

Associazione Italiana di Scienza e
Tecnologia dei Cereali



Atti dell'11° Convegno AISITEC

I CEREALI per un sistema
agroalimentare di qualità

Roma, 22-24 Novembre 2017



A cura di:

R. Acquistucci, M. Blandino, M. Carcea, M.G. D'Egidio, E. Marconi, A. Marti,
M.A. Pagani, G. Panfili, G.G. Pinnavaia, R. Redaelli

Volume interamente pubblicato dall'AISTEC

In copertina: Caseggiato dei Molini, Ostia Antica

Autore: Patrick Denker

© 2018 Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia dei Cereali AISTEC

c/o Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di
ricerca Alimenti e Nutrizione

Via Ardeatina, 546 - 00178 Roma

ISBN: 978-88-906680-6-7

Cereali e pseudocereali quali filiere di riferimento per un sistema alimentare sostenibile: esperienze ENEA

P. Galeffi, G. Baviello, A. Brunori, C. Cantale, A. Del Fiore, P. De Rossi, M. Iannetta*

ENEA BIOAG CR Casaccia, via Anguillarese 301, 00123 Roma.

*E-mail: patrizia.galeffi@enea.it

Abstract

Recently, ENEA's BIOAG Division has established various collaborations with SMEs and agro-food industries to develop a common strategy fostering an improvement of the cereal chain. In durum wheat, new molecular markers, linked to genes related to agronomic traits of interest, are being developed and are under validation. Regarding minor crops, field trials have been carried out on common and Tartary buckwheat, and on proso grain and foxtail millet, species rich in bioactive compounds, thus valuable as ingredients for the preparation of healthy foodstuff. In this view, buckwheat whole meal has been qualitatively characterised and utilised in the formulation of innovative pasta and bakery products.

Riassunto

Recentemente la Divisione BIOAG dell'ENEA ha attivato una serie di collaborazioni con PMI e industrie agroalimentari al fine di sviluppare una strategia comune per il miglioramento della filiera cerealicola. Per quanto riguarda il grano duro, si stanno sviluppando e validando nuovi marcatori molecolari legati a geni correlati a caratteristiche agronomiche di interesse. Relativamente alle colture minori, sono state condotte prove agronomiche su grano saraceno comune e tartarico, e su miglio comune e a coda di volpe, specie ricche in sostanze bioattive e per questo potenzialmente impiegabili come ingredienti per la preparazione di alimenti con proprietà nutrizionali e salutistiche. In questa ottica, sfarinati di grano saraceno stati caratterizzati qualitativamente e impiegati nella formulazione di pasta e prodotti da forno innovativi.

Introduzione

In linea con i temi chiave del documento della Commissione europea (2010) "Europa 2020 - Una strategia per una crescita intelligente, sostenibile e inclusiva", la Divisione Biotecnologie e Agroindustria (BIOAG) dell'ENEA, in collaborazione con PMI e industrie agroalimentari, ha sviluppato negli ultimi anni una strategia comune per l'innovazione e il miglioramento della filiera cerealicola. Le attività di ricerca hanno riguardato i cereali maggiori (grano duro), cereali minori e pseudocereali, affiancando le prove di campo e gli studi di genomica con attività di valutazione qualitativa di sfarinati e prodotti alimentari da essi derivati.

Per quanto riguarda il grano duro, le attività si sono focalizzate sullo studio di geni coinvolti nella risposta agli stress abiotici con particolare attenzione, alla luce degli attuali cambiamenti climatici, alla capacità di garantire un'adeguata produzione in condizioni di stress idrico. Lo sviluppo delle scienze "omiche" ha fornito nuovi strumenti molecolari, che si affiancano ai tradizionali sistemi di breeding, e l'ENEA, anche nell'ambito di una lunga collaborazione con il CIMMYT e attraverso la partecipazione ad iniziative internazionali come "Wheat Initiative" e "International Wheat Yield Partnership (IWYP)", sta sviluppando nuovi marcatori molecolari associati alla resa in condizioni di scarsità di acqua. Tali marcatori, opportunamente validati, potranno accelerare il processo di selezione per l'ottenimento di

varietà più adatte alle nuove condizioni climatiche.

Il grano saraceno, pseudocereale a basso impatto ambientale ed elevato contenuto in composti bioattivi (Nobili *et al.*, 2015), è stato sottoposto ad una approfondita valutazione agronomica. In collaborazione con l'Università del Molise, l'ARSARP Molise e l'ARSSA Calabria, sono state condotte per diversi anni prove agronomiche finalizzate a valutarne l'adattabilità alle aree di alta collina e di montagna del Centro e Sud Italia. In aggiunta al grano saraceno comune (*Fagopyrum esculentum* Moench), è stata oggetto di sperimentazione una seconda specie, il grano saraceno tartarico (*F. tataricum* Gaertn), la cui granella si caratterizza per un contenuto molto più elevato di sostanze bioattive, tra le quali la rutina, un flavonoide con riconosciuti effetti benefici sulla salute, (Christa e Soral-Šmietana, 2008). Parallelamente, nell'ambito di ricerche finalizzate all'innovazione di processo e di prodotto, sfarinati di grano saraceno sono stati caratterizzati qualitativamente e utilizzati come ingrediente per la preparazione di pasta e prodotti da forno (pane, biscotti) con migliorate proprietà nutrizionali e salutistiche. Ulteriori valutazioni agronomiche hanno riguardato anche il miglio, un cereale minore anch'esso con una granella ad elevato valore nutrizionale e ricca in sostanze bioattive. In particolare, è stato riportato un effetto positivo delle sue proteine sul colesterolo plasmatico, con aumento del livello della frazione HDL (Park *et al.*, 2008) ed un effetto epatoprotettivo (Nishizawa *et al.*, 2002). Anche se la composizione amminoacidica delle proteine del miglio è carente per il contenuto di lisina e triptofano, si caratterizza tuttavia per una certa quantità di aminoacidi solforati, quali metionina e cisteina (Nishizawa *et al.*, 1989). In collaborazione con l'ARSARP e il "All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops" (Orel, Federazione Russa) sono state condotte prove agronomiche presso il sito sperimentale di San Polo Matese (CB), al fine di valutare il possibile impiego di due specie di miglio (*Panicum miliaceum* L. e *Setaria italica* (L.) Beauv) quali colture alternative a basso impatto ambientale.

Il presente contributo riporta i risultati sperimentali ed analitici più significativi.

Materiali e metodi

Grano duro: il DNA genomico di una popolazione RIL e dei suoi parentali è stato estratto da foglie giovani, in duplicato, controllato qualitativamente e quantificato con metodi standard. Usando sequenze geniche specifiche sono stati disegnati oligonucleotidi ed effettuate amplificazioni PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) utilizzando il seguente protocollo: denaturazione iniziale a 94 °C per 7 min; 38 cicli di denaturazione a 94 °C per 1 min; annealing per 1 min e 45 s alla temperatura richiesta da ciascuna coppia; elongazione a 72°C per 2 min e 30 s; elongazione finale a 72 °C per 7 min. La reazione fu condotta in un volume totale di 25 µl contenenti 12,5 µl di miscela di reazione REDTaq® ReadyMix™, 20 pmol di ciascun oligo e 4 µl di DNA genomico (50 ng/µl). I prodotti di amplificazione sono stati separati su gel di agarosio 1,2%, rivelati con GelRed™ (Biotium Inc., Fremont, CA, USA) e visualizzati tramite GelDoc™ (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). Il pacchetto statistico SAS-STAT (SAS Institute Inc. 2009) è stato usato per stimare le componenti della varianza (ANOVA) e la significatività del contrasto tra i due gruppi allelici originati dall'analisi dei parentali e dell'intera RIL.

Grano saraceno (*F. esculentum* Moench e *F. tataricum* Gaertn): Differenti accessioni di *Fagopyrum esculentum* e di *F. tataricum* sono state sottoposte, per diversi anni, a confronto agronomico presso siti sperimentali situati in zone di montagna o alta collina (700-1300 metri slm). La granella raccolta in campo è stata oggetto di analisi chimico-fisiche (spettrofotometriche e cromatografiche) finalizzate all'individuazione di composti bioattivi. Sulla frazione polifenolica, è stato effettuato il dosaggio spettrofotometrico dei polifenoli totali e del potere antiossidante, (metodo modificato, Alvarez-Jubete *et al.*, 2010). Il

contenuto di rutina è stato determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC/DAD). Le analisi descritte sono state eseguite anche su prodotti da forno realizzati impiegando come ingredienti gli sfarinati delle accessioni ad elevato contenuto in sostanze bioattive.

Miglio (*Panicum miliaceum* e *Setaria italica*): In collaborazione con l'ARSARP Molise e il VNIIZBK (All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops - Orel, Federazione Russa), 16 accessioni di *P. miliaceum* e 5 accessioni di *S. italica* sono state coltivate per diverse stagioni agrarie presso il sito sperimentale di San Polo Matese (CB) al fine di caratterizzarle morfologicamente e confrontarle in prova agronomica in termini di adattabilità e produttività.

Risultati e discussione

Grano duro: un insieme di varietà di grano duro è stato cresciuto in serra ed utilizzato per identificare, isolare e studiare, in grano duro, un fattore trascrizionale omologo al gene *DREB2*. I geni *DREB* sono stati individuati in *Arabidopsis* e sono alla base di complessi meccanismi di risposta allo stress in un gran numero di piante. Il gene in grano duro è stato denominato *DRF1* ed è stato studiato sia a livello genomico (Latini *et al.*, 2007; Di Bianco *et al.*, 2011; Thiyagarajan *et al.*, 2014) che trascrittomico, in situazioni di stress, sia in serra che in campo (Latini *et al.*, 2008; Cantale *et al.*, 2009; Latini *et al.*, 2013). Recentemente, l'analisi genomica in una RIL del CIMMYT ha permesso di individuare all'interno della sequenza del gene *DRF1* un polimorfismo che è risultato essere correlato alla resa in condizioni di stress idrico (Cantale *et al.*, 2017). Tale marcatore è attualmente in corso di validazione. In Figura 1 è mostrato il risultato che ha portato all'individuazione del marcatore: i parentali della RIL mostrano un comportamento opposto al saggio, cosa che è da attribuire effettivamente alla presenza/assenza del polimorfismo e non a problemi sperimentali, come dimostrato dal risultato del concomitante test di controllo.

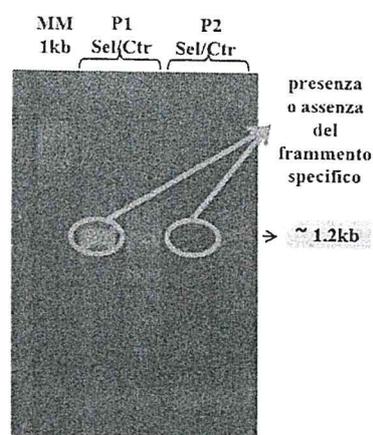


Figura 1. Risultato della PCR selettiva. P1/P2=linee parentali; Sel=selettivo; Ctr=controllo; MM=Marcatore di peso molecolare.

I dati di campo della RIL in due stagioni agrarie e in due diversi ambienti, irrigato e stressato, sono stati elaborati con metodi statistici per individuare una possibile associazione con tratti

correlati alla resa. La presenza della banda è risultata associata molto significativamente con la resa in condizioni di stress idrico, permettendo lo sviluppo di un nuovo marcatore funzionale derivato dal gene *DRF1*, (Latini *et al.*, 2007)

Grano saraceno: Le prove agronomiche hanno consentito di individuare, per ogni sito sperimentale, varietà ed ecotipi idonei alla coltivazione, con rese produttive fino a 1,5 t/ha, significativamente superiori alle medie mondiali (Brunori *et al.*, 2010). I risultati hanno mostrato l'influenza dell'altitudine sulle rese, in modo particolare per il tartarico, specie di origine montana, che si esprime meglio al di sopra dei 1000 m s.l.m. (Brunori *et al.*, 2011). Le analisi quali/quantitative hanno confermato un contenuto più alto di polifenoli totali e un maggiore potere antiossidante negli sfarinati di grano saraceno tartarico rispetto al grano saraceno comune (Tolaini *et al.*, 2013). Il grano saraceno tartarico ha inoltre evidenziato un contenuto in rutina fino al 2% p.s., circa 100 volte superiore rispetto al grano saraceno comune (Fig. 2, De Rossi *et al.*, 2013). I risultati ottenuti su prodotti da forno (pane e biscotti), realizzati con sfarinati di grano saraceno tartarico, in percentuale tra il 10 ed il 20%, hanno mostrato un contenuto in rutina nei biscotti (0,150 % p.s.) maggiore rispetto al pane (0,050 % p.s.).

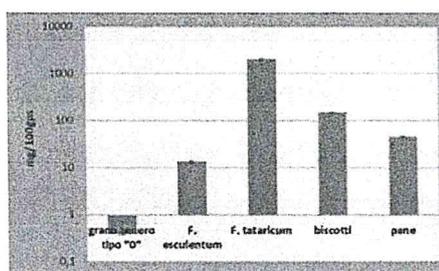


Figura 2. Quantificazione della rutina in grano tenero, grano saraceno e prodotti da forno.

Alla luce dei risultati conseguiti il grano saraceno tartarico, oltre ad essere idoneo al consumo da parte di persone affette da celiachia, poiché privo di glutine, si mostra adatto alla formulazione di alimenti con effetti benefici sulla salute.

Miglio: I risultati delle prove condotte su miglio sono mostrati in Figura 3. In particolare, per quanto concerne *Panicum miliaceum*, le varietà più produttive sono risultate, nell'ordine "Soyuz" (4,79 t/ha), "Knyazheskoe" (4,39 t/ha) e "Kazach'e" (4,27 t/ha). La varietà tetraploide "Pp2000", caratterizzata da peso e dimensioni superiori alla media, ha mostrato una bassa capacità germinativa, una crescita modesta e una scarsa fertilità, con conseguente resa produttiva quasi inesistente. I valori osservati appaiono promettenti in considerazione di una media produttiva di campo pari a 2,60 t/ha, decisamente superiore alle medie mondiali (0,95 t/ha) (Brunori *et al.*, 2015). Inoltre, va riportato che, in prossimità della raccolta, la coltura ha subito una forte predazione da parte di uccelli, facendo supporre un potenziale produttivo ancora maggiore. Nel caso della *Setaria italica*, le 5 accessioni messe a confronto, come atteso, hanno mostrato rese produttive inferiori rispetto al *P. miliaceum*, comprese in un intervallo tra 1,5 e 2,0 t/ha, ma comunque superiori rispetto alle medie produttive mondiali riportate per questa specie (0,8-0,9 t/ha) (Colonna *et al.*, 2017).

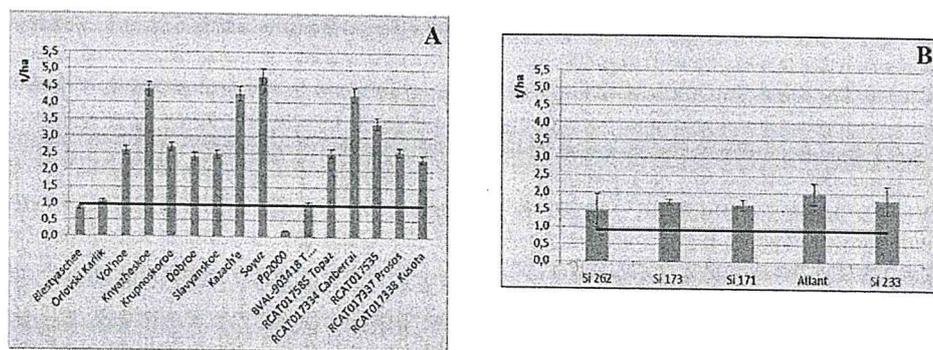


Figura 3. Rese di *Panicum miliaceum* (A) e di *Setaria italica* (B) registrate nelle prove agronomiche condotte presso San Polo Matese (CB). Le linee orizzontali in grassetto rappresentano le medie produttive mondiali.

Pertanto, i risultati ottenuti suggeriscono che il miglio merita una valorizzazione in un'ottica di eco-sostenibilità e indicano l'opportunità di introdurre questa specie tra le colture del territorio molisano, per ottenere un ingrediente per alimenti salutistici, da inserire in un sistema agroalimentare di qualità.

Ringraziamenti

PG, CC e MI ringraziano il Dr. K. Ammar (CIMMYT - Mexico) per aver fornito la RIL pop di grano duro e per aver condotto gli esperimenti di campo in due stagioni e in differenti condizioni idriche; GB, AB, ADF e PDR ringraziano i colleghi dell'Università del Molise, dell'ARSARP Molise, dell'ARSSA Calabria e del VNIIZBK (All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops - Orel, Federazione Russa) per aver condotto le prove agronomiche delle accessioni studiate per diversi anni.

Bibliografia

- Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E. 2010. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119(2): 770-778.
- Brunori A., Baviello G., Colonna M., Ricci M., Izzi G., Tóth M., Végvári G. 2010. Recent insights in the prospect of cultivation and use of buckwheat in Central and Southern Italy. In: *Advances in Buckwheat Research: Proceedings of the 11th International Symposium on Buckwheat*. Zotikov VI, Parakhin NV (Eds), pp 589-600.
- Brunori A., Baviello G., Végvári G. 2011. Grain rutin content of some varieties of common and tartary buckwheat grown at different altitude above sea level on the massif of pollino in the region of Basilicata (Southern Italy). *Fagopyrum*, 28: 53-56.
- Brunori A., Ricci M., Colonna M., Sidorenko V., Starikova Zh. V., Suvorova G. 2015. Yield assessment of 16 Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties cultivated in Central Italy. In: *Grains for feeding the world: Proceedings of the 10th AISTEC Conference, jointly organised with ICC on the occasion of the World Expo Milan 2015*. Acquistucci R., Blandino M., Carcea M., D'Egidio M.G., Iametti S., Marconi E., Marti A., Paganì M.A., Palumbo M., Redaelli R. (Eds), pp 112-115.
- Cantale C., Latini A., Sperandei M., Pugnali M., Iannetta M., Ammar K., Galeffi P. 2009. Drought tolerant and susceptible wheat cultivars from field experiments to investigate the expression profile of *TdDRF1* gene. *Journal of Genetics & Breeding*, 61:115-120.

- Cantale C., Di Bianco D., Thiyagarajan K., Ammar K., Galeffi P. 2017. B genome specific polymorphism in the *TdDRF1* gene is in relationship with grain yield. *Planta*, 247(2):459-469. DOI 10.1007/s00425-017-2799-0.
- Christa K., Soral-Šmietana M. 2008. Buckwheat grains and buckwheat products – nutritional and prophylactic value of their components – a review. *Czech Journal of Food Science*, 26: 153-162.
- Colonna M., Ricci M., Sidorenko V., Starikova Zh.V., Suvorova G., Brunori A. 2017. Valutazione agronomica di 5 varietà di miglio a coda di volpe (*Setaria italica* L. Beauv) coltivate in Molise. In: 11° Convegno AISTEC “I cereali per un sistema agroalimentare di qualità” 22-24 novembre 2017, Roma, p. 108.
- De Rossi P., Del Fiore A., Tolaini V., Presenti O., Antonini A., Procacci S., Nobili C., Baviello G., Zannettino C., Corsini G., Vitali F., Brunori A. 2013. Gli alimenti funzionali: potenzialità di utilizzo del grano saraceno tartarico. *Molini d'Italia*, 9:30-34.
- Di Bianco D., Thiyagarajan K., Latini A., Cantale C., Felici F., Galeffi P. 2011. Exploring the genetic diversity of the *DRF1* gene in durum wheat and its wild relatives. *PGR*, 9(2):247-250.
- Latini A., Rasi C., Sperandei M., Cantale C., Iannetta M., Dettori M., Ammar K., Galeffi P. 2007. Identification of a DREB-related gene in *Triticum durum* and its expression under water stress conditions. *Annals of Applied Biology*, 150:187-195.
- Latini A., Sperandei M., Sharma S., Cantale C., Iannetta M., Dettori M., Ammar K., Galeffi P. 2008. Molecular analyses of a DREB-related gene in durum wheat and triticale. In: *Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance*. C. Abdelly, M. Öztürk, M. Ashraf & C. Grignon Eds., pp. 287-295 Birkhäuser Verlag AG - Basel, CH ISBN 978-3-7643-8553-8 2008.
- Latini A., Sperandei M., Cantale C., Arcangeli C., Ammar K., Galeffi P. 2013. Variability and expression profile of the *DRF1* gene in four cultivars of durum wheat and one triticale under moderate water stress conditions. *Planta*, 237:967-978.
- Nishizawa N., Oikawa M., Nakamura M., Hareyama S. 1989. Effect of lysine and threonine supplement on biological value of proso millet protein. *Nutrition Reports International*, 40: 239-245.
- Nishisawa N., Sato D., Ito Y., Nagasawa T., Hatakeyama Y., Choi M.R., Choi Y.Y., Wei Y.M. 2002. Effect of dietary protein of proso millet on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66:92-96.
- Nobili C., Tolaini V., Procacci S., Del Fiore A., De Rossi P., Baviello G., Brunori A. 2015. Buckwheat: sustainability, safety and nutritional traits. In: *Grains for feeding the world: Proceedings of the 10th AISTEC Conference, jointly organised with ICC on the occasion of the World Expo Milan 2015*. Acquistucci R., Blandino M., Carcea M., D'Egidio M.G., Iametti S., Marconi E., Marti A., Pagani M.A., Palumbo M., Redaelli R. (Eds), pp 42-47.
- Park K.O., Ito Y., Nagasawa T., Choi M.R., Nishizawa N. 2008. Effects of dietary Korean proso-millet protein on plasma adiponectin, HDL cholesterol, insulin levels, and gene expression in obese type 2 diabetic mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(11):2918-2925.
- Thiyagarajan K., Cantale C., Porceddu E., Galeffi P. 2014. Molecular evolutionary analysis of a novel non-autonomous DNA transposon in Poaceae. *Options Méditerranéennes, Serie A* 110:613-617.