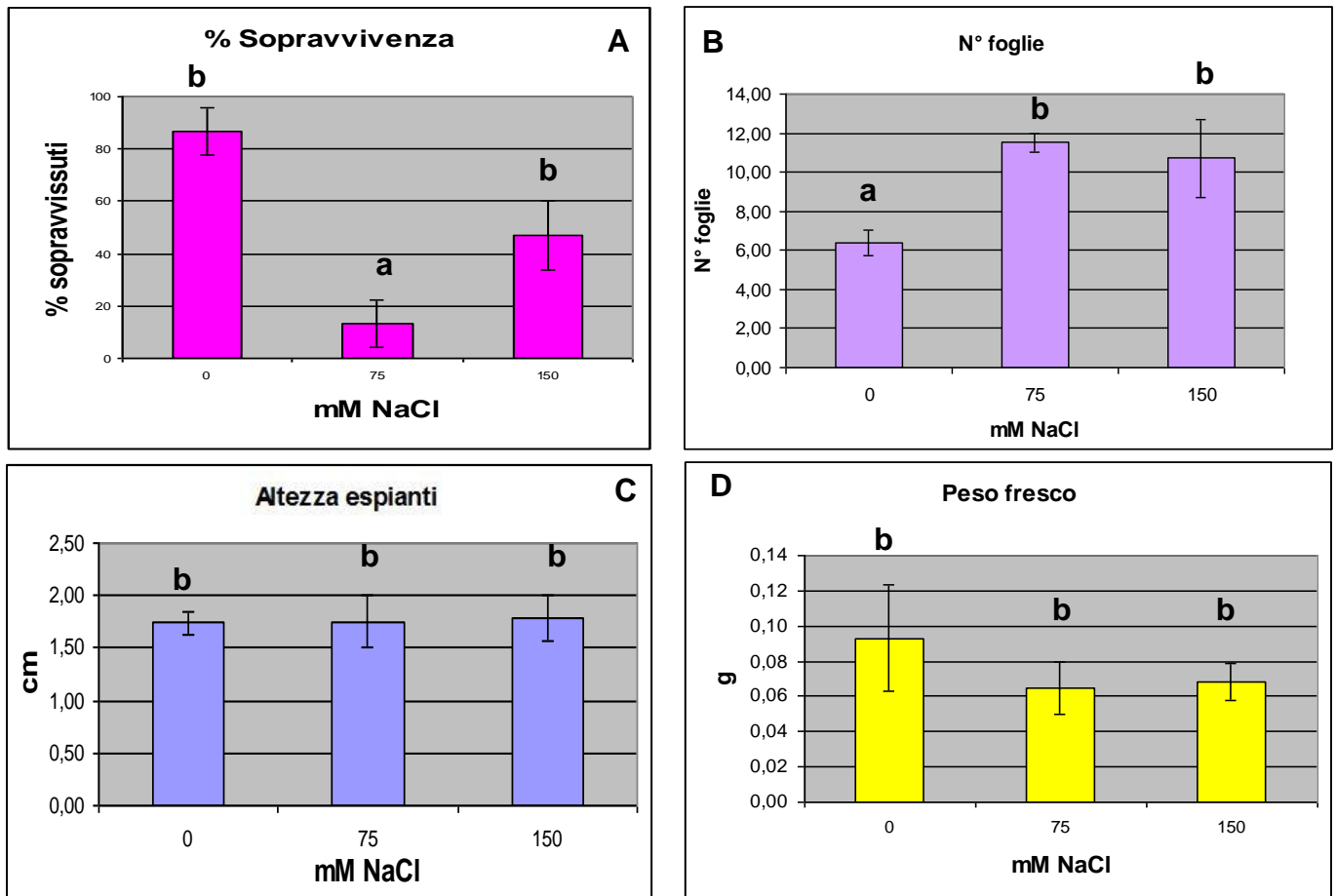


Grafico 14: grafici delle medie di parametri morfologici di *C. sabatius* a concentrazione salina crescente dopo 28 gg a settimane alterne. A: % di sopravvivenza; B: numero di foglie; C: altezza degli espianti; D: peso fresco.

c) Risultati coltura *in vitro* con l'utilizzo di T.I.S. (Temporary Immersion System).

Gli esperimenti di coltura *in vitro* con l'utilizzo di bioreattori, quindi in coltura con terreno non agarizzato, hanno permesso di ottenere nuove informazioni relativamente all'effetto della coltivazione in liquido rispetto a quella classica in solido, considerando gli stessi parametri morfometrici già rilevati. I risultati mostrano per le due specie andamenti differenti a seconda della modalità di crescita (terreno liquido in contenitori RITA[®] o Plantform[™], terreno solido) come si può notare nei grafici e nelle foto sottostanti.

Limonium cordatum

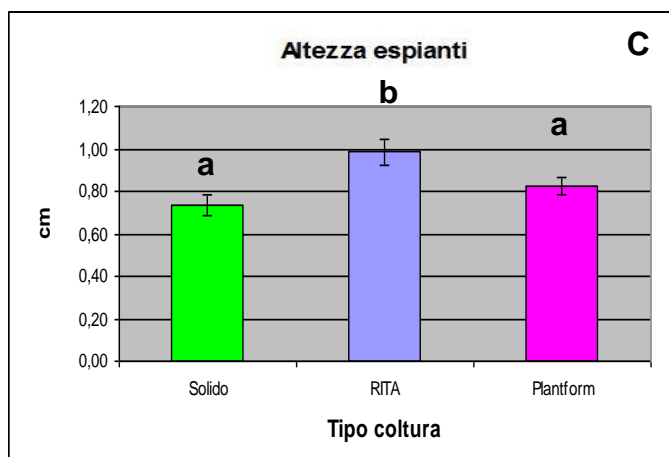
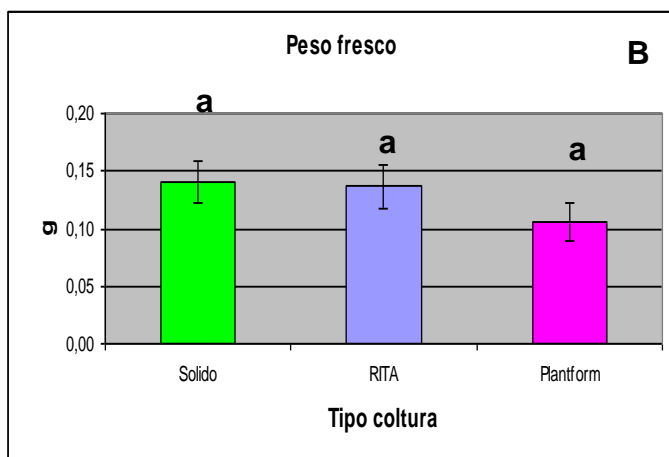
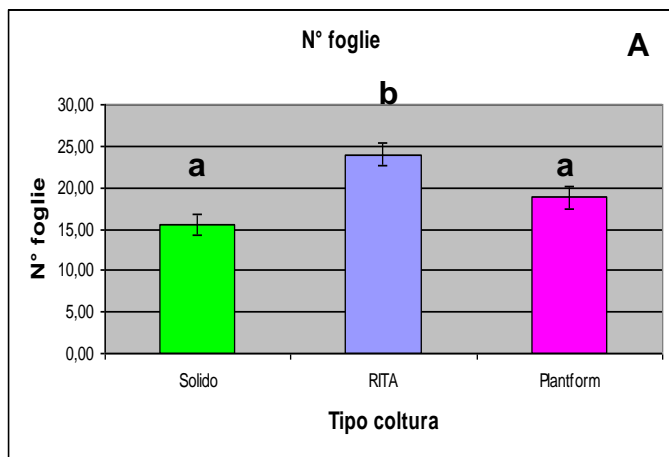


Grafico 15: all'interno dei 3 grafici sono rappresentati i valori medi dei diversi parametri confrontati con le 3 diverse modalità di coltura *in vitro* in assenza di sale, in *L. cordatum*. **A**: n medio di foglie; **B**: media dei pesi freschi; **C**: altezza media.

Convolvulus sabatius

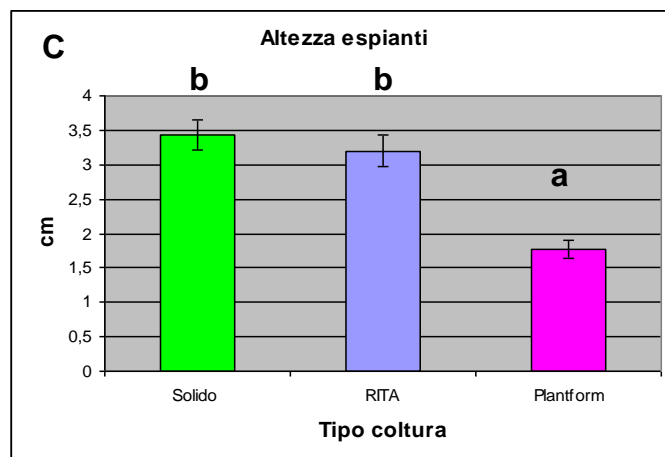
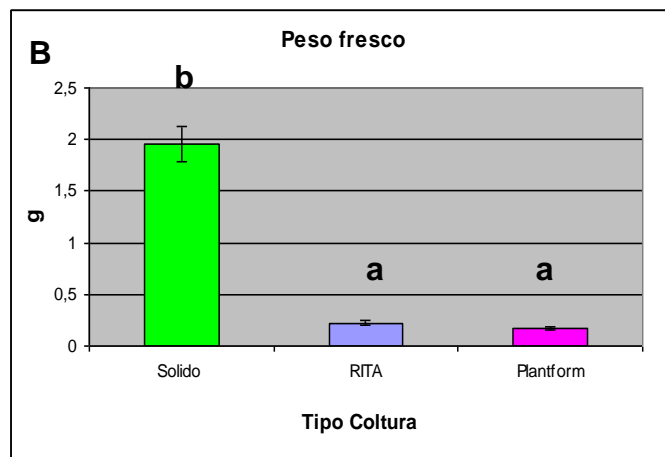
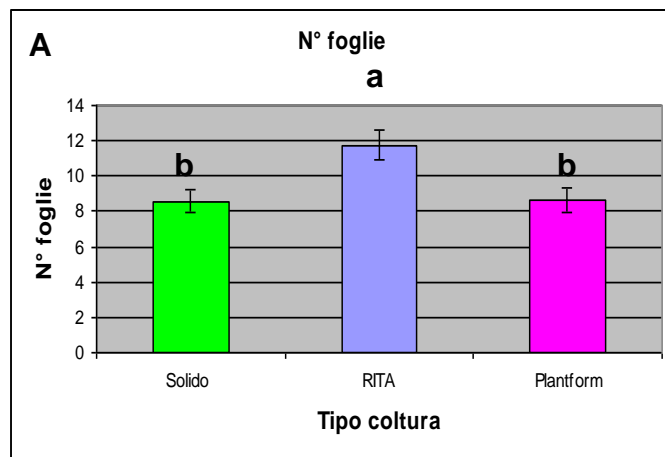


Grafico 16: all'interno dei 3 grafici sono rappresentati i valori medi dei diversi parametri confrontati con le 3 diverse modalità di coltura *in vitro* in assenza di sale, in *C. sabatius*. **A**: n medio di foglie; **B**: media dei pesi freschi; **C**: altezza media.

Relativamente alla coltura liquida di *Limonium cordatum* occorre sottolineare come già dopo 21 giorni dall'inizio dei trattamenti si siano verificati frequenti episodi di intenso inquinamento delle colture, che indicano come la coltura nelle due tipologie di bioreattori, RITA[®] e Plantform[™], non sia particolarmente indicata per questa specie. Questo nonostante un significativo aumento nel numero delle foglie e nell'altezza degli espianti ottenuto con l'utilizzo dei RITA[®] (Grafico 14A-C). Nel caso del *C. sabatius*, invece, si può notare dai grafici come la coltura su terreno liquido non sia assolutamente favorevole al suo sviluppo. Infatti, il valore del peso fresco (Grafico 15B) è sicuramente molto superiore nella coltura su terreno agarizzato, mentre gli altri parametri non mostrano differenze sostanziali. Si evidenzia peraltro una diversa morfologia fogliare legata alla coltura in liquido, particolarmente accentuata negli organismi coltivati all'interno dei Plantform[™] (Fig. 33C).

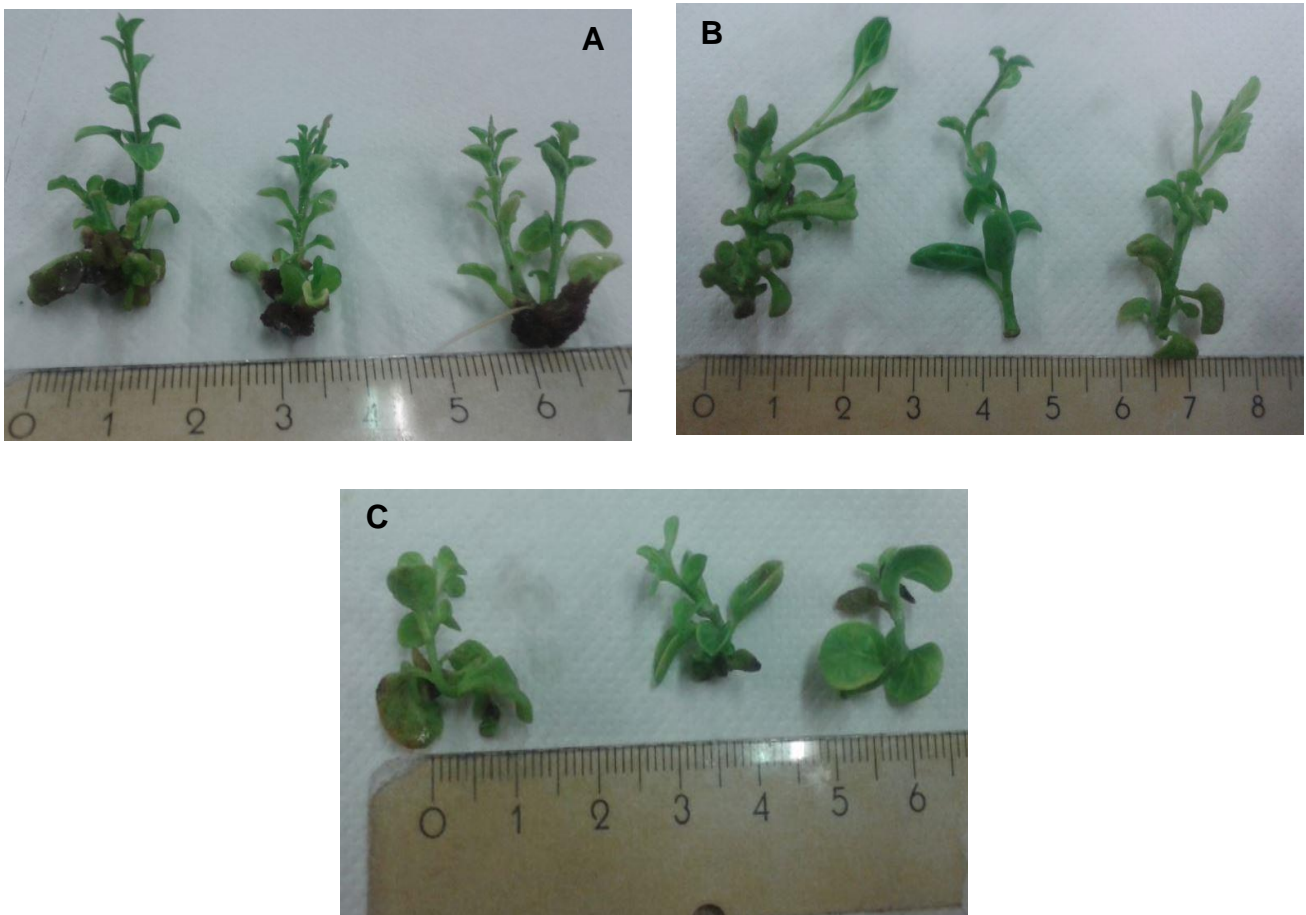


Figura 33: esempi di espianti di *C. sabatius* coltivati con le 3 tipologie di colture in vitro. **A:** espianti tratti dalla coltura solida; **B:** piantine derivate dalla coltura nei RITA[®]; **C:** piantine coltivate nei Plantform[™].

Durante il rilievo di *C. sabatius* è stato valutato anche il numero di nuovi espianti prodotti per germoglio.

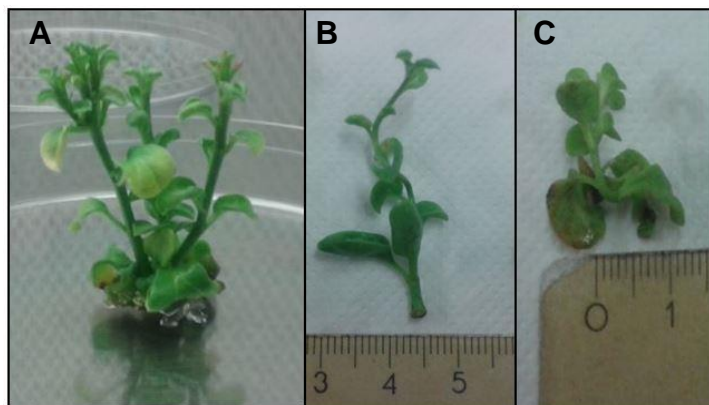
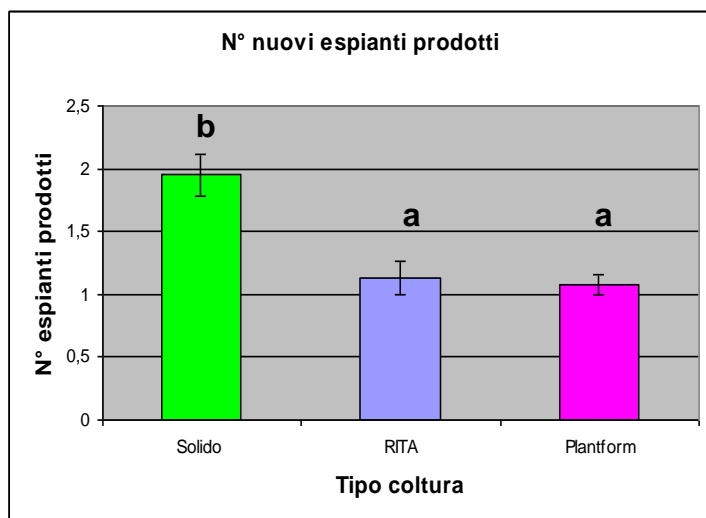


Grafico 17: confronto tra le varie tipologie di colture del numero medio di nuovi espianti prodotti; **Figura 34**: esempi di espianti coltivati su differenti substrati di crescita: **A**: terreno solido; **B**: RITA[®]; **C**: Plantform[™].

Da questi dati (Grafico 17) è possibile notare come il numero di nuovi espianti prodotti sia il doppio nella coltivazione con substrato agarizzato, come si può vedere anche dalla figura 34 (A; B; C).

Per quello che riguarda la risposta alla salinità, le colture di *L. cordatum* hanno riportato elevate contaminazioni microbiologiche (Fig. 35 A-B) che non hanno permesso di raccogliere dati sperimentali. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti esclusivamente con *C. sabatius*, confrontando la coltura su terreno non gelificato con quella su terreno agarizzato in presenza di diverse concentrazioni saline, 150 mM e 300 mM NaCl.

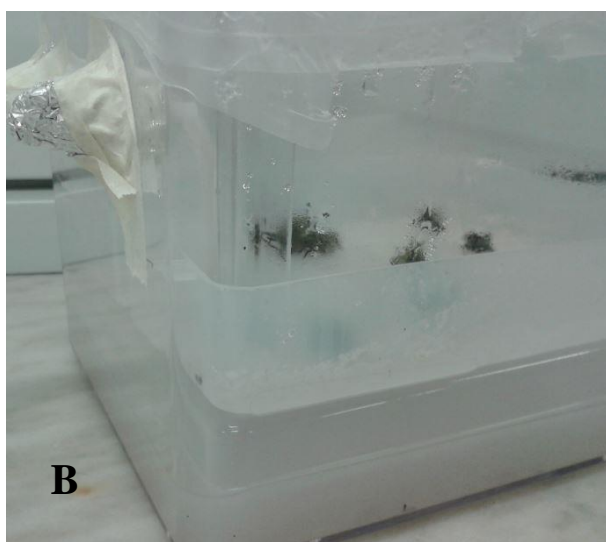
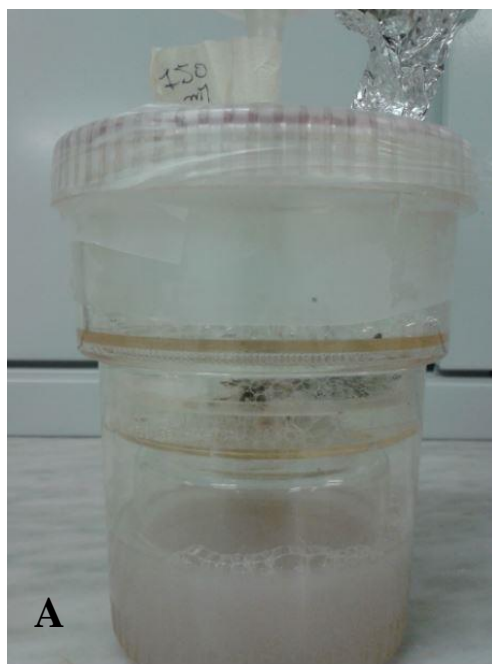


Figura 35 A: *L. cordatum* all'interno di un bioreattore RITA[®] con presenza di inquinanti; **B**: *L. cordatum* dentro un bioreattore Plantform[™] dove è evidente un inquinamento microbiologico.

Convolvulus sabatius 150 mM NaCl

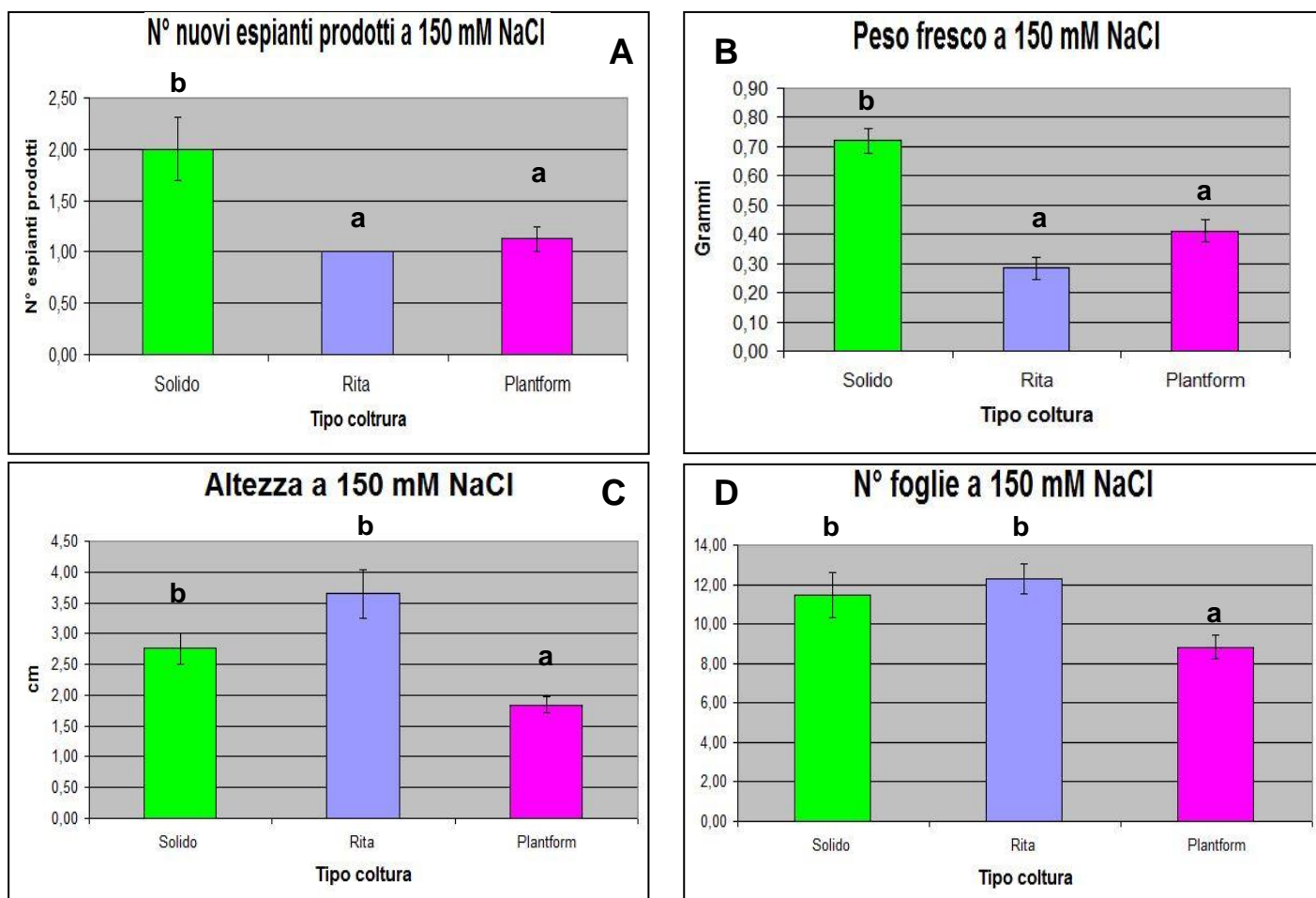


Grafico 18: all'interno dei 4 grafici sono rappresentati i valori medi dei diversi parametri confrontati con le 3 diverse modalità di coltura *in vitro* in presenza di 150 mM NaCl. **A:** n° medio di nuovi espianti prodotti; **B:** media dei pesi freschi; **C:** altezza media; **D:** n° medio di foglie prodotte.

Da questi dati (Grafico 18 A-B) è possibile notare come il numero di nuovi espianti prodotti e il peso fresco sia significativamente maggiore nella coltivazione su substrato agarizzato, mentre per gli altri parametri si ha una diminuzione significativa nella coltura all'interno dei PlantformTM (Grafico 18 C-D).

Aumentando la concentrazione salina nel substrato di coltivazione fino a 300 mM NaCl, si verifica un andamento differente per gli stessi quattro parametri misurati negli esperimenti precedenti, come mostrato dal grafico sottostante (Grafico 19).

Convolvulus sabatius 300 mM NaCl

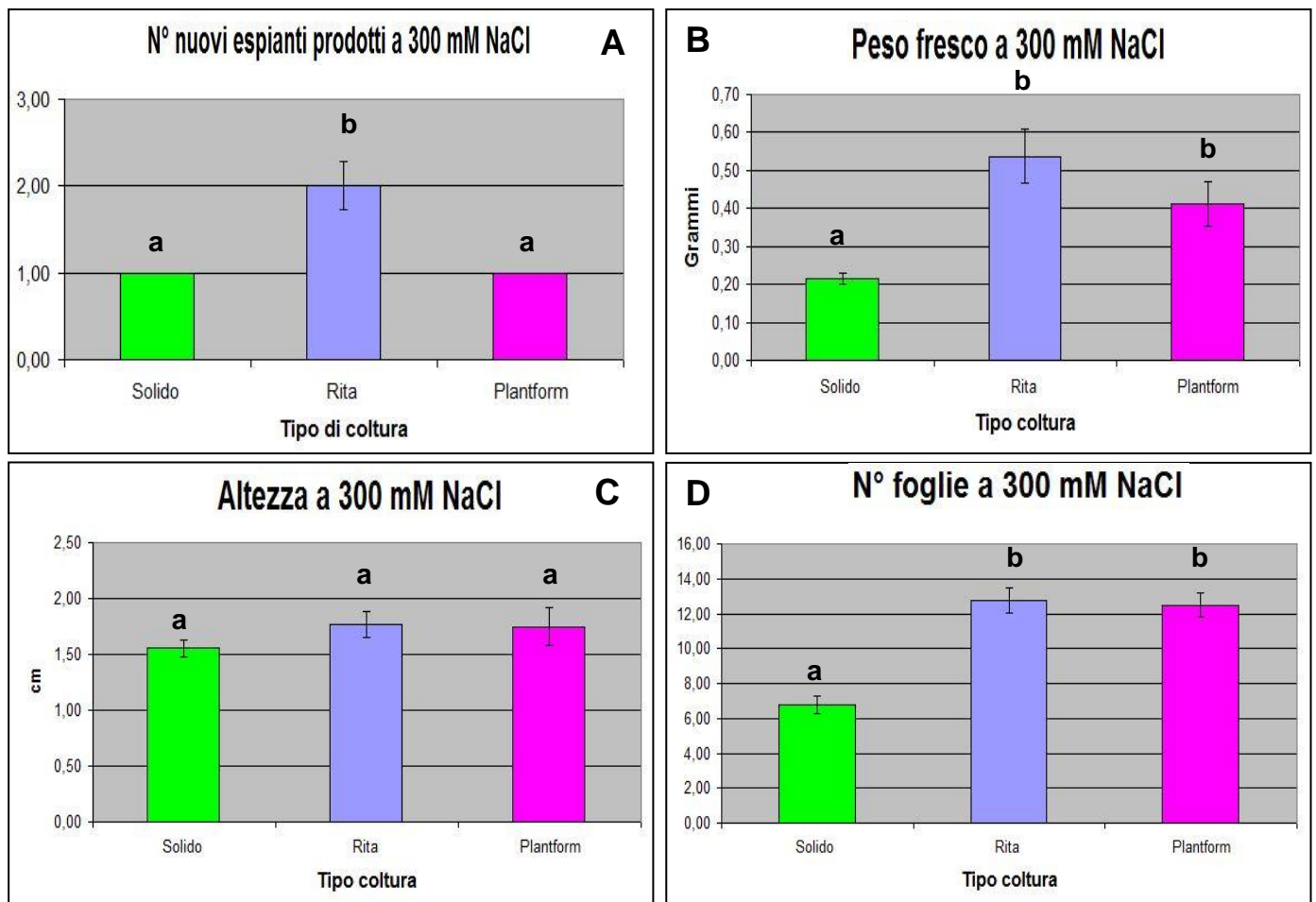


Grafico 19: all'interno dei 4 grafici sono rappresentati i valori medi dei diversi parametri confrontati con le 3 diverse modalità di coltura *in vitro* in presenza di 300 mM NaCl. **A:** n° medio di nuovi espianti prodotti; **B:** media dei pesi freschi; **C:** altezza media; **D:** n° medio di foglie prodotte.

Il peso fresco (Grafico 19-B) e il numero di foglie totali prodotte (Grafico 19-D) aumentando la concentrazione salina, risulta essere significativamente maggiore negli individui coltivati all'interno dei due bioreattori; il numero di nuovi espianti prodotti (Grafico 19-A) è più elevato solo nella coltura nei RITA[®], invece l'altezza media (Grafico 19-C) non mostra significative differenze nelle tre tipologie di colture, nonostante questi valori riportino una crescita positiva degli individui, in figura 36 si evidenzia come vi siano presenti maggiori modificazioni e danneggiamenti legati alla coltura in terreno liquido.

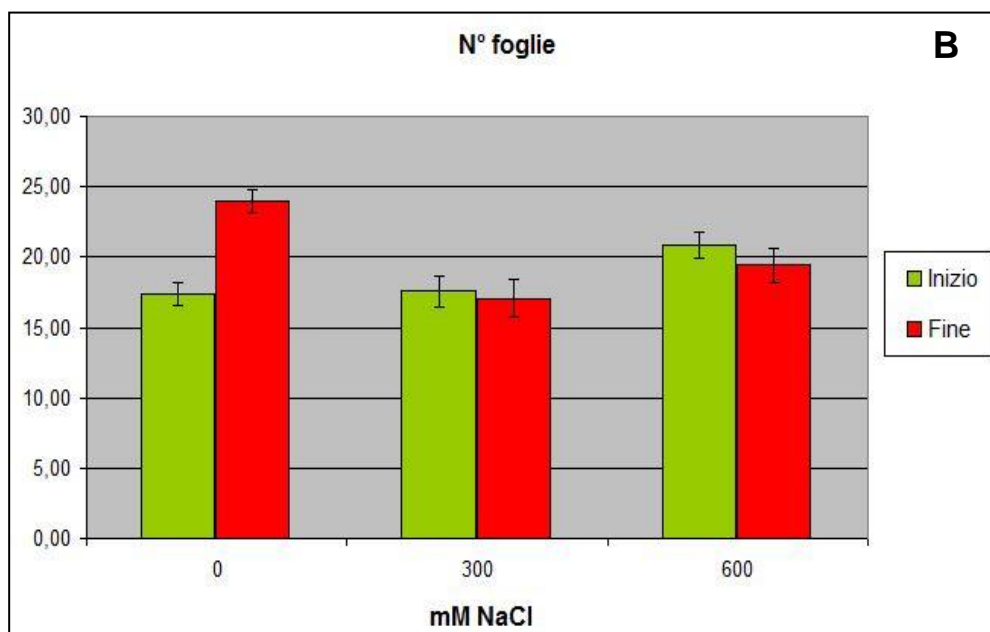
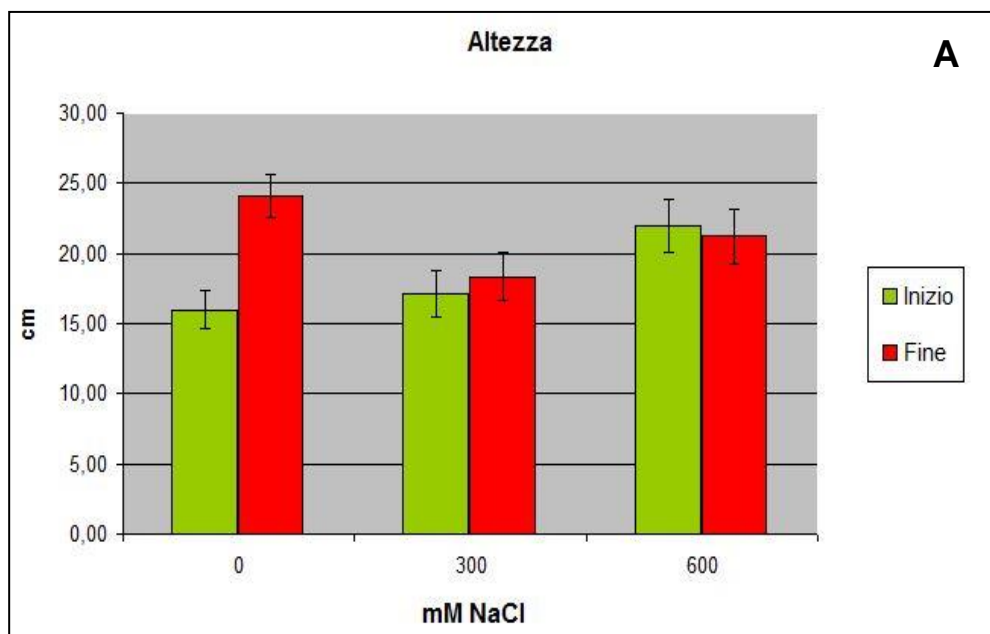


Figura 36: individui di *C. sabatius* a 300 mM NaCl nelle tre tipologie di coltura *in vitro*. **A:** solido; **B:** RITA[®]; **C:** PlantformTM

4.2 Risultati esperimenti *in vivo* su *Convolvulus sabatius*

Per quanto riguarda il primo esperimento di spruzzatura delle piantine di *C. sabatius* con soluzioni acquose a 3 concentrazioni saline, 0 mM, 300 mM e 600 mM NaCl, i risultati ottenuti non riportano differenze significative tra il controllo e le altre concentrazioni saline (dati non mostrati). Per tale ragione si è proceduto con un secondo esperimento in cui si sono annaffiati diversi individui di questa specie, alle medesime concentrazioni di NaCl utilizzate nell'esperimento precedente.

Di seguito viene riportato il grafico (Grafico 20) dei parametri di altezza media, misurata a partire dal colletto, numero medio di foglie e il numero medio di nuovi espianti prodotti, all'inizio dell'esperimento e trascorsi 30 giorni per il controllo e 300 mM NaCl, dopo 18 giorni per gli individui bagnati con acqua a 600 mM NaCl, causa elevata mortalità.



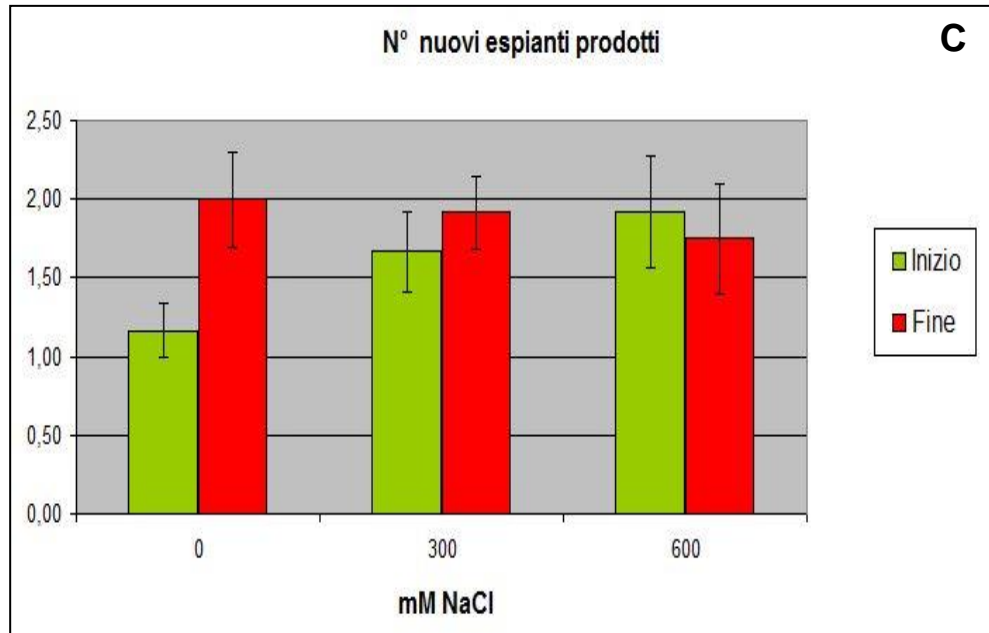


Grafico 20: i 3 grafici rappresentano i valori medi di altezza (A), numero di foglie (B) e numero nuovi espianti prodotti (C). Ogni singolo trattamento è confrontato con le medie dei valori iniziali misurati a 0 giorni di trattamento (colonne verdi) con le medie dei valori finali misurati a termine dell'esperimento (colonne rosse)

Dai grafici si evince come per gli individui annaffiati con acqua distillata a 0 mM NaCl, ci sia un netto accrescimento, infatti, i valori medi di altezza, numero di foglie e numero di nuovi espianti prodotti (Grafico 20 A-B-C) misurati all'inizio del trattamento sono inferiori rispetto a quelli rilevati trascorsi 30 giorni; invece nei casi in cui le piantine sono state annaffiate con acqua alle diverse concentrazioni di NaCl (300 mM e 600 mM) non si evidenziano aumenti rilevanti nel di crescita periodo considerato. Osservando l'immagine sottostante (Figura 37) è possibile notare come all'aumentare della concentrazioni salina, le piantine riportino una maggiore presenza di danni.

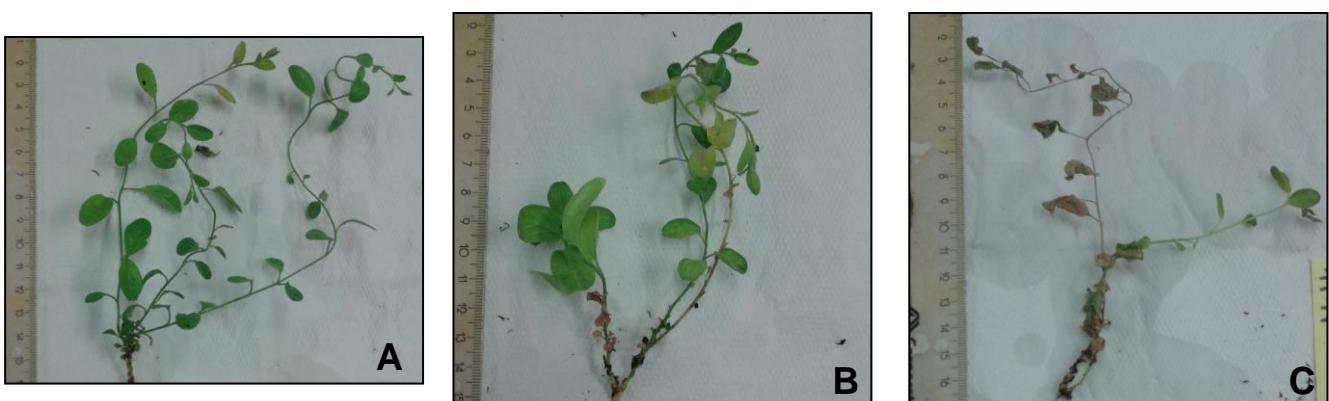


Figura 37: **A:** parte aerea di individui di *C. sabatius* annaffiati con acqua a 0 mM NaCl; **B:** parte aerea di individui di *C. sabatius* annaffiati con acqua a 300 mM NaCl; **C:** parte aerea di individui di *C. sabatius* annaffiati con acqua a 600 mM NaCl

Inoltre, è stato valutato anche il rapporto tra la parte aerea e la parte radicale, misurando il peso fresco delle radici e della parte aerea (Grafico 21).

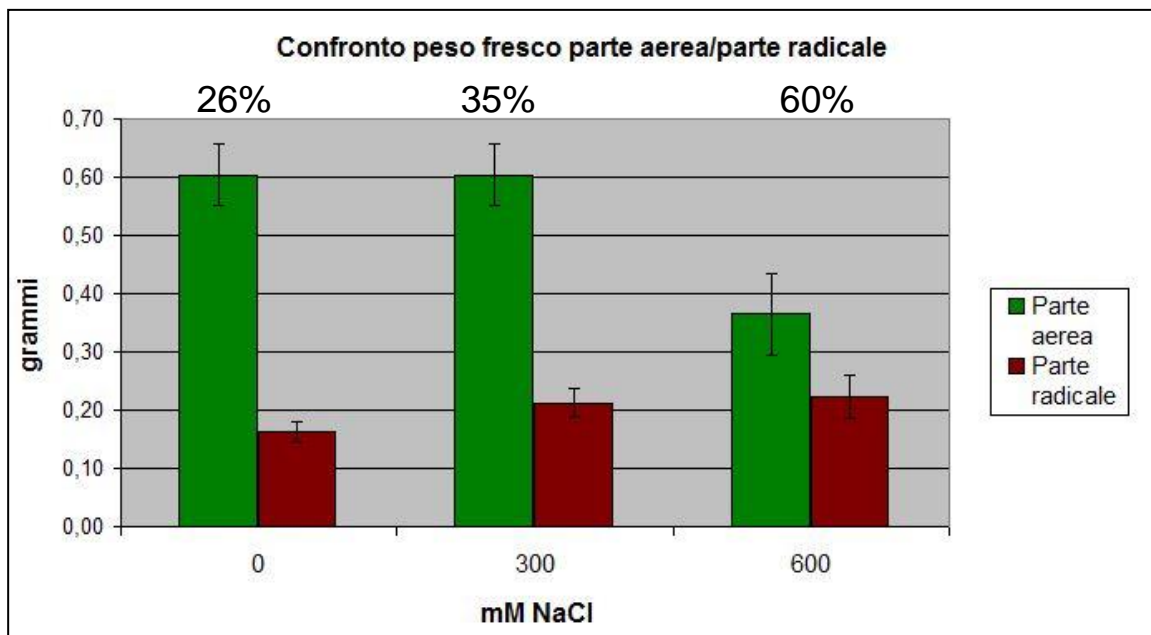


Grafico 21: rappresentazione del valore medio del peso fresco tra la parte aerea (colonne verdi) e la parte radicale (colonne marroni) in relazione all'aumento della concentrazione salina.

Da tali dati è stato possibile notare come all'aumentare della concentrazione salina ci siano delle modificazioni tra il peso fresco delle due parti, infatti, diventa evidente, alla concentrazione di 600 mM NaCl, la riduzione significativa del peso della parte aerea e un aumento del peso dell'apparato radicale; nel grafico 21 viene anche riportato in termini di percentuale il rapporto tra i due pesi, dimostrando come alla concentrazione salina più elevata, l'apparato radicale costituisca più della metà del peso dell'intera pianta (Figura 38).

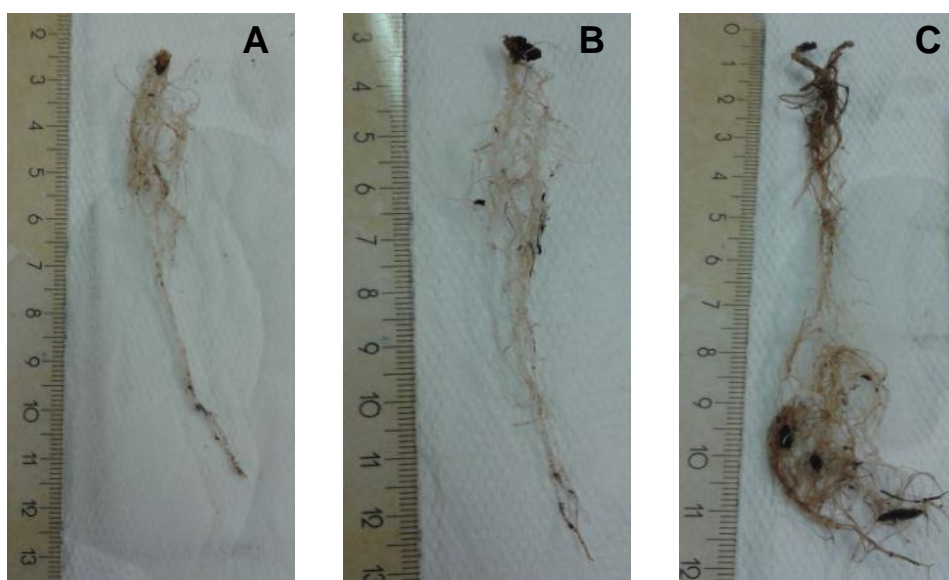


Figura 38: immagini degli apparati radicali di piantine annaffiate con acqua a diverse concentrazioni saline; A: controllo; B: 300 mM NaCl; C: 600 mM NaCl.

4.3 Risultati quantificazione della prolina.

a) Risultati esperimenti *in vitro* su substrato agarizzato su entrambe le specie.

Il primo esperimento per la quantificazione della prolina presente in organismi coltivati *in vitro* ha avuto risultati molto differenti per le due specie studiate, come è possibile osservare nel grafico sottostante (Grafico 22), che rappresenta la quantità di prolina e di amminoacidi liberi presenti dopo 30 giorni di trattamento a diverse concentrazioni saline.

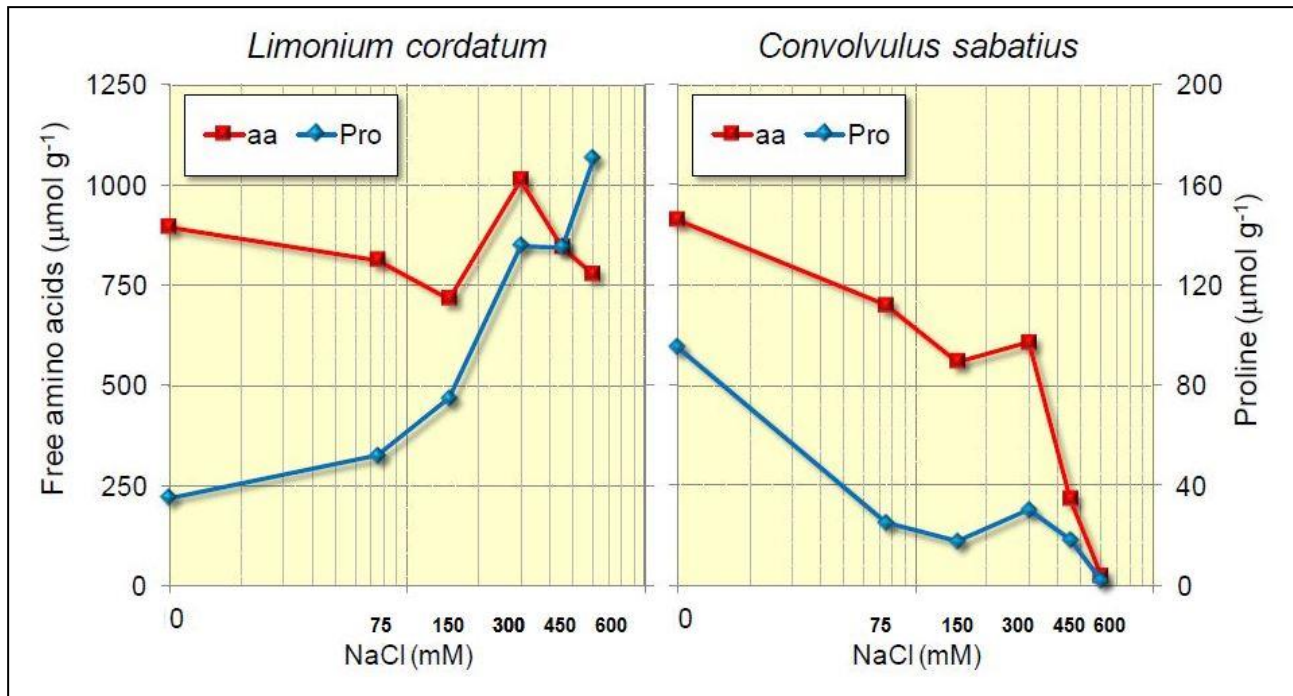


Grafico 22: andamento del contenuto in prolina libera e in amminoacidi totali in *L. cordatum* (a destra) e *C. sabatius* (a sinistra), all'aumentare della concentrazione salina dopo 30 giorni. La linea blu rappresenta la quantità di prolina, la cui scala di riferimento è sulla destra; la linea rossa rappresenta gli amminoacidi totali, la cui scala di riferimento è sulla sinistra.

Dal grafico è possibile notare come le due specie producano prolina in quantità differenti, infatti, il *L. cordatum* all'aumentare della concentrazione salina, mostra un accumulo di prolina (linea blu) e un accumulo di amminoacidi liberi (linea rossa); nel caso del *C. sabatius* non si verifica un accumulo di prolina all'aumentare della concentrazione salina che risulta diminuire al controllo fino ad essere pari a zero alla concentrazione massima di 600 mM NaCl. Lo stesso andamento si ritrova per la quantificazione degli altri amminoacidi liberi presenti con un netto calo dal controllo alla concentrazione più elevata.

Nell'esperimento successivo si è proceduto a mantenere la concentrazione salina fissa, 300 mM NaCl per *L. cordatum* e 75 mM NaCl per *C. sabatius* ed il quantitativo in prolina e amminoacidi liberi è stato misurato ogni 5 giorni, ottenendo i risultati riportati nel grafico 23.

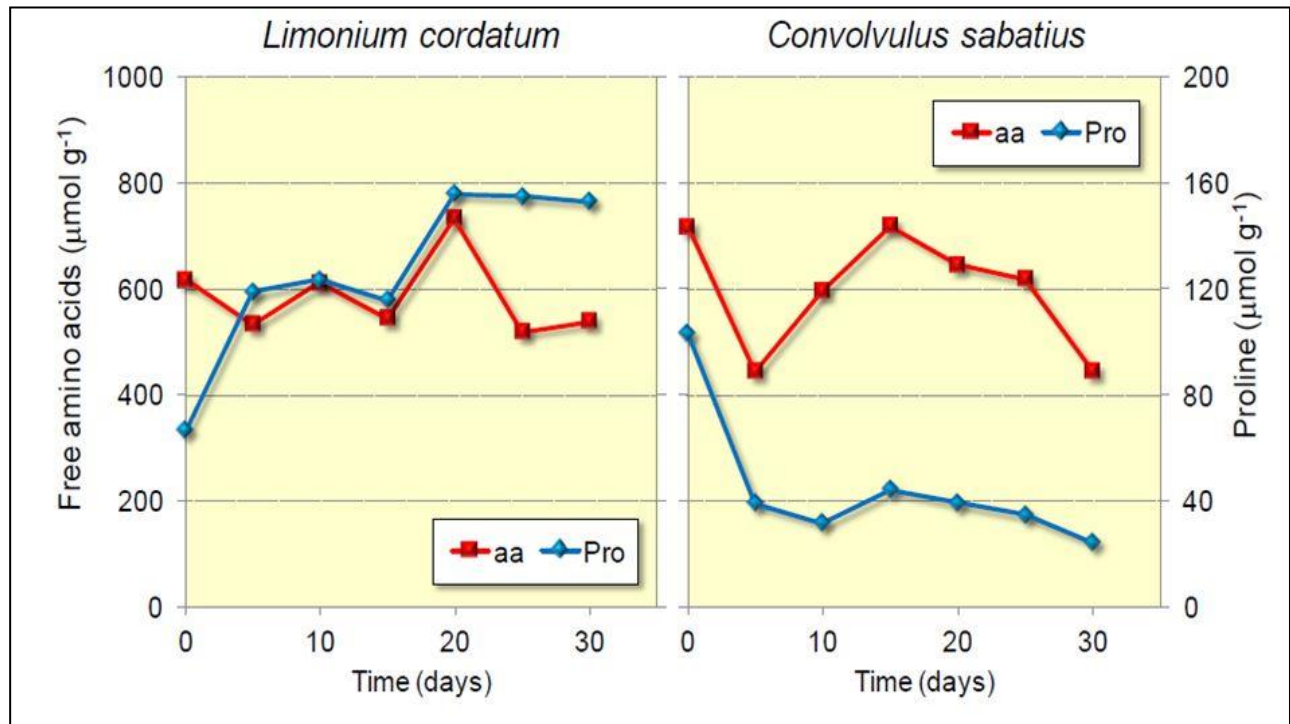


Grafico 23: andamento del contenuto in prolina libera e in amminoacidi totali in *L. cordatum* (a destra) e *C. sabatius* (a sinistra), ogni 5 giorni a concentrazione salina costante. La linea blu rappresenta la quantità di prolina, la cui scala di riferimento è sulla destra; la linea rossa rappresenta gli amminoacidi totali, la cui scala di riferimento è sulla sinistra.

I risultati rappresentati nel grafico 23 evidenziano, anche in questo esperimento, il differente accumulo di prolina nelle due specie, dove è possibile notare come il *L. cordatum* abbia una produzione di prolina crescente in relazione al tempo di permanenza dello stress salino, come avviene per gli amminoacidi totali presenti; al contrario nel caso del *C. sabatius* è presente un accumulo di prolina al tempo zero che va a diminuire dopo i primi 5 giorni di stress salino, rimanendo pressoché costante fino ai 30 giorni. Si evidenzia il differente accumulo degli amminoacidi totali presenti in *C. sabatius*, che in questo esperimento risultano subire un aumento nei primi 15 giorni di trattamento, dopo i quali la produzione totale diminuisce.

b) Risultati esperimenti *in vitro* con substrato liquido su *C. sabatius*.

Ulteriori indagini sul quantitativo di prolina e amminoacidi liberi presenti nelle parti aeree del *C. sabatius* si sono effettuate su individui coltivati nei bioreattori, RITA[®] e Plantform[™], i cui risultati hanno evidenziato lo stesso andamento ottenuto nel primo esperimento svolto su *C. sabatius in vitro* su terreno agarizzato con concentrazioni saline differenti (Grafico 24).

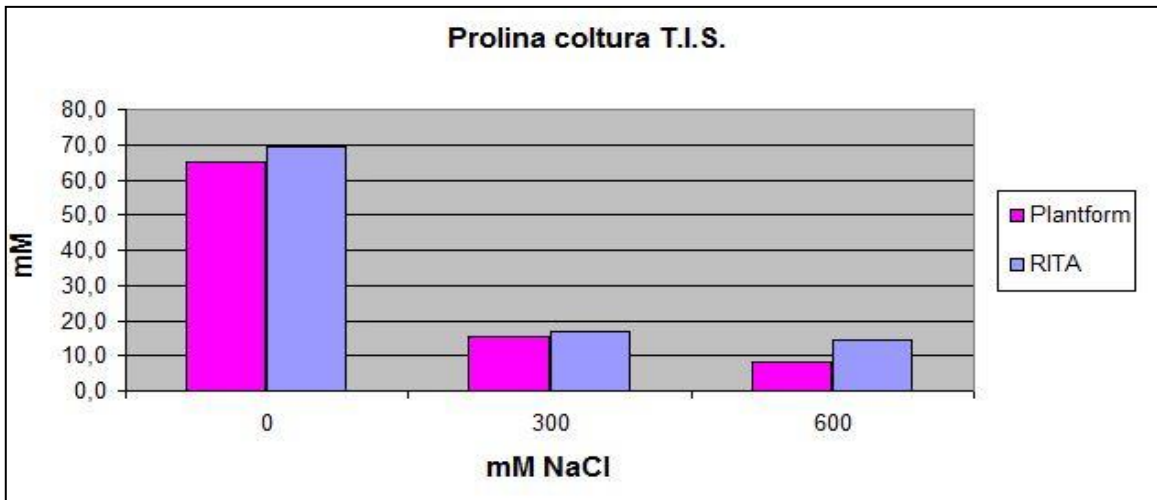


Grafico 24: accumulo di prolina in coltura T.I.S. nei due bioreattori a diverse concentrazioni saline dopo 30 giorni di trattamento: in rosa il valore medio ottenuto dagli individui coltivati all'interno dei PlantformTM; in viola sono rappresentati i valori medi degli individui coltivati all'interno dei RITA[®].

Nel grafico 24 vengono riportati i valori medi dell'accumulo in prolina estratta da individui coltivati su substrato liquido, dopo 30 giorni di stress salino a tre concentrazioni, 0 mM, 300 mM e 600 mM NaCl. In entrambe i bioreattori utilizzati, l'andamento dell'accumulo di prolina risulta essere uguale, infatti, vi è una forte produzione di questo amminoacido nel controllo, che cala drasticamente negli individui coltivati in presenza di sale. Nel grafico 25 sono rappresentati i valori medi degli amminoacidi totali presenti negli individui coltivati in coltura T.I.S. La produzione degli amminoacidi risulta elevata in assenza di sale in entrambi i contenitori, diminuisce all'aumentare della concentrazione salina, tranne che nel bioreattore RITA[®], dove aumenta in modo evidente alla concentrazione di 600 mM NaCl.

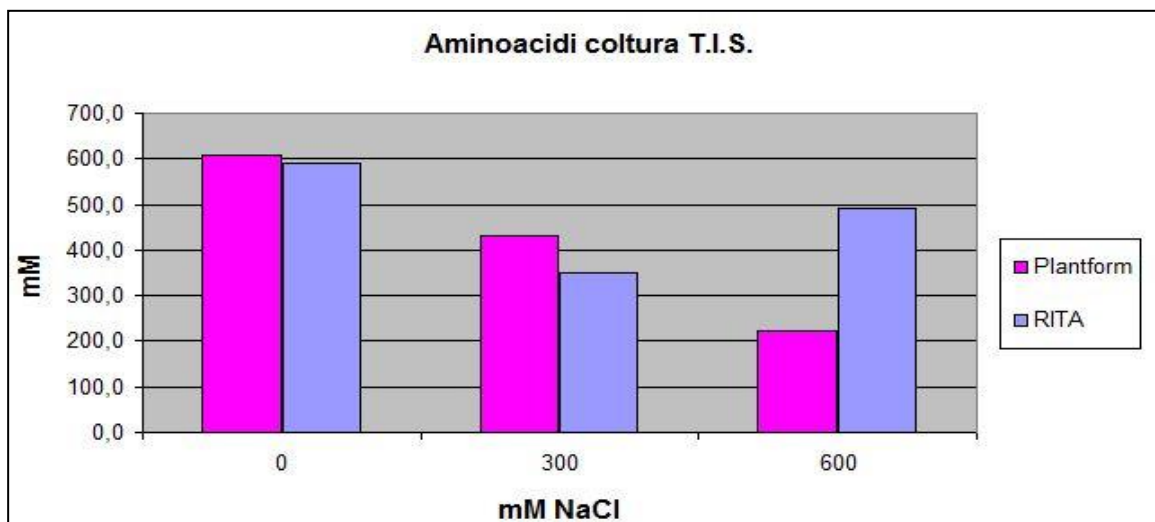


Grafico 25: accumulo di amminoacidi liberi in coltura T.I.S. nei due bioreattori a diverse concentrazioni saline dopo 30 giorni di trattamento: in rosa il valore medio ottenuto dagli individui coltivati all'interno dei PlantformTM; in viola sono rappresentati i valori medi degli individui coltivati all'interno dei RITA[®].

c) Risultati esperimenti *in vivo* su *C. sabatius*.

La quantificazione della prolina e degli amminoacidi presenti in *C. sabatius* coltivato *in vivo* ha mostrato differenze di accumulo in base all'organo da cui si è effettuata l'estrazione della prolina (Grafico 26).

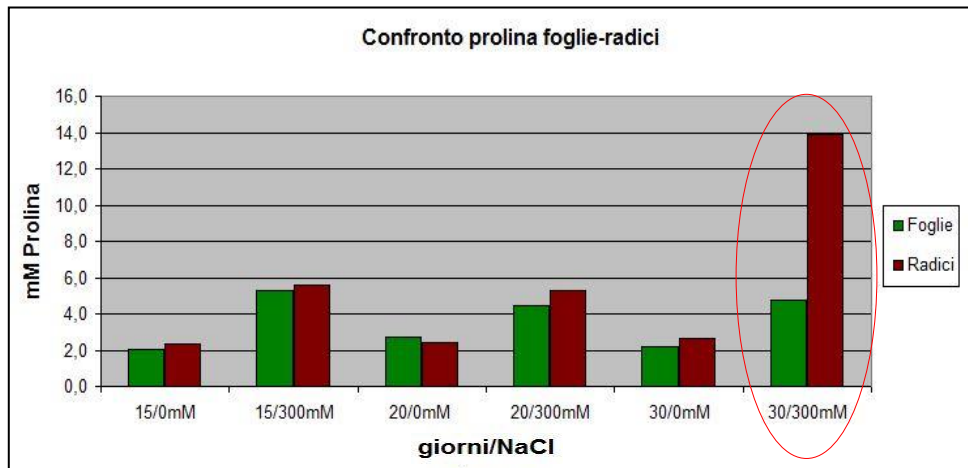


Grafico 26: valori medi dell'accumulo in prolina a diversi giorni e a diverse concentrazioni, in due porzioni della pianta: la parte aerea (colonne verdi) confrontato con l'apparato radicale (colonne marroni).

Nel grafico 26 è evidente come la produzione di prolina in *C. sabatius* è perlopiù uguale sia nelle radici sia nella parte aerea, dopo i primi 20 giorni di trattamento, nel controllo e alla concentrazione di 300 mM NaCl. Una differenza notevole si riscontra raggiunti i 30 giorni di irrigazione con acqua alla concentrazione di 300 mM NaCl, dove l'accumulo di prolina risulta maggiore all'interno dell'apparato radicale rispetto alla parte aerea, che non rileva differenze di accumulo al trascorrere del tempo. Per quanto riguarda gli amminoacidi totali liberi (Grafico 27), si registra un elevato contenuto a livello della porzione aerea a seguito del trattamento salino ad ogni intervallo di tempo considerato, senza sostanziali differenze eventualmente dettate dalla durata della somministrazione. Mentre a livello della porzione radicale l'accumulo risulta considerevole solo dopo 30 giorni di trattamento.

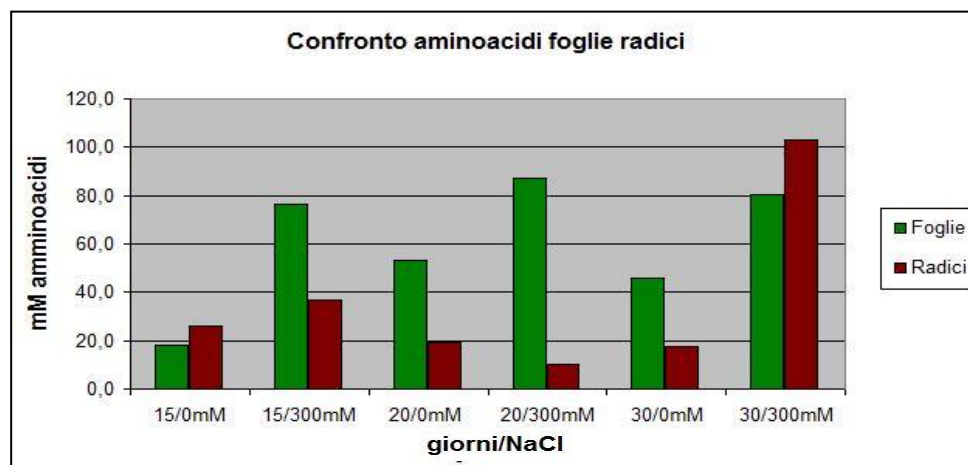


Grafico 27: valori medi dell'accumulo in amminoacidi a diversi giorni e a diverse concentrazioni, in due porzioni della pianta: la parte aerea (colonne verdi) confrontato con l'apparato radicale (colonne marroni).

4.4 Risultati analisi morfologiche all'ESEM in entrambe le specie cresciute sia *in vivo* sia *in vitro*.

a) *Limonium cordatum*

Campioni fogliari di *L. cordatum* prelevati *in vivo* in località Capo Noli (SV) e/o provenienti da organismi coltivati *in vitro* in presenza delle diverse concentrazioni saline sono stati analizzati tramite ESEM. I campioni prelevati *in vivo* provengono da due diverse situazioni ambientali: A) roccia a strapiombo, esposta agli aerosol marini; B) zona più riparata dal mare, distante circa 50 m dallo strapiombo (a bordo strada) (Fig. 39).

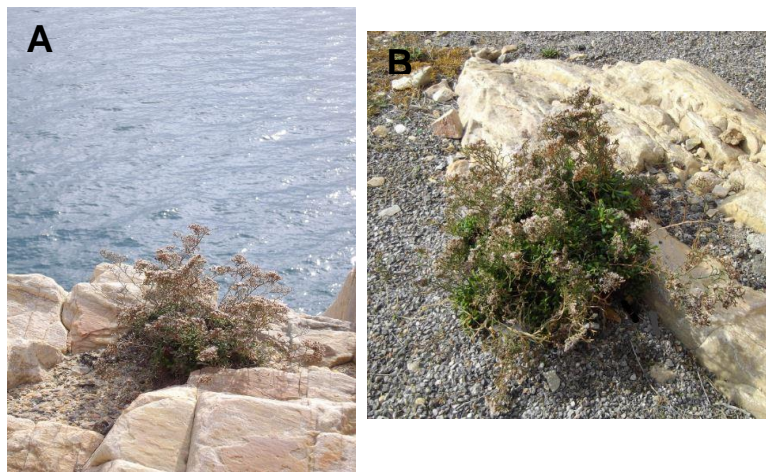


Figura 39: individui di *L. cordatum* in due situazioni ambientali differenti. A: molto esposto agli aerosol marini; B: distante dallo strapiombo di circa 50 mt.

In entrambi i campioni analizzati, si è osservata la presenza di numerose ghiandole deputate all'accumulo e all'escrezione del sale, superfici fogliari ricche di tricomi, che circondano le ghiandole e stomi evidenti (Fig. 40).

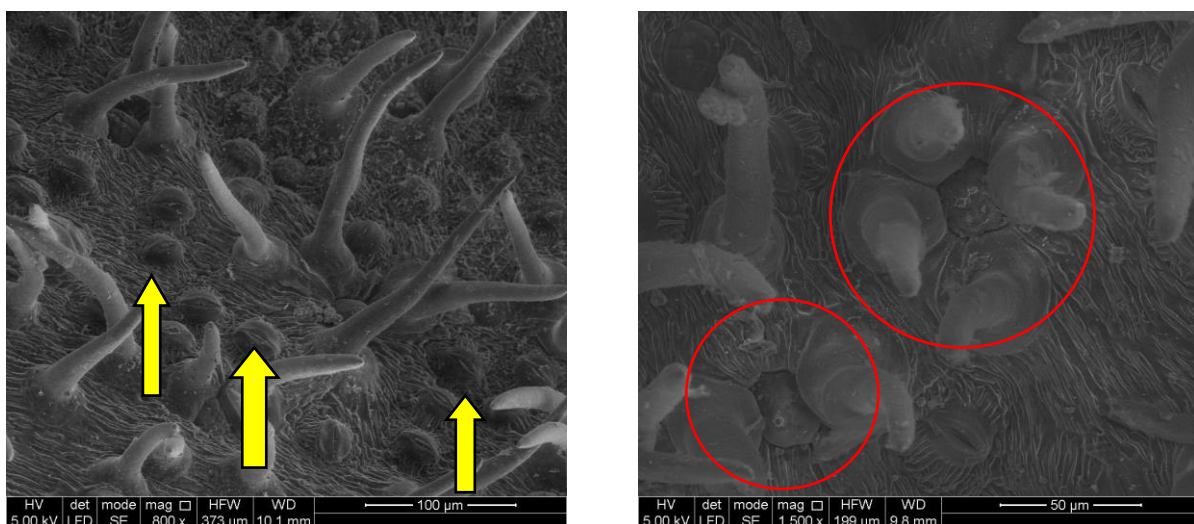


Figura 40: immagini al microscopio elettronico a scansione di *L. cordatum* prelevato *in loco*. Sono evidenti le formazioni tricotiche, le ghiandole deputate all'accumulo del sale (cerchi rossi) e gli stomi (freccie gialle).

Interessanti differenze si sono osservate nell'organizzazione della struttura fogliare interna del campione di *L. cordatum* esposto agli aerosol marini (Fig. 41) rispetto al campione prelevato a breve distanza dallo strapiombo di roccia (Fig. 42).

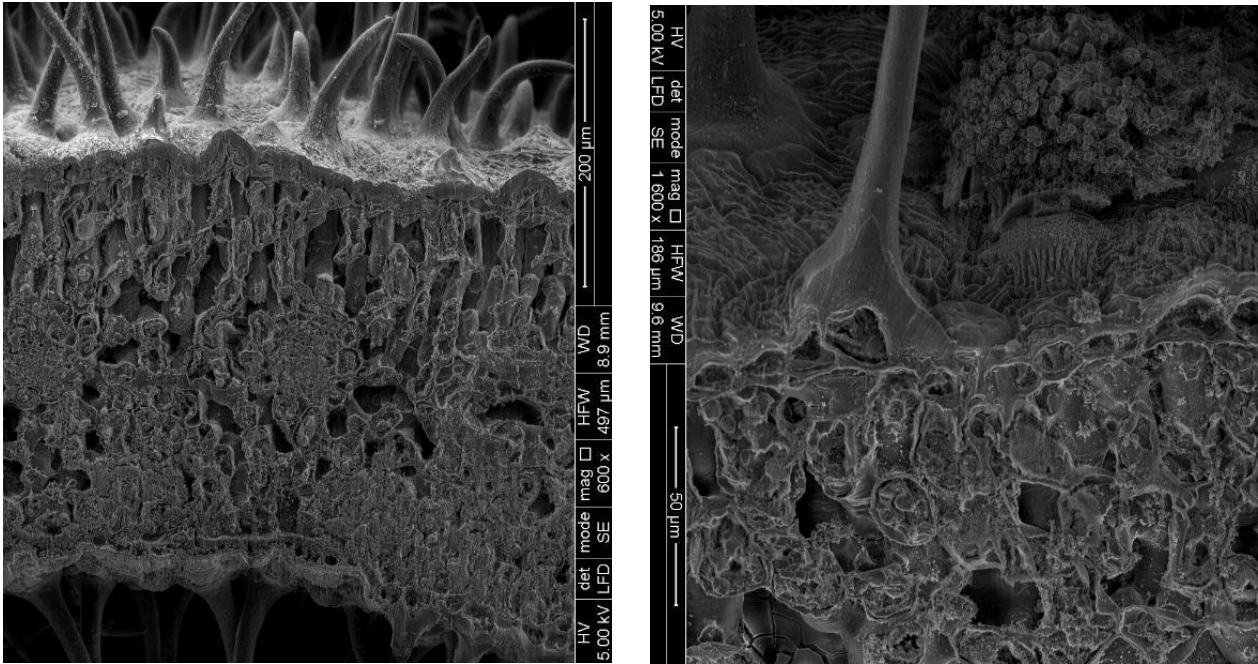


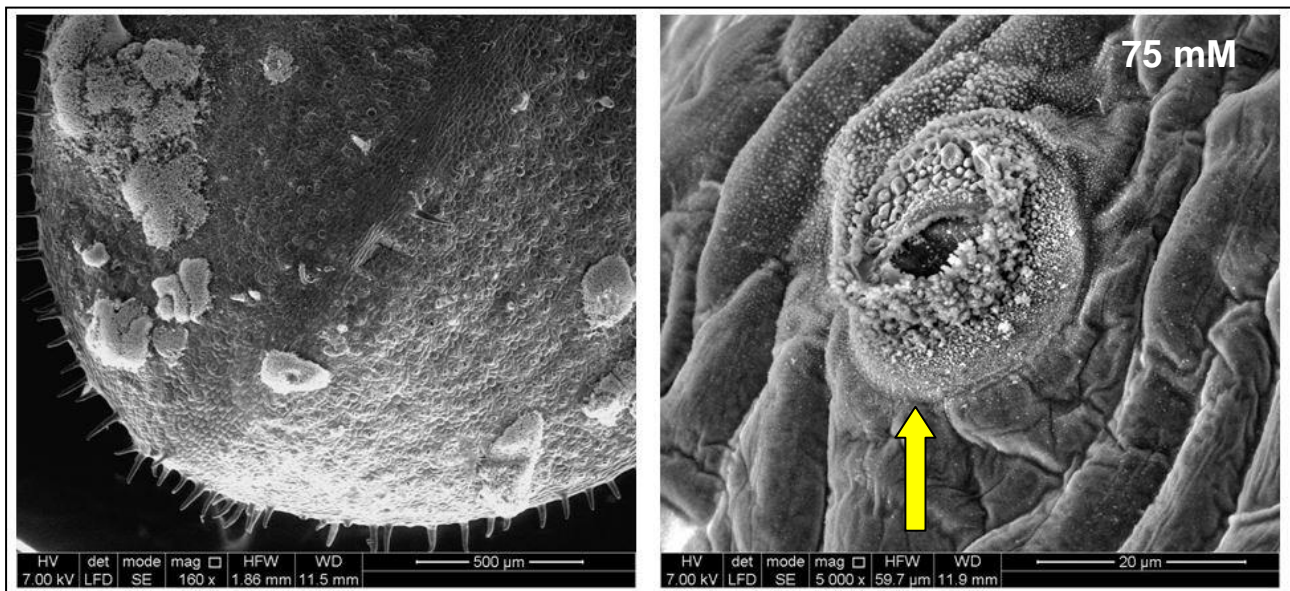
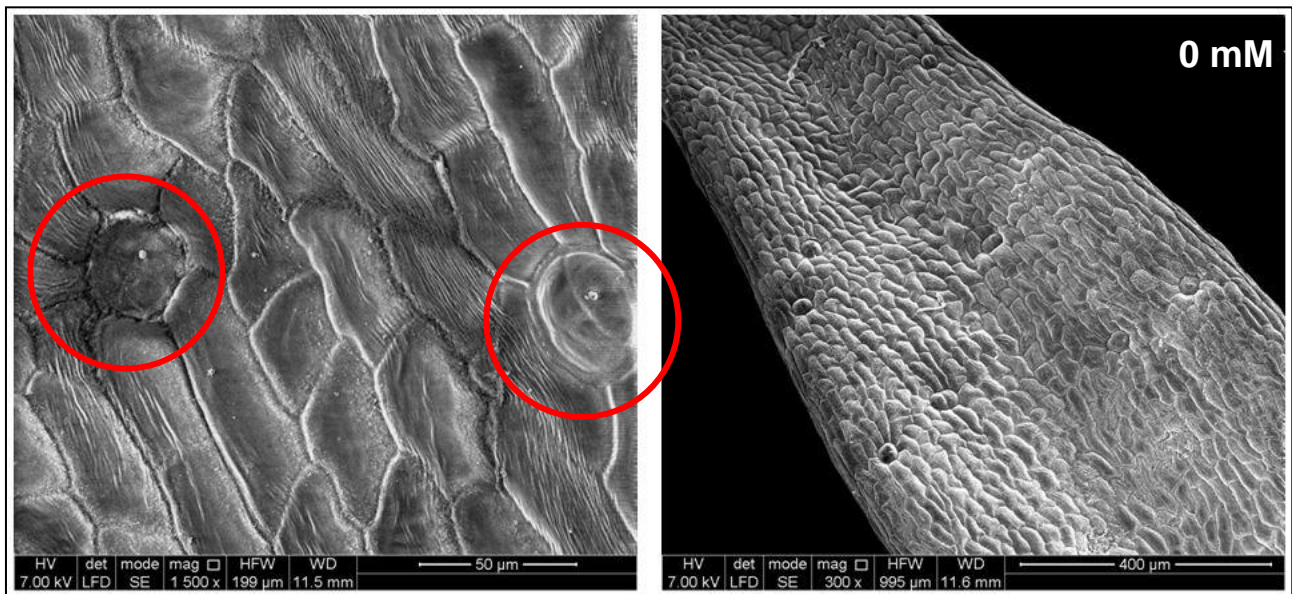
Figura 41: immagini al microscopio elettronico a scansione di *L. cordatum* prelevato in località Capo Noli (SV) sulla roccia, esposto agli spruzzi marini.

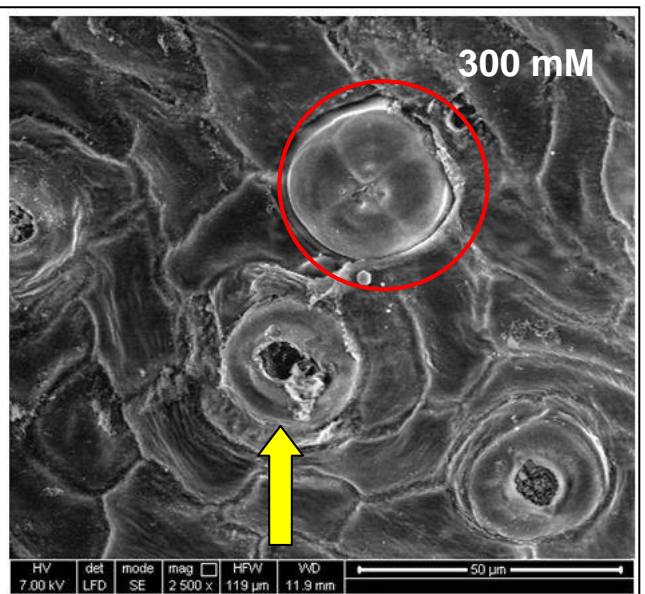
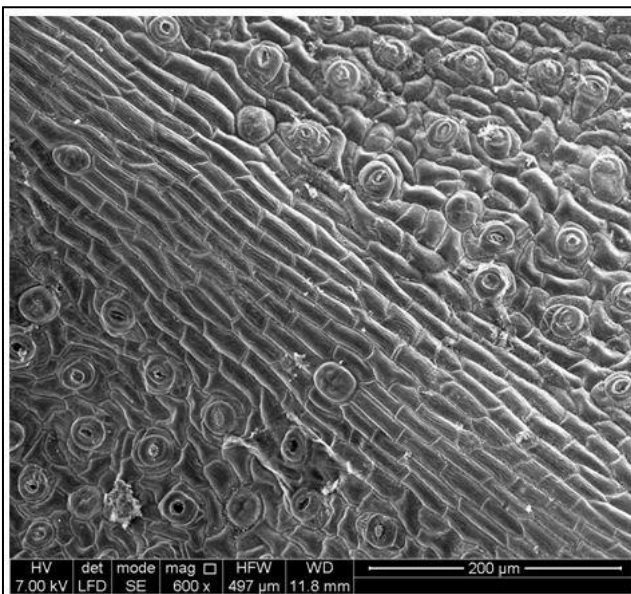
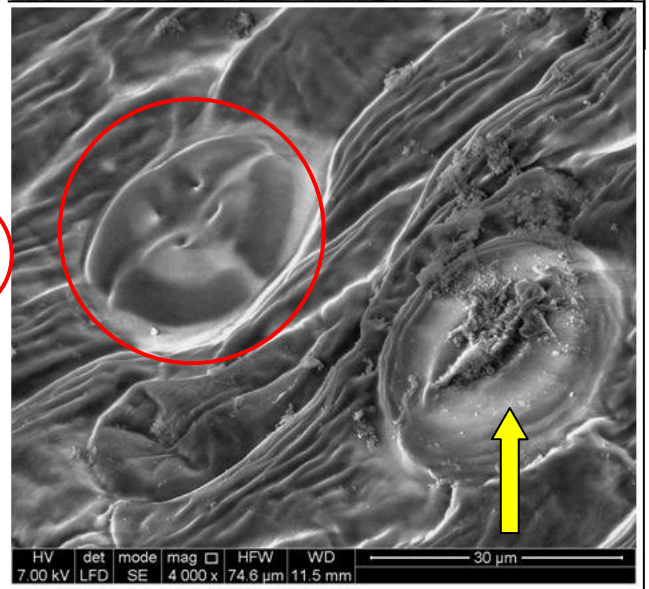
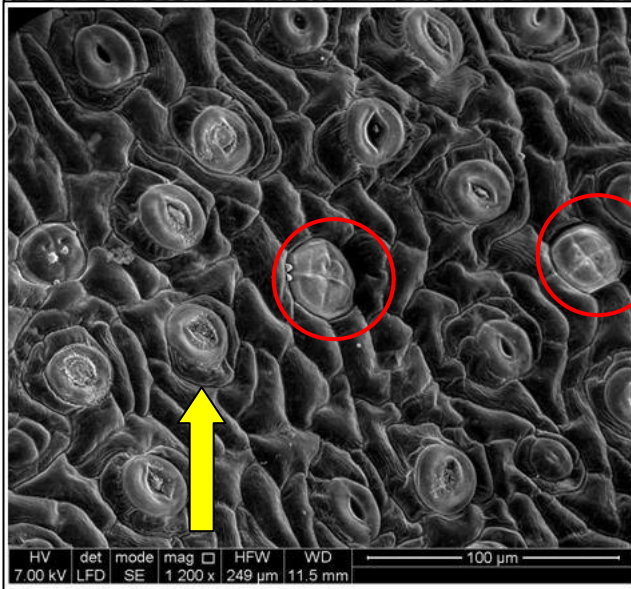
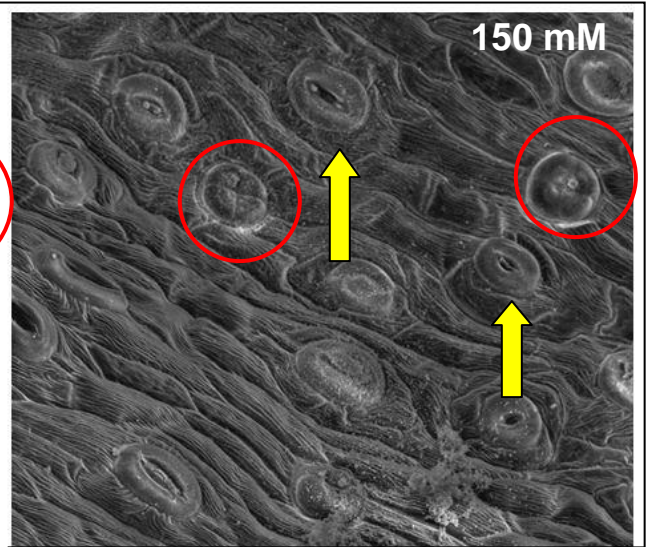
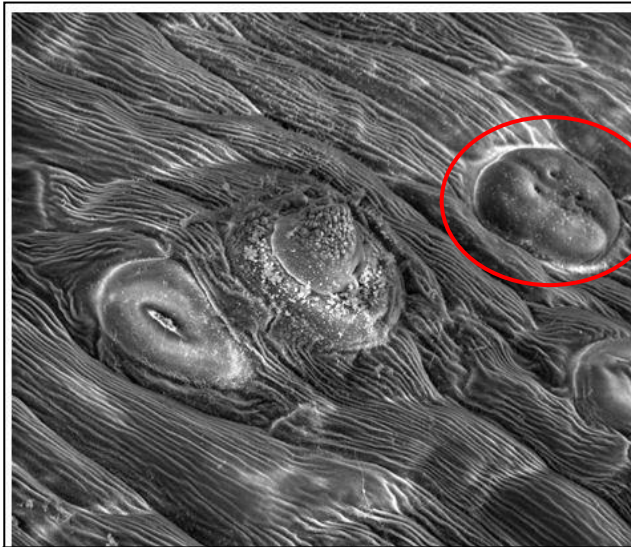


Figura 42: immagini al microscopio elettronico a scansione di *L. cordatum* prelevato in località Capo Noli (SV) a 50 mt di distanza dalla roccia e dal mare.

Dalle immagini sopra riportate è evidente come l'anatomia interna della foglia sia molto differente a seconda dell'esposizione delle piantine agli aerosol marini. Infatti, nel campione prelevato da individui distanti dal mare, si riconosce la nervatura centrale della foglia, il tessuto a palizzata a contatto con l'epidermide della pagina superiore e il tessuto lacunoso a contatto con l'epidermide della pagina inferiore (Fig. 42). Al contrario, nei campioni prelevati da individui esposti al mare l'anatomia interna della foglia appena descritta non è più chiaramente riconoscibile e una sorta di matrice indefinita occupa e riempie gli spazi.

Ulteriori immagini sono quelle ottenute dai campioni fogliari provenienti da individui coltivati *in vitro* a diverse concentrazioni saline, 0 mM, 75 mM, 150 mM, 300 mM, 450 mM e 600 mM NaCl (Fig. 43).





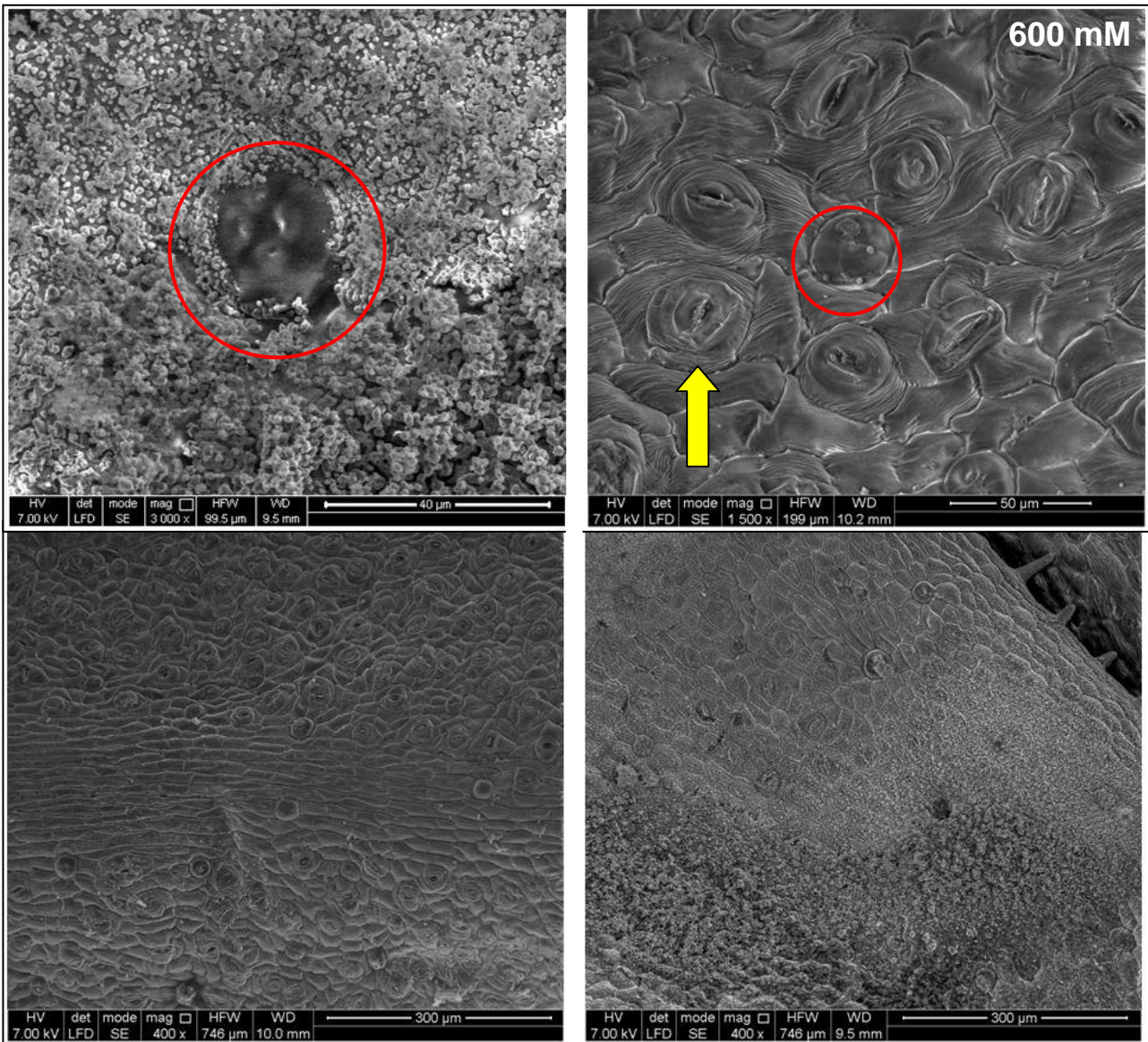
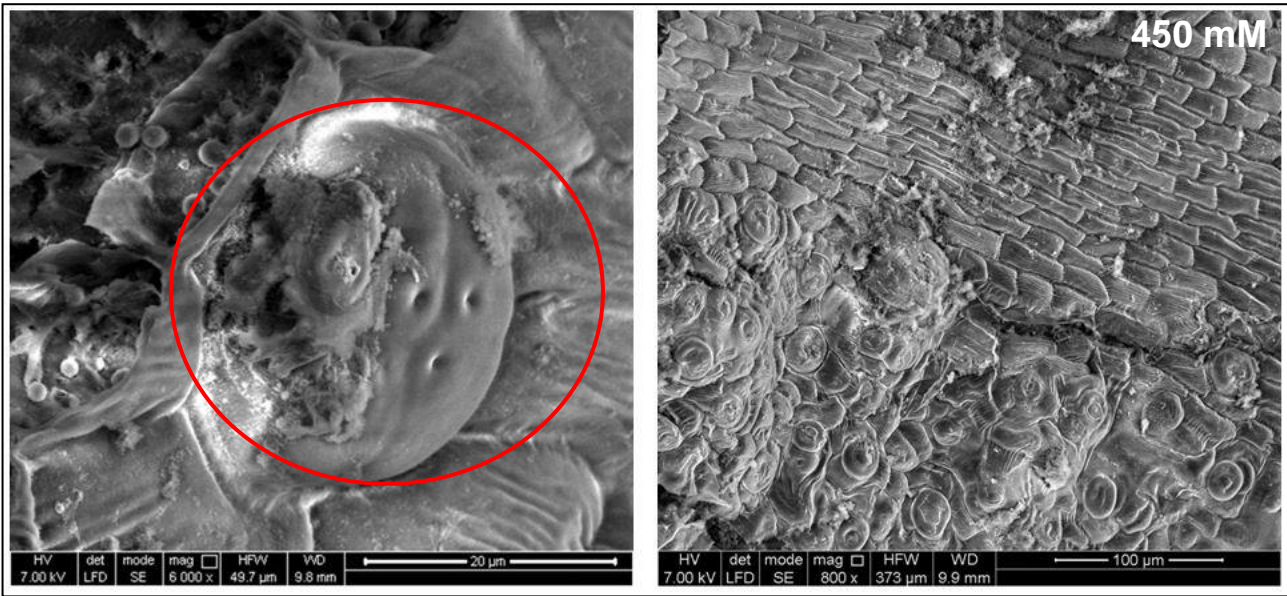


Figura 43: immagini al microscopio elettronico a scansione di campioni fogliari di *L. cordatum* proveniente da coltura *in vitro* a diverse concentrazioni saline: 0 mM, 75 mM, 150 mM, 300 mM, 450 mM, 600 mM NaCl. Cerchi rossi: ghiandole del sale; frecce gialle: stomi

Nelle immagini sopra riportate (Fig. 43) la prima differenza evidente tra i campioni prelevati in natura e i campioni provenienti dalla coltura *in vitro* è la mancanza di tricomi sulla superficie fogliare dei campioni sottoposti ai trattamenti *in vitro*. Le ghiandole deputate all'accumulo del sale sono costitutivamente presenti, in assenza di stress salino non sono turgide, mentre la superficie fogliare è libera da escrescenze. All'aumentare della concentrazione salina presente nel terreno di coltura le ghiandole si inturgidiscono, gli stomi aperti partecipano al processo di espulsione, mentre la superficie fogliare risulta sempre più incrostata e ricoperta da concrezioni saline.

b) Convolvulus sabatius

Come per la specie precedente sono stati prelevati dei campioni fogliari da individui situati in situazioni ambientali differenti: A) pianta esposta agli aerosol marini, B) pianta più riparata, distante dalla rupe di circa 50 m (Fig. 44).



Figura 44: individui di *C. sabatius* in due situazioni ambientali differenti. A: molto esposto agli aerosol marini; B: distante dallo strapiombo di circa 50 m.

In questo caso, non sono state rilevate differenze tra gli individui cresciuti sulla roccia esposta agli aerosol marini e quelli meno esposti, recuperati distanti dal mare (Fig. 45).

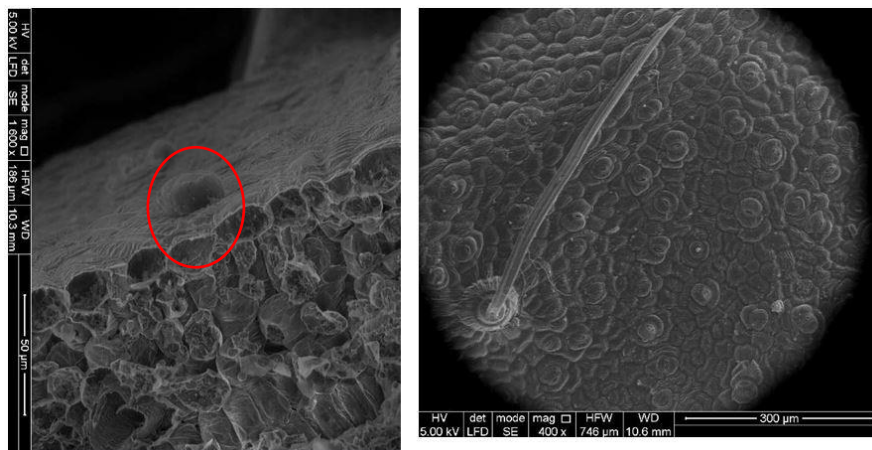


Figura 45: immagini al microscopio elettronico a scansione di *C. sabatius* prelevato in località Capo Noli (SV) sulla roccia, esposto agli spruzzi marini. Cerchio rosso: ghiandola del sale.

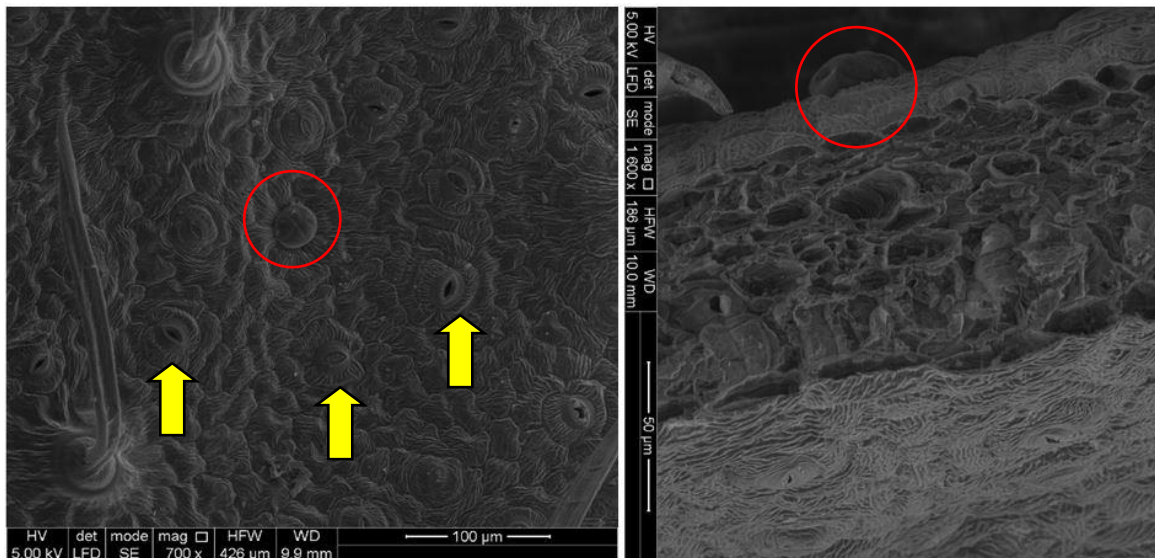
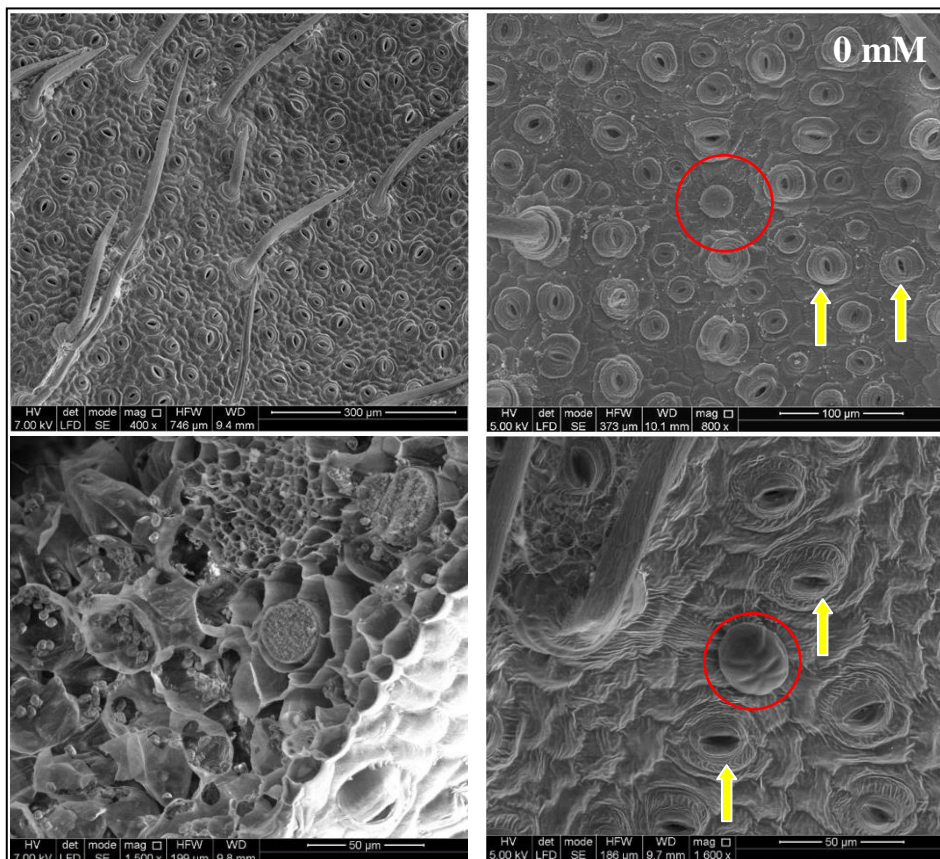


Figura 46: immagini al microscopio elettronico a scansione di *C. sabattius* prelevato in località Capo Noli (SV) a 50 mt di distanza dalla roccia e dal mare. Cerchi rossi: ghiandole del sale; frecce gialle: stomi

Nei due campioni fogliari prelevati in località Capo Noli (SV), è possibile individuare sulla superficie fogliare la presenza di tricomi, ghiandole deputate all'accumulo del sale e stomi; nelle sezioni trasversali è evidente come non ci siano differenze nell'organizzazione cellulare all'interno delle foglie dei due individui.

Ulteriori immagini sono quelle ottenute dai campioni fogliari provenienti da individui coltivati *in vitro* a diverse concentrazioni saline, 0 mM, 75 mM, 150 mM, 300 mM NaCl (Fig. 47).



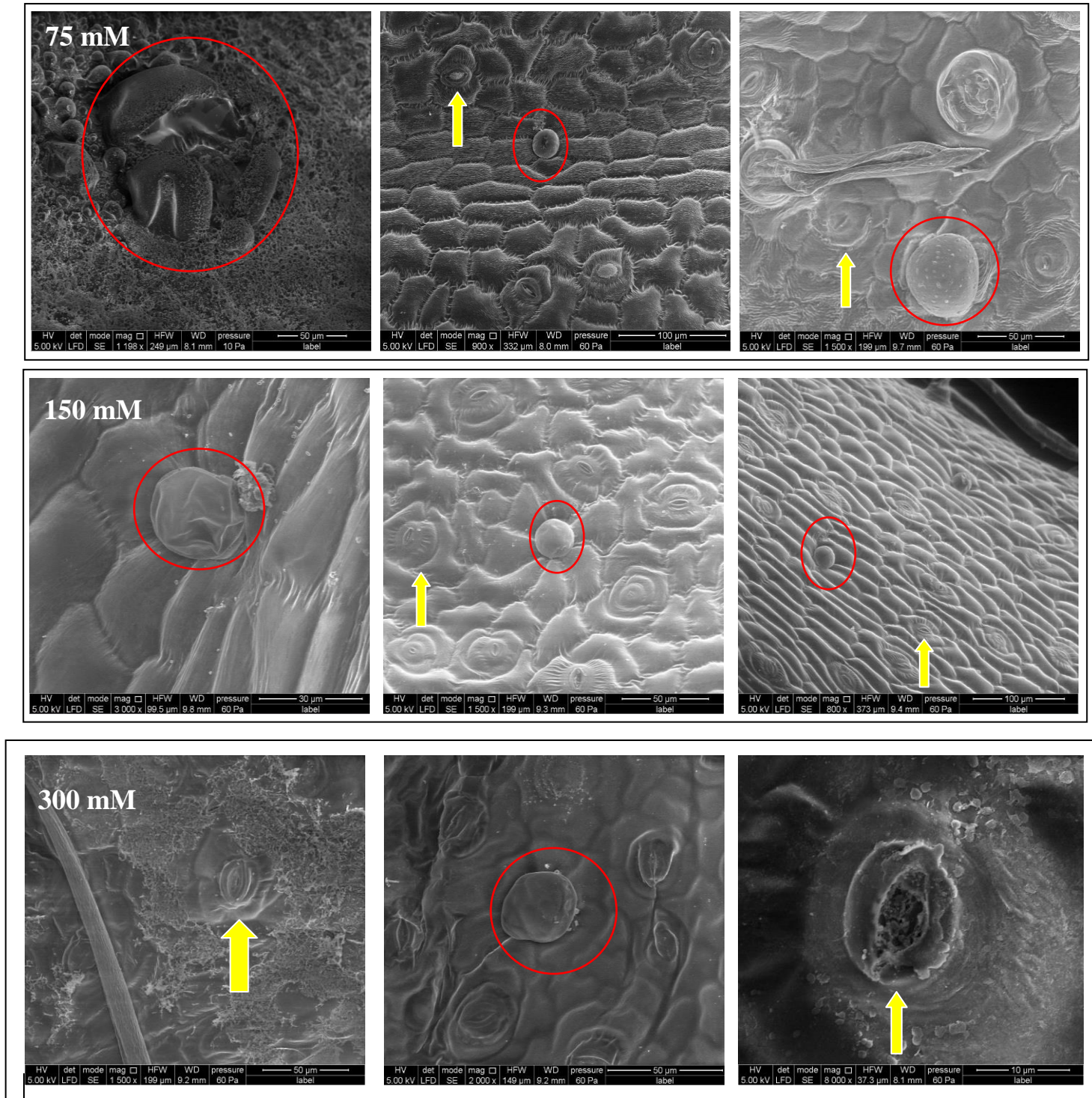


Figura 47: immagini al microscopio elettronico a scansione di campioni fogliari di *C. sabatius* provenienti da coltura *in vitro* a diverse concentrazioni saline: 0 mM, 75 mM, 150 mM, 300 mM NaCl. Cerchi rossi: ghiandole del sale; frecce gialle: stomi.

Dalle immagini ottenute dai campioni fogliari di *C. sabatius* coltivato *in vitro* in assenza di sale si nota la presenza di ghiandole deputate all'accumulo e all'escrezione del sale. Tali ghiandole risultano in qualche caso danneggiate già alla concentrazione salina di 75 mM NaCl, così come è evidente la partecipazione al processo di escrezione da parte degli stomi. All'aumentare della concentrazione salina, la superficie fogliare risulta sempre più incrostata e ricoperta di concrezioni saline.

Capitolo 5:

Conclusioni

5.1 Conclusioni *Limonium cordatum*

Relativamente all'identificazione di un protocollo di coltura *in vitro* per la conservazione *ex situ* di questa specie protetta e a rischio estinzione, si è confermato valido quello precedentemente stabilito da Savona et al. (2009). I risultati degli esperimenti effettuati nel corso di questi anni hanno inoltre potuto definire la necessità di un terreno di coltura agarizzato rispetto a quello liquido, essenziale per ottenere un tasso di moltiplicazione ed una crescita degli individui di *L. cordatum* ottimale. Questo nonostante la coltura liquida in bioreattori sia utilizzata da diversi anni (Peak et al., 2001) e sia risultata efficace nella coltura di molte specie floricole e orticole (Ziv, 2000; Takayama e Akita, 2005; Ruffoni e Savona, 2005; Lambardi, 2012).

La coltura *in vitro* ha inoltre permesso di valutare adeguatamente le risposte alle diverse concentrazioni saline specifiche di questa specie. A livello morfologico, il restringimento dell'area fogliare riscontrato durante gli esperimenti risulta coerente con quanto riportato in letteratura (Gutschick, 1999; Rodriguez et al., 2004; Parida, 2005; Nawaz et al. 2010), e così pure la presenza di ghiandole deputate all'accumulo di sale, che sono state descritte per la prima volta nella famiglia delle Plumbaginaceae nel 1986 da Faraday C. D. e Thomson W. W. e mai prima d'ora per questo *Limonium*. Altra modalità di risposta allo stress salino corrisponde alla produzione di prolina, amminoacido accumulato in grandi quantità nelle piante superiori in presenza di stress ambientali, in particolare di stress salino (Rains, 1989; Ashraf, 1994; Ali et al., 1999; Rhodes et al., 1999; Ozturk and Demir, 2002; Hsu et al., 2003; Ashraf, 2004; Kavi Kishore et al., 2005; Szabados, 2009). Le modalità di risposta allo stress salino descritte a livello della porzione epigea della pianta le permettono di tollerare e sopravvivere in condizioni di elevate concentrazioni saline, quali quelle determinate dalla presenza di 600 mM NaCl nel terreno di coltura. Tutto ciò permette quindi di definire anche *Limonium cordatum* come un'alofita (Gorham, 1995), che prospera in zone particolarmente esposte agli aerosol marini, utilizzando e sfruttando meccanismi di resistenza tipicamente presenti nelle alofite descritte in letteratura che vivono in questa tipologia di habitat (Flowers, 2008; Rozema, 2013).

5.2 Conclusioni *Convolvulus sabatius*

Nel caso di questa specie protetta e a rischio di estinzione è stato messo a punto un protocollo di coltura *in vitro* per la conservazione *ex situ*. I risultati degli esperimenti effettuati durante questi anni hanno inoltre potuto stabilire che il *C. sabatius* abbia la necessità di un terreno di coltura agarizzato rispetto a quello liquido, composto da sali MS (Murasighe and Skoog, 1962) addizionato di 1,33 μ M BA, 1 ml di vitamine MS stock (100 mg/L; Murashige & Skoog, 1962), 8g/l Agar (Plant Agar) e pH 5,7 (Di Silvestro et al 2015).

Tramite questo protocollo di propagazione è stato possibile ottimizzare la fase di radicazione, per ottenere individui con apparato radicale funzionante, che fossero vitali una volta trasferiti in condizioni di ambientamento *in vivo* (Di Silvestro et al. 2015).

La coltura *in vitro* ha permesso inoltre di valutare le risposte allo stress salino, che risultano differenti rispetto a quelle riscontrate in *L. cordatum*. Infatti, in *C. sabatius* a basse concentrazioni saline la risposta morfologica che appare più evidente è l'aumento dell'area fogliare, contrariamente a quanto riportato in letteratura dove una delle modificazioni morfologiche più comuni consiste nella riduzione dell'area fogliare (Gutschick, 1999; Rodriguez et al., 2004; Parida, 2005; Nawaz et al. 2010). Anche la quantificazione della produzione di prolina e degli altri amminoacidi in organismi che provengano dalla coltura *in vitro* mostra un andamento differente rispetto a quello riscontrato in *L. cordatum*. Infatti, sia la quantità di prolina che quella degli altri amminoacidi risultano irrilevanti nella porzione aerea diminuendo all'aumentare della concentrazione salina.

La bassa tolleranza al sale evidenziata nella condizione *in vitro* e al contrario l'elevata tolleranza della specie nell'habitat naturale, è stata la motivazione alla base degli esperimenti effettuati *in vivo* volti a meglio comprendere la natura della tolleranza. E' stato quindi possibile rilevare un diverso comportamento tra porzione aerea e radicale nell'accumulo della prolina e degli altri amminoacidi, rispettivamente. Infatti, tendenzialmente nella porzione aerea non si riscontra accumulo di prolina come invece avviene nell'apparato radicale; inoltre gli altri amminoacidi, trascorsi i 30 giorni di trattamento, sono accumulati sia nella porzione aerea che in quella radicale.

Questi dati fanno supporre che per tollerare la salinità presente nell'habitat naturale sia necessaria la presenza dell'apparato radicale, e che le ghiandole pur presenti a livello fogliare non siano sufficienti quali meccanismo di resistenza allo stress. Così, la bassa tolleranza riscontrata negli esperimenti *in vitro* come pure il diverso contenuto in amminoacidi rilevato nella porzione aerea, potrebbero essere un risultato legato all'assenza dell'apparato radicale. In ultima analisi, gli esperimenti di tolleranza alla salinità eseguiti *in vitro* su organismi privi di apparato radicale potrebbero aver fornito risultati falsati. Questa ipotesi sarà oggetto di verifica in un prossimo futuro. Allo stesso modo si potrà verificare l'esistenza di altre strategie messe in atto da questa specie per tollerare le condizioni naturali, quali la presenza di altri osmoliti compatibili (ad esempio la glicinabetaina, Ashraf and Foolad, 2007) o composti in grado di determinare aggiustamenti osmotici (ad esempio il mannitolo, Garcia et al. 1997).

Infine, dato che l'habitat naturale in cui si sviluppano le specie prese in esame in questo studio è condiviso, ma che le modalità di tolleranza e resistenza si sono rivelate differenti fra loro, è ragionevole pensare che le risposte fisiologiche e morfologiche siano specie specifiche.

Bibliografia

- Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal, M. 1999. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. *Biol. Plant.* 42, 89–95.
- Alvard D., Cote F., Teisson C. 1993. Comparision of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell., Tissue and Organ Culture* Vol. 32, 1: 55-60.
- Aronson J.A. 1989. HALOPH: A Data Base of Salt Stress Tolerance Plant of the World, Office of Arid Land Studies, University of Arizona, Tucson, AZ.
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 17–42.
- Ashraf M., Harris P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3–16.
- Ashraf M., Foolad M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206–216.
- Bedini G., Rossi G., Bonomi C. 2005. RIBES, la Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea. *Inform. Bot. Ital.* 37
- Bekheet S.A., Taha H.S., Solliman M.E., Hassan N.A. 2007. Cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 736:283-291.
- Benson E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical reviews in Plant Sciences* 27: 141-219
- Bowes B.G. 1999. A colour atlas of plant propogation and conservation. Manson publishing, London.
- Carine M.A., Robba L. 2010. Taxonomy and evolution of the *Convolvulus sabatius* complex (Convolvulaceae). *Phytotaxa* 14: 1–21.

Chen Z., Cui T.A., Zhou M., Twomey A., Naidu B.P., Shabala S. 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrastino in their salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 4245-4255.

Choen J.I., Alcorn J.B. and Potter C.S. 1991. Utilization and conservation of genetic resources: global development and environmental concerns. *Economic Botany* 45: 190-199

Conti F., Abbate S., Alessandrini A. & Blasi C. 2005. An annotated Check-List of the Italian Flora. Ministero per l'Ambiente, Roma.

Cushman J.C., Bohnert H.J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3:117–124

Di Silvestro D., Mascarello C., Sacco E., Ricci A., Ruffoni B. 2015. *Convolvulus sabatius* Viv.: protocol for micropropagation and ex situ conservation. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants. Book of Abstracts: 111.

Domina G., Scafidi F., Bartolucci F. 2014. Osservazioni sulle strategie riproduttive dei taxa appartenenti al gruppo di *Limonium articulatum* (Plumbaginaceae) Società Botanica Italiana, Gruppo per la Floristica, Sistematica ed Evoluzione “Floristica, Sistematica ed Evoluzione” Orto botanico di Roma, La Sapienza Università di Roma.

Engelmann F. 1997. In vitro conservation methods. In: Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V., Newbury, H.J. (eds.), *Biotechnology and plant genetic resources*. CAB International, Oxford, UK.

Etienne H., Berthouly M., (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* n° 69: 215–231.

Faraday C.D. and Thomson W. W. 1986. Structural Aspects of the Salt Glands of the Plumbaginaceae. *J. Exp. Bot.* 37 (4): 461-470.

Flak D.A. 1990. The theory of integrated conservation strategies for conservation. *Ecosystem management: rare species and significant habitats*. Proceedings of the 15th natural areas conference.

Flowers T.J., Hajibagheri M.A. and Clipson N.J.W. 1986. Halophytes. *Quart. Rev. Biol.*, 61, 313-337.

Flowers T.J. and Colmer T.D. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.*, 179, 945-963.

Flowers T.J., Galal H.K., and Bromham D.L. 2010. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Func. Plant Biol.*, 37, 604-612.

Gallino B. and Pallavicini G. 2000. *La vegetazione delle Alpi Liguri e Marittime*. Blu Edizioni, Peveragno (CN).

Garcia A. B., Engler J. A., Suresh L., Cerats T., Van Montagu M., and Allan B. 1997. Caplan Effects of Osmoprotectants upon NaCl Stress in rice. *Plant Physiol.* 11 5: 159-169

Gardens Conservartion International (BGCI) 2000. *Action Plan for Botanic Gardens in the European Union*. *BGCI*, Richmond.

George E. 1996. *Plant propagation by tissue culture. Part 2: In practice 2nd Edition*.

González-Benito M.E., Clavero-Ramirez I., Lòpez-Aranda J.M. 2004. The use of cryopreservation for germplasm conservation on vegetavely propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(3):341-351.

Gorham J. 1995. Mechanism of salt tolerance of halophytes. *Halophytes and biosaline agriculture*. 31-53.

Gutschick A. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist* 143: 3-1.

Hanerlandt G. 1962. Experiments on the culture of isolated plant cells. *The botanical review*. 35 (1):68-88.

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 463-499.

Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biol. Plant.* 46, 73–78.

Inan G., Zhang Q., Li P., Wang Z., Cao Z., Zhang H., Zhang C., Quist T.M., Goodwin S.M., Zhu J., Shi H., Damsz B., Charbaji T., Gong Q., Ma S., Fredricksen M., Galbraith D.W., James R.A., Rivelli A.R., Munns R. and von Caemmerer S. 2002. Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Funct. Plant Biol.*, 29, 1393-1403.

James RA, Rivelli AR, Munns R, von Caemmerer S 2002. Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Funct. Plant Biol.* 29:1393–403.

Jenks M.A., Rhodes D., Hasegawa P.M., Bohnert H.J., Joly R.J., Bressan R.A. and Zhu J.K. 2004. Salt Cress. A Halophyte and Cryophyte Arabidopsis Relative Model System and Its Applicability to Molecular Genetic Analyses of Growth and Development of Extremophiles. *Plant Physiol.*, 135: 1718-1737.

Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88, 424–438.

Knight H., Knight M.R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6:262–267

Lambardi M., De Carlo A., 2009. Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale. *Italus Hortus* 16: 79-98.

Lambardi M., 2012. Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea. *Riv. Frutticoltura. Ortofloricolt.* 12:32-38.

Li D.Z., Pritchard H.W., 2009. The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends plant sci.* 14:614-621.

- Lledó M.D., Erben M. and Crespo M.B. 2003. *Myriolepis* a new genus segregated from *Limonium* (Plumbaginaceae). – *Taxon* 52(1): 67-73
- Maunder M., Higgens S. and Culham A. 2001. The effectiveness of botanic garden collections in supporting plant conservation: a European case study. *Biodiversity & Conservation*. Vol. 10, Issue 3, pp 383-401.
- Médail F. and Quézel P. 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 112-127
- Minelli A. 1995. *L'Orto botanico di Padova 1545-1995*, Venezia.
- Minuto L., Casazza G. 2006. Conservazione della diversità vegetale in Liguria. Attività ed iniziative in Liguria.
- Munns R., Tester M. 2008. Mechanism of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 654: 1-21.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-495.
- Nawaz K., Hussain K., Majeed A., Khan F., Afghan S. and Ali K. 2010. Fatality of salt stress to plants: morphological, physiological and biochemical aspects. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(34): 5475-5480.
- Nicolini G. & Moreschi A., 1990. *Fiori di Liguria*. Cassa di Risparmio di Genova e Imperia. Edizione e Stampa: SIAG, Genova.
- Orcutt D.M., Nilsen E.T. 2000. *The Physiology of Plants Under Stress*. John Wiley & Sons.
- Ozturk, L., Demir, Y. 2002. In vivo and in vitro protective role of proline. *Plant Growth Regul.* 38, 259–264.
- Parida A. K. and Das A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324–349.

Pawlowski B. 1970. Remarques sur l'endemisme dans les Alpes et les Carpates. *Vegetatio* 21: 181-243.

Peak K.Y., Hahn E.J., Son S.H. 2001. Application of bioreactors of large scale micropropagation systems plants. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 37: 149-157.

Pérez-Alfocea F., Albacete A., Ghanem M.E. and Dodd I.C. 2010. Hormonal regulation of source-sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case of study of root-to-shoot signalling in tomato. *Func. Plant Biol.*, 37, 592-603.

Pignatti S. 1981. *Flora Italiana*, Vol. 2. Edagricole, Bologna

Preece J.E. and Setter E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse. pp71-91. In: Debergh P.C. and Zimmerman R.H. (eds). *Micropropagation: technology and application*. Kluwer acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Rains, D.W. 1989. Plant tissue and protoplast culture: application to stress physiology and biochemistry. In: Jones, H.G., Flowers, T.J., Jones, M.B. (Eds.), *Plants Under Stresses: Biochemistry, Physiology and Ecology and their Application to Plant Improvement*. Cambridge University. Press, Cambridge, pp. 181–196.

Rhodes, D., Verslues, P.E., Sharp, R.E. 1999. Role of amino acids in abiotic stress resistance. In: Singh, B.K. (Ed.), *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, NY, pp. 319–356

Reed B.M. 2001. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters*, 22:97-104.

Reed B.M., Uchendu E. 2008. Controlled rate cooling. In: Reed B.M. (ed), *Plant cryopreservation: a practical guide*. Berlin, Germany: Springer, pp 77-92.

Rodriguez-Milla M.A. and Salinas J. 2009. *prefoldins 3 and 5 play an essential role in Arabidopsis tolerance to salt stress*. *Mol. Plant*, 2, 526-534.

- Rozema J. and Schat H. 2013. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany* 92: 83– 95.
- Ruffoni B. and Savona M. 2005. The temporary immersion system (T.I.S.) for the improvement of micropropagation of ornamental plants. *Acta Horticulturae* 683: 59
- Sakai A. 1960. Survival of the twigs of woody plants at -196°C. *Nature* 185: 393-394
- Savona M., Mascarello C., Mantovani E., Minuto L., Casazza G., Ruffoni B. 2009. Introduction of micropropagated plants of *Limonium cordatum* (L.) Mill., a Mediterranean Endemic. *Acta Hort.* 812: 527-531.
- Serrano R., Mulet J.M., Rios G., Marquez J.A., de Larrinoa I.F., Leube M.P., Mendizabal I., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R., Montesinos C. 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* 50:1023–1036
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3:217–223
- Skoog F., Miller C.O. 1975. Chemical regulation of growth and organo formatio in plant tissue cultures in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
- Szabados L. and Savoure A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* Vol.15-2: 89-97.
- Taiz L., Zeiger E. 2002. *Fisiologia Vegetale*, Piccinin 2° edizione.
- Takayama S., Akita M. 2005. Pratical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. In: liquid culture system for in vitro plant propagation. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.). Springer (The Netherlands): 61-78.

Uemura M., Minami A., Kawamura Y. 2009. Effect of low temperature and cryoprotectants on plant plasma membranes. Paper presented at the first International symposium on cryopreservation in horticultural species (Leuven, 5-9 April).

USDA-ARS 2008. Research databases: Bibliography on Salt Tolerance, Salinity Laboratory, US Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Riverside, CA.

Vierling E., Kimpel J.A. 1992. Plant responses to environmental stress. *Curr Opin Biotech* 3:164–170

Vinocur B., Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16:123–132.

Wang W.X., Vinocur B., Shoseyov O. and Altman A. 2001a. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* 560:285–292

Wang W., Vinocur B., Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218:1-14.

Warming E. (1918). *Lehrbuch der ökologischen Pflanzengeographie*, 3^a edizione, Berlino

Watt M.P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(76), pp. 14025-14035.

Welander M., Persson J., Asp H., Zhu L.H. 2014. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* 179: 227–232.

Williams I. and Frank L. 1974. Improved Chemical Synthesis and Enzymatic Assay of N -Pyrroline-5-Carboxylic Acids. *Analytical Biochemistry* 64: 85-97

Wood J.R.I., Williams B.R.M., Mitchell T.C., Carine M.A., Harris D.J. and Scotland R.W. 2015. A foundation monograph of *Convolvulus* L. (Convolvulaceae). *PhytoKeys* 51: 1–282

Yancey P.H. 1994. Compatible and counteracting solutes. In K. Strange (ed.), Cellular and molecular physiology of cell volume regulation, 81–109.

Yildiztugay E., Sekmen A.H., Turkan I. and Kucukoduk, M. 2011. Elucidation of physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Centaurea tuzgoluensis* under salt stress. Plant Physio. Biochem., 49, 8, 816-824.

Zhang L., Tian L.H., Zhao J.F., Song Y., Zhang C.J., and Gou Y. 2009. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. Plant Physiol., 149, 916-928.

Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. Crit Rev

Zhu J.K. 2001a. Plant salt tolerance. Trends Plant Sci 6:66–71

Zhu J.K. 2001b. Cell signaling under salt, water and cold stresses. Curr Opin Plant Biol 4:401–406

Zhu J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol 53:247–73

Ziv M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Horticultural Reviews 24: 1-30.