



# NEWSLETTER

N° 5 - Settembre 2023

**Bollettino periodico d'informazione per il progetto Prometeo cofinanziato dall'Unione Europea nell'ambito del Programma ENI di Cooperazione Transfrontaliera (CT) "Italia-Tunisia" 2014-2020**

Il Programma ENI CT "Italia-Tunisia" 2014-2020 è un programma bilaterale di cooperazione transfrontaliera, cofinanziato dall'Unione Europea nell'ambito dello Strumento Europeo di Vicinato (ENI). Con una dotazione finanziaria di 33,3 milioni di euro, il programma, la cui gestione congiunta è stata affidata all'Ufficio di Programmazione della Regione Siciliana, si propone di promuovere uno sviluppo economico, sociale e territoriale giusto, equo e sostenibile, al fine di favorire l'integrazione transfrontaliera e valorizzare i territori e le risorse dei due Paesi partecipanti. <https://www.italietunisie.eu/>

## Sommario della Newsletter:

### Protocolli scientifici di Patologia Vegetale:

Muffa azzurra e muffa verde degli agrumi .....p.2

Marciume delle radici e del colletto del mandarino .....p.4

Marciume delle radici e del colletto dell'olivo .....p.7

### Protocolli scientifici di Scienza dei Materiali:

Analisi dei tessuti vegetali mediante spettrometria di massa di ioni secondari a tempo .....p.10

Estrazione dei polifenoli del guscio di mandorla .....p.14

## Edizione speciale: i protocolli scientifici di patologia vegetale e di scienza dei materiali del progetto Prometeo

Con questo numero speciale si completa la pubblicazione dei protocolli scientifici del progetto Prometeo; in questa Newsletter viene dedicato spazio ai protocolli scientifici di Patologia Vegetale e di Scienze dei Materiali.

Durante i mesi di Luglio, Agosto e Settembre è proseguita l'attività di sperimentazione sul campo e validazione dei protocolli e i risultati raggiunti costituiranno una solida base scientifica per orientare le politiche agricole, rafforzare i servizi fitosanitari, aumentare l'efficienza produttiva, la competitività e la sostenibilità di questi settori e migliorare gli standard di qualità nella sicurezza alimentare.

Buona lettura!

# Muffa azzurra e muffa verde degli agrumi-*Penicillium digitatum* e *P. italicum*

La “muffa verde e la muffa azzurra” causate, rispettivamente, da *Penicillium digitatum* e *P. italicum* (famiglia *Trichocomaceae*) sono le malattie post-raccolta più distruttive per gli agrumi. La distribuzione geografica di queste due specie comprende tutte le aree di produzione di agrumi del mondo e sono state descritte anche in Paesi che importano e non producono agrumi (Frisvad e Samson. 2004). Sia *P. digitatum* che *P. italicum* sono patogeni da ferita che infettano i frutti attraverso ferite della buccia, in campo, nei magazzini di confezionamento o durante la catena di commercializzazione dei frutti (Bautista-Baños. 2014; Palou. 2014). *Penicillium digitatum* è il patogeno più pericoloso e diffuso ed è considerato la principale causa di perdite economiche in agrumicoltura, raggiungendo il 90% delle perdite totali in post-raccolta degli agrumi (Costa et al. 2009). *Penicillium italicum*, invece, è più comune nei frutti conservati in celle frigorifere durante l'estate e può diffondersi nei contenitori per il confezionamento più facilmente della muffa verde, causando un cosiddetto “nido” di frutti in decomposizione (Ismail e Zhang. 2004). Conoscenze aggiornate sull'eziologia di queste malattie, soprattutto per quanto riguarda gli aspetti legati ai meccanismi di infezione e alle condizioni ambientali che favoriscono lo sviluppo dei patogeni, potrebbero essere utili per pianificare strategie di gestione “intelligenti”. A questo proposito, l'adozione di requisiti minimi come, l'implementazione di una migliore manipolazione post-raccolta, la sanificazione delle attrezzature, il trasporto e le condizioni di stoccaggio (Naqvi. 2006), potrebbero rappresentare misure necessarie e sufficienti per salvaguardare la resa e, allo stesso tempo, garantire la sicurezza dell'ambiente e della salute umana.

## 1. Diagnosi

### 1.1. In campo - sintomi e segni

Nelle fasi iniziali, le infezioni da *P. digitatum* includono una zona depressa umida sulla superficie dei frutti che si espande quando il micelio bianco colonizza la maggior parte della superficie del frutto; il centro della massa di micelio diventa infine color verde oliva per la produzione dei conidi. In prossimità della fine del ciclo della malattia, il frutto diminuisce di dimensione e assume l'aspetto raggrinzito. Le lesioni iniziali di *P. italicum* sono simili a quelle causate da *P. digitatum*, ma le spore sono di colore azzurro. Sui frutti si genera, dapprima, una macchia d'umido sulla buccia. Successivamente, il micelio bianco diventa visibile e circonda il centro della lesione dove si ha la sporulazione, di colore azzurro, del fungo. Con il tempo, l'intera superficie del frutto si ricopre completamente di spore; a quel punto, il frutto inizia a restringersi e, se esposto all'aria, diventa una massa viscida e informe.



**Figura 1.** Frutti di arancio colpiti da muffa verde (*Penicillium digitatum*) e blu (*P. italicum*). In basso a sinistra, colture di 7 giorni di età, accresciute su PDA a 25°C, degli isolati di *P. digitatum* (sinistra) e *P. italicum* (destra).

### 1.2. In laboratorio - isolamento, caratteristiche delle colture e identificazione molecolare del patogeno

Le specie di *Penicillium* possono essere isolate ponendo un frammento di 5 mm di buccia di

agrumi, prelevato dal margine dell'area infetta, disinfettato con NaClO all'1% per 2 minuti, risciacquato in acqua distillata sterile, si piastre di potato dextrose agar (PDA) contenente streptomina solfato alla concentrazione di 0,25 g/l. Dopo 24 ore di incubazione a 25°C al buio, le colonie che si sono sviluppate vengono trasferite su PDA. Le colture pure si ottengono per trasferimento monoifale. Le caratteristiche macroscopiche possono essere studiate su Czapek yeast autolysate agar (CYA), estratto di lievito e saccarosio agarizzato (YES), estratto di malto agarizzato (MEA) e agar patata destrosio (APD) (Samson et al. 2014; Visagie et al. 2014). Queste caratteristiche includono: dimensione e colore delle colonie (frontale e posteriore), aspetto e grado di sporulazione. Il colore, la consistenza e la forma delle colonie possono variare da una specie all'altra. Le colonie di *P. digitatum* sono, nel lato dorsale, di un colore verde oliva e, nel lato frontale, variano da incolore a giallo crema o marrone chiaro opaco. Le colonie di *P. italicum* sono, invece, di colore blu o grigio-verde e spesso appaiono granulari per la presenza di gruppi di rami conidiofori e ammassi conidici. La parte posteriore è, invece, incolore o cambia da grigio a giallo-marrone e può diventare arancione o rosso scuro. Le osservazioni microscopiche possono essere effettuate su colture di 7-10 giorni e riguardano la lunghezza delle fialidi, metule e stipi; le dimensioni dei conidi e il tipo di struttura dei penicilli. L'identità del patogeno viene confermata mediante PCR tradizionale attraverso l'amplificazione della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosomiale nucleare (rDNA), utilizzando le coppie di primer universali ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATGC-3', (White et al., 1990). I prodotti della PCR vengono purificati con una colonna di purificazione PCR (Macherey-Nagel) sequenziati. Le sequenze vengono confrontate con il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 2. Gestione

La gestione tradizionale di queste malattie prevede azioni specifiche che iniziano in campo e proseguono fino alla fase di stoccaggio in magazzino. Le tipiche misure post-raccolta comprendono il trattamento con composti igienizzanti, come il cloro o, recentemente, l'acido perossiacetico (Ismail e Zhang, l.c.). I frutti esportati a livello internazionale, vengono ulteriormente trattati chimicamente, utilizzando composti come l'imazalil e il tiabendazolo (La Spada et al. 2021). L'impiego di fungicidi ha effetti collaterali dannosi, tra cui la presenza di sostanze con tossicità acuta nelle bucce dei frutti e l'accumulo nel suolo, nell'acqua e nelle piante di composti attivi non biodegradabili, con conseguente contaminazione ambientale e ulteriori rischi per la salute umana. Un ulteriore aspetto negativo dell'impiego di fitofarmaci di sintesi è l'insorgenza di resistenti nelle popolazioni dei patogeni. In conformità con la Direttiva Europea 2009/128/CE, che stabilisce un quadro d'azione comunitario per l'uso sostenibile dei pesticidi al fine di ridurre i rischi per la salute umana e soddisfare la crescente richiesta di prodotti di alta qualità, sicuri ed ecologici, sono stati attivamente identificati e testati mezzi alternativi ai fungicidi di sintesi. Queste alternative includono l'uso di microrganismi antagonisti o di loro bio-derivati (La Spada et al. l.c.; Riolo et al. 2023), nonché l'uso di sostanze naturali e altri composti antimicrobici naturali (La Spada et al. l.c.; Yang et al. 2021).

## Bibliografia

1. Frisvad J., Samson R. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne tetrastellate penicillia and their mycotoxins. *Stud. Mycol.*, 49:1-174.
2. Baiyewu, R. A., Amusa, N. A., Ayoola O. A., Babalola O. (2007). Survey of the post-harvest diseases and aflatoxin contamination of marketed pawpaw fruit (*Carica papaya* L) in South Western Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*. 2, 178-18. DOI/ 10.5897/AJAR.9000665.
3. Bautista-Baños S (2014). Postharvest Decay: Control Strategies. Elsevier Inc. 1-383.
4. Costa J.H., Bazioli J.M., de Moraes Pontes J.G., Fill TP (2019). *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biol* 123(8):584-593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004>
5. La Spada F., Aloï F., Coniglione M., Pane A., Cacciola S.O. (2021). Natural biostimulants elicit plant immune system in an integrated management strategy of the postharvest Green Mold of orange fruits incited by *Penicillium digitatum*. *Front Plant Sci* 12:1-16. Naqvi S (2006) Diagnosis and management of pre and post-harvest diseases of citrus fruit. *Dis Fruits Veg* 1:339-359.
6. Naqvi.S. (2006). Diagnosis and management of pre and post-harvest diseases of citrus fruit. *Dis. Fruits Veg*. 1:339-359.
7. Palou L. (2014) *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In *Postharvest Decay*, Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 45-102.
8. Riolo M., Luz C., Santilli E., Meca G., Cacciola S.O. (2023). Antifungal activity of selected lactic acid bacteria from olive drupes. *Food Bioscience* 52: Article 102422. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102422>
9. Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. and Perrone, G. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 78, 343-371. DOI: 10. 1016/j. simyco. 2014. 09. 001
10. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (San Diego, California, USA: Academic Press, Inc), 315-322.

## Marciume delle radici e del colletto del mandorlo- *Phytophthora* spp.

Il marciume delle radici e del colletto del mandorlo è una malattia abbastanza diffusa associata a diverse specie di *Phytophthora*, tra cui *P. cambivora*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. megasperma*, *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. niederhauserii*, *P. plurivora* e *P. chlamydospora*. Ad oggi, la malattia è stata segnalata in Australia, Spagna, California, Iran e Turchia (Wicks et al. 1986; Wicks, 1989; Browne et al. 1997; Sahragard et al. 2006; Pérez-Sierra et al. 2010; Kurbetli et al. 2011; Abad et al. 2014; Browne et al. 2015; Çiftçi et al. 2016; Kurbetli et al. 2016; Türkölmez et al. 2016; Browne et al. 2020).



**Figura 1.** Sintomi osservati in campioni di alberi di mandorlo in campo e in vivaio: (a) ingiallimento delle foglie; (b) cancro e marciume del colletto; (c) declino generale; (d) essudati di gomma alla base del tronco; (e) marciume delle radici e del colletto (immagine tratta da Beluzán et al. 2022)

Come per altre malattie simili causate da specie di *Phytophthora*, il ciclo del marciume delle radici e del colletto del mandorlo è complesso e coinvolge numerose fonti di inoculo primario e secondario e diversi modi di diffusione. L'inoculo primario, che sopravvive come micelio, oospore e chlamydospora nei tessuti infetti, inizia le epidemie quando le condizioni ambientali sono favorevoli e la presenza di una pianta ospite stimola la germinazione delle spore; condizioni favorevoli allo sviluppo del marciume delle radici e del colletto di *Phytophthora* sono tipicamente le condizioni tropicali umide. Successivamente, le zoospore, che nuotano fuori dagli sporangi, raggiungono la radice dell'ospite in crescita e si aggregano subito dietro l'estremità della stessa, nelle ferite o nelle aree in cui le radici si biforcano. Si incistano appena prima di infettare la radice. La cisti germina e inizia a differenziare le ife che crescono all'interno dell'ospite. Sebbene la saturazione del suolo sia necessaria per l'infezione, una volta che *Phytophthora* si trova nei

tessuti vegetali può continuare a colonizzare la radice anche se il suolo non è saturato. All'inizio, solo alcune radici sottili sono danneggiate. Successivamente, il patogeno cresce attraverso il sistema radicale nelle radici più grandi fino a raggiungere l'area del colletto radicale dove uccide il cambio. Di conseguenza, le porzioni superiori della pianta cominciano ad appassire e morire e la marcescenza delle radici è accelerata. I sintomi possono svilupparsi rapidamente quando la richiesta di acqua della pianta aumenta durante i primi periodi di siccità estiva. Il successo dell'infezione primaria porta alla differenziazione dell'inoculo secondario sulla superficie delle radici in decomposizione. In generale, *Phytophthora* dipende dall'acqua libera per la diffusione e l'infezione e dall'attività umana per la diffusione a lunga distanza (Cacciola et al. 2011).

## 1. Diagnosi

### 1.1. In campo - sintomi

Il marciame delle radici e del colletto del mandorlo di solito colpiscono piante soggette a prolungato ristagno idrico. I sintomi sugli alberi infetti includono clorosi e caduta prematura delle foglie, diradamento progressivo e disseccamento di tutta la chioma (Fig. 1). I sintomi sulla chioma sono causati dall'estesa necrosi delle radici e dalla conseguente riduzione del sistema radicale attivo. Sintomi aggiuntivi includono appassimento, cancri e abbondante fuoriuscita di gomma dal fusto.

#### 1.2.1 In laboratorio - isolamento dal materiale vegetale infetto

Isolamento dai tessuti sintomatici (radici o frammenti del colletto). I tessuti sintomatici vengono accuratamente lavati in acqua corrente, disinfettati superficialmente in NaClO al 1% per 2 minuti, quindi immersi in EtOH al 70% per 30 secondi, risciacquati in acqua distillata sterile, asciugati e piastrati su agar PARPNH V8 (Jung et al. 1996). Dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore al buio a 25°C, si ottengono culture pure trasferendo singole ife in crescita su agar V8 (V8A) (Erwin e Ribeiro. 1996), si ottengono così colture moniifali.

#### 1.2.2 Identificazione molecolare degli isolati in laboratorio

Sebbene, in passato, l'identificazione di isolati di *Phytophthora* abbia ampiamente fatto affidamento su chiavi sinottiche (Waterhouse. 1963; Newhook et al. 1978; Stamps et al. 1990) basate su criteri morfologici, il ridotto numero di microstrutture diverse insieme alla grande variabilità intra-specifica e ai caratteri condivisi tra specie rende l'impiego di chiavi sinottiche inadeguato (Cacciola et al. 2011). Per questo motivo, oggi i metodi molecolari basati sulla PCR rappresentano il miglior approccio per identificare gli isolati di *Phytophthora*. Il prerequisito per l'applicazione della PCR è l'estrazione del DNA dalla coltura pura. A tal fine, possono essere utilizzati kit commerciali.

Il protocollo PCR convenzionale più comune per l'identificazione degli isolati di *Phytophthora* consiste nell'amplificazione, nel sequenziamento e nell'analisi bioinformatica dei codici a barre Internal Transcribed Spacer (ITS) del DNA ribosomale (rDNA) e della citocromo ossidasi (cox) 1 del DNA mitocondriale (mtDNA) (Robideau et al. 2011). La regione ITS può essere amplificata utilizzando le coppie di primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990) o ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') (Cooke et al. 2000) / ITS4. Il codice a barre COX 1 può essere amplificato utilizzando i primers specifici per gli oomiceti OomCoxI-Levup (5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3') e Fm85mod (5'-RRHWACKTGACT-DATRATACCAAAA-3') (Robideau et al. 2011).

#### 1.2.3. Rilevamento del materiale vegetale infetto da *Phytophthora* mediante PCR in tempo reale

A causa dell'elevata variabilità delle diverse specie di *Phytophthora* coinvolte nel marciame radicale e del colletto, non sono suggeriti protocolli di PCR in tempo reale specifici per le singole specie. Una strategia più efficace può essere quella di rilevare e quantificare il DNA di *Phytophthora* presente nel tessuto vegetale. A tal fine, vengono proposti tre test TaqMan RT-PCR: i. regione Internal Transcribed Spacer (ITS) (amplificata utilizzando i primer All\_Phy\_probe e FITS\_15Ph, RITS\_279Ph); ii. regione trnM-trnP-trnM (amplificata utilizzando i primer TrnM\_PhyG\_probe2 e PhyG-F2, PhyG-Rb); iii. regione atp9-nad9 (amplificata utilizzando i primer PhyG\_ATP9\_2FTail, PhyG\_R6\_Tail e la sonda ATP9\_PhyG2\_probeR). I dettagli sui primer e le sonde sono riportati in Puertolas et al. (2021).

## 2. Gestione

Molti studi dimostrano il ruolo cruciale dello stato idrico del suolo sia nella produzione di sporangi che nell'insorgere di infezioni radicale da parte delle specie di *Phytophthora*. Poiché l'assfissia dovuta alla saturazione dell'acqua nel suolo predispongono le radici all'infezione di questi patogeni, i marciumi radicali e del colletto da *Phytophthora* sono associati sia a terreni pesanti che a periodi prolungati di pioggia (Cacciola et al. 2007). Di conseguenza, la gestione dell'acqua del suolo è fondamentale per il controllo di questa malattia (Cacciola et al. 2011).

Una selezione e preparazione attenta del sito di impianto potrebbero aiutare a prevenire i problemi di ristagno idrico nel suolo. Allo stesso modo, le pratiche colturali che impediscono la saturazione prolungata del suolo, come la coltivazione su tumuli, il drenaggio del suolo e la corretta gestione dell'irrigazione, possono ridurre il marciame radicale e del colletto (Cacciola et al., 2011). Le tecnologie di irrigazione che prevedono l'uso di irrigatori che non bagnano i tronchi e strumenti che misurano lo stato idrico nel suolo possono essere utili per lo sviluppo di un approccio integrato di gestione della malattia (Cacciola et al., 2011).

## 3. Bibliografia

1. Abad, G.; Abad, J.; Cacciola, S.; Pane, A.; Faedda, R.; Moralejo, E.; Pérez-Sierra, A.; Abad-Campos, P.; Álvarez-Bernaola, L.; Bakonyi, J.; et al. *Phytophthora niederhauserii* sp. nov., a polyphagous species associated with ornamentals, fruit trees and native plants in 13 countries. *Mycologia* **2014**, 106, 431-447
2. Beluzán, F.; Miarnau, X.; Torguet, L.; Armengol, J.; Abad-Campos, P. Survey of Oomycetes Associated with Root and Crown Rot of Almond in Spain and Pathogenicity of *Phytophthora niederhauserii* and *Phytophthora vexans* to 'Garnem' Rootstock. *Agriculture* **2022**, 12, 294. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020294>
3. Browne, G.; Schmidt, L.; Brar, G. First report of *Phytophthora niederhauserii* causing crown rot of almond (*Prunus dulcis*) in California. *Plant. Dis.* **2015**, 99, 1863
4. Browne, G.; Viveros, M. Diverse symptoms and tree losses caused by *Phytophthora* spp. in California almonds. *Acta Hort.* **1997**, 470, 570-575.
5. Browne, G.; Ott, N.; Forbes, H.; Yaghmour, M.; Milliron, L. First Report of *Phytophthora chlamydospora* causing crown and root rot on almond in California. *Plant. Dis.* **2020**, 104, 2033.
6. Cacciola, S.O.; Faedda, R.; Pane, A.; Scarito, G. Root and crown rot of olive caused by *Phytophthora* spp. In *Olive Diseases and Disorders*; Schena, L., Agosteo, G.E., Cacciola, S.O., Eds.; Transworld Research Network: Trivandrum, Kerala, India, **2011**; pp. 305-327.
7. Çiftçi, O.; Türkölmez, Ş.; Derviş, S.; Serçe, Ç. First report of canker and root rot of almond caused by *Phytophthora plurivora* in Turkey. *Plant. Dis.* **2016**, 100, 1507.
8. Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, 30, 17-32
9. Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. *Phytophthora Diseases Worldwide*; APS Press—The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, **1996**; pp. 84-95, 96-144, 456-463.
10. Jung, T.; Blaschke, H.; Neumann, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Pathol.* **1996**; 26, 253-272.
11. Kurbetli, I.; Değirmenci, K. First report of *Phytophthora* taxon *niederhauserii* causing decline of almond in Turkey. *New Dis. Rep.* **2011**, 23, 14.
12. Kurbetli, I.; Yılmaz, A. Almond decline caused by *Phytophthora megasperma* in southeastern Anatolian region of Turkey. *J. Turk. Phytopathol.* **2016**, 45, 13-20.
13. Newhook F.J., Waterhouse G.M., and Stamps, D.J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey (UK) Mycological Papers* **1978**, 143, 20.
14. Pérez-Sierra, A.; León, M.; Álvarez, L.; Alaniz, S.; Berbegal, M.; García-Jiménez, J.; Abad-Campos, P. Outbreak of a new *Phytophthora* sp. associated with severe decline of almond trees in eastern Spain. *Plant. Dis.* **2010**, 94, 534-541.
15. Puertolas A., Bonants P.J.M., Boa E., Woodward S. Application of Real-Time PCR for the Detection and Quantification of Oomycetes in Ornamental Nursery Stock. *Journal of Fungi.* **2021**; 7(2):87. <https://doi.org/10.3390/jof702008>
16. Robideau G.P., De Cock A.W.A.M., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H., Bala K., et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour.* **2011**; 11: 1002-1011. [pmid:21689384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21689384/)
17. Sahragard, N.; Banihashemi, Z. Evaluation of resistance of some almond genotypes and cultivars to *Phytophthora cactorum*. *Iran. J. Plant. Pathol.* **2006**, 42, 97-99.
18. Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J., and Hall, G.S. Revised Tabular Key to the species of *Phytophthora*, *Mycological Papers.* **1990**; 162, 1.
19. Türkölmez, Ş.; Derviş, S.; Çiftçi, O.; Ulubaş Serçe, Ç. First report of *Phytophthora chlamydospora* causing root and crown rot on almond (*Prunus dulcis*) trees in Turkey. *Plant. Dis.* **2016**, 100, 1796.
20. Waterhouse, G.M. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. *Commonwealth Mycological Institute, Kew (UK), Mycological Papers.* **1963**; 92, 22.
21. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315-322.
22. Wicks, T.; Lee, T. *Phytophthora* crown rot of almond trees. *Aust. J. Agric. Res.* **1986**, 37, 277-287
23. Wicks, T. Susceptibility of almond and cherry rootstocks and scions to *Phytophthora* species. *Aust. J. Exp. Agric.* **1989**, 29, 103-109.

## Marciume delle radici e del colletto dell'olivo- *Phytophthora* spp.

Come conseguenza dell'espansione delle piantagioni in nuove aree con suoli pesanti e dell'uso più intensivo dell'irrigazione sia nei vivai di olivo che nelle coltivazioni commerciali, negli ultimi anni, il marciume delle radici e del colletto dell'olivo causato da *Phytophthora* (Fig. 1) sta emergendo come una seria malattia in diversi paesi olivicoli come l'Australia, l'Italia e la Spagna, (Cacciola et al. 2011). La malattia è stata segnalata dalla maggior parte dei paesi olivicoli ed è causata da diverse specie terricole di *Phytophthora*, tra cui *Phytophthora acerina*, *P. bilorbang*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. gonapodyides*, *P. inundata*, *P. megasperma*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. pini* e *P. plurivora* (Cacciola et al., 2011; Santilli et al. 2020).



**Figura 1.** Sintomi di deperimento su un albero di olivo (*Olea europaea*) cv. Nera di Gonnos causati da *Phytophthora bilorbang* in Calabria.

Il ciclo della malattia è complesso in quanto coinvolge numerose fonti di inoculo primario e secondario e diversi modi di diffusione; tutte queste caratteristiche conferiscono a questo organismo una grande plasticità. L'inoculo primario, che sopravvive come micelio, oospore e clamidospore nei tessuti infetti, causa epidemie quando le condizioni ambientali sono favorevoli e la presenza di una pianta ospite stimola le spore a germinare; le condizioni favorevoli allo sviluppo della malattia delle radici e del colletto di *Phytophthora* sono tipicamente condizioni tropicali umide. Quindi, le zoospore, che si muovono dagli sporangi, nuotano verso la radice dell'ospite in crescita e si aggregano sia appena dietro l'apice della radice, in ferite, che in aree in cui le radici si biforcano. Si incistano poco prima di infettare la radice. La cisti germoglia e inizia a differenziare le ife che crescono all'interno dell'ospite. Sebbene la saturazione del suolo sia necessaria per l'infezione, una volta che *Phytophthora* si trova nei tessuti vegetali, può continuare a colonizzare la radice anche se il suolo non è saturato e continua ad accrescersi all'interno del sistema

radicale. All'inizio, solo poche radici sottili vengono danneggiate. Successivamente, il patogeno cresce attraverso il sistema radicale in radici più grandi fino a quando non raggiunge l'area della corona delle radici dove uccide il cambio. Di conseguenza, le parti superiori della pianta cominciano a seccare e morire e la marcescenza delle radici si accelera. I sintomi possono svilupparsi rapidamente quando la richiesta di acqua della pianta aumenta durante i primi periodi secchi dell'estate. Il successo dell'infezione primaria porta alla differenziazione dell'inoculo secondario sulla superficie delle radici marcescenti. In generale, *Phytophthora* dipende dall'acqua libera per la diffusione e l'infezione e dall'attività umana per la diffusione a lunga distanza. Epidemie esplosive sono causate dal rapido aumento dell'inoculo secondario e la pendenza della curva di progresso della malattia dipende dal tasso di successo di propagazione di questi propaguli. Nelle regioni mediterranee, le temperature durante l'inverno possono limitare lo sviluppo delle infezioni radicali di specie con una temperatura ottimale più elevata come *P. nicotianae* e *P. palmivora* (Cacciola et al. 2011).

## Diagnosi

### 1.1. Sul campo - sintomi

Il marciame radicale e del colletto dell'olivo causato da *Phytophthora* si verifica di solito in alberi giovani dove in prossimità di aree soggette a inondazioni prolungate; solo occasionalmente, tuttavia, questa malattia è stata riscontrata anche su piante in terreni ben drenati. I sintomi includono clorosi e caduta prematura delle foglie, diradamento progressivo e disseccamento dell'intera chioma (Fig. 1). I sintomi sulla chioma sono causati dall'estesa necrosi delle radici e dalla conseguente riduzione del sistema radicale attivo. Quando le condizioni del terreno sono favorevoli all'infezione, può verificarsi il marciame della corona e del fusto basale che circonda l'albero, che può essere meglio osservato dissotterrando la pianta. Le piante infette deperiscono progressivamente nel corso di diversi anni o muoiono improvvisamente (Cacciola et al. 2011; Santilli et al. 2020).

#### 1.2.1 In laboratorio - isolamento dal materiale vegetale infetto

Isolamento da tessuti sintomatici (radici o frammenti del colletto). I tessuti sintomatici vengono accuratamente lavati in acqua corrente, superficialmente disinfettati in NaClO al 1% per 2 minuti, quindi immersi in EtOH al 70% per 30 secondi, sciacquati in acqua distillata sterile, asciugati e piastrati su PARPNH V8-agar (Jung et al., 1996). Dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore al buio a 25°C, si ottengono colture pure trasferendo singole ife in crescita su agar V8 (V8A) (Erwin e Ribeiro. 1996). Le colture purificate vengono infine ottenute mediante coltura monoifale su agar V8.

#### 1.2.2 In laboratorio - identificazione molecolare degli isolati

Sebbene l'identificazione degli isolati di *Phytophthora* si sia basata principalmente su chiavi sinottiche (Waterhouse. 1963; Newhook et al. 1978; Stamps et al. 1990) fondate su criteri morfologici, il basso numero di diverse microstrutture insieme alla grande variabilità intra-specifica e a caratteri comuni tra le specie rendono questi approcci inadeguati (Cacciola et al. 2011). Per questo motivo, attualmente i metodi molecolari basati su PCR rappresentano il miglior approccio per l'identificazione di isolati di *Phytophthora*.

Il prerequisito per l'applicazione della PCR è l'estrazione del DNA dalla coltura pura. A tal fine, possono essere utilizzati kit commerciali.

Il protocollo PCR convenzionale più comune per l'identificazione di isolati di *Phytophthora* consiste nell'amplificazione, sequenziamento e analisi bioinformatica dei barcode Internal Transcribed Spacer (ITS) del DNA ribosomiale (rDNA) e del citocromo ossidasi (cox) 1 del DNA mitocondriale (mtDNA) (Robideau et al. 2011). La regione ITS può essere amplificata utilizzando le coppie di primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990) o ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') (Cooke et al. 2000) / ITS4. Il barcode COX 1 può essere amplificato utilizzando i primer specifici per gli oomiceti OomCoxI-Levup (5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3') e Fm85mod (5'-RRHWACKTGA CT DATRATACCAA-3') (Robideau et al. 2011).

### 1.2.3. In laboratorio - rilevazione del materiale vegetale infetto da *Phytophthora* mediante PCR in tempo reale

A causa dell'alta variabilità delle diverse specie di *Phytophthora* coinvolte nel marciume radicale e del colletto dell'olivo, non sono suggeriti protocolli Real-Time PCR specifici per le singole specie. Una strategia più efficace prevede invece la rilevazione e quantificazione del DNA di *Phytophthora* presente nei tessuti vegetali. A tal fine, sono proposti tre saggi TaqMan RT-PCR: i. regione ITS (amplificata utilizzando il probe All\_Phy e i primers FITS\_15Ph, RITS\_279Ph); ii. regione trnM-trnP-trnM (amplificata utilizzando il probe TrnM\_PhyG\_probe2 e i primers PhyG-F2, PhyG-Rb); iii. regione atp9-nad9 (amplificata utilizzando il probe ATP9\_PhyG2\_probeR e i primers PhyG\_ATP9\_2FTail, PhyG\_R6\_Tail). I dettagli sui primers e i probe sono riportati in Puertolas et al. (2021).

### 2. Gestione

Molte ricerche dimostrano il ruolo cruciale dello stato idrico del suolo sia nella produzione di sporangi che nell'insorgenza di infezioni radicali da parte delle specie di *Phytophthora*. Poiché l'asfissia dovuta alla saturazione del terreno d'acqua predispone le radici all'infezione di questi patogeni, il marciume radicale e del colletto da *Phytophthora* è associata sia a terreni pesanti che a periodi prolungati di pioggia (Teviotdale. 2005; Cacciola et al. 2007). Di conseguenza, la gestione dell'acqua del suolo è fondamentale per il controllo di questa malattia (Cacciola et al. 2011).

La selezione e la preparazione attenta del sito di impianto potrebbero aiutare a prevenire i problemi di allagamento del suolo. Allo stesso modo, le pratiche colturali che impediscono la saturazione prolungata del suolo come la messa a dimora su dossi, il drenaggio del suolo e la gestione adeguata dell'irrigazione possono ridurre il marciume radicale e del colletto (Cacciola et al. 2011).

Le tecniche di irrigazione che prevedono l'uso di erogatori che non bagnano i tronchi e gli strumenti che misurano lo stato idrico del suolo, come i tensiometri e le sonde neutroniche, possono essere preziosi per lo sviluppo di un approccio integrato di gestione della malattia (Cacciola et al. 2011).

### 3. Bibliografia

1. Cacciola, S.O., Scarito, G., Salamone, A., Fodale, A.S., Mulè, R., Piraino, G., and Sammarco, G. **2007**. Integrated Protection of Olive Crops. A. Kalaitzaki (Eds.), IOBC/wprs Bull., 30, 251.
2. Cacciola, S.O.; Faedda, R.; Pane, A.; Scarito, G. Root and crown rot of olive caused by *Phytophthora* spp. In Olive Diseases and Disorders; Schena, L., Agosteo, G.E., Cacciola, S.O., Eds.; Transworld Research Network: Trivandrum, Kerala, India, **2011**; pp. 305-327.
3. Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, 30, 17-32
4. Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. *Phytophthora Diseases Worldwide*; APS Press—The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, **1996**; pp. 84-95, 96-144, 456-463.
5. Jung, T.; Blaschke, H.; Neumann, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Pathol.* **1996**; 26, 253-272.
6. Newhook F.J., Waterhouse G.M., and Stamps, D.J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey (UK) Mycological Papers* **1978**, 143, 20.
7. Puertolas A., Bonants P.J.M., Boa E., Woodward S. Application of Real-Time PCR for the Detection and Quantification of Oomycetes in Ornamental Nursery Stock. *Journal of Fungi*. **2021**; 7(2):87. <https://doi.org/10.3390/jof702008>
8. Robideau G.P., De Cock A.W.A.M., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H., Bala K., et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour.* **2011**; 11: 1002-1011. pmid:21689384
9. Santilli, E.; Riolo, M.; La Spada, F.; Pane, A.; Cacciola, S.O. First Report of Root Rot Caused by *Phytophthora bilobang* on *Olea europaea* in Italy. *Plants* **2020**, 9, 826. <https://doi.org/10.3390/plants9070826>
10. Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J., and Hall, G.S. Revised Tabular Key to the species of *Phytophthora*, *Mycological Papers*. **1990**; 162, 1.
11. Teviotdale, B.E. **2005**, Diseases of olive. Olive production manual 2 nd edition, G.S. Sibbett, L. Ferguson, J.L. Coviello, and M. Lindstrand (Eds.), University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, Publ. N. 3353, 119
12. Waterhouse, G.M. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew (UK), *Mycological Papers*. **1963**; 92, 22.
13. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315-322.

# Protocollo per l'analisi dei tessuti vegetali mediante spettrometria di massa di ioni secondari a tempo di volo

## Introduzione

La spettrometria di massa di ioni secondari a tempo di volo è una tecnica analitica utilizzata per analizzare la composizione superficiale dei materiali solidi a livello molecolare. La ToF-SIMS fornisce informazioni dettagliate sulla composizione elementare e molecolare e sulla distribuzione spaziale delle specie presenti sulla superficie di un campione<sup>1</sup>. Nella ToF-SIMS, un fascio di ioni primari ad alta energia, tipicamente composto da cesio o bismuto, viene diretto verso la superficie del campione. Al momento dell'impatto, gli ioni primari provocano l'emissione e la ionizzazione degli ioni secondari dalla superficie del campione. Questi ioni secondari vengono quindi estratti, accelerati e rilevati in base al loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) mediante uno spettrometro di massa a tempo di volo. Lo strumento ToF-SIMS misura i tempi di volo degli ioni secondari dalla superficie del campione al rivelatore. Il tempo di volo è direttamente proporzionale al rapporto massa/carica degli ioni, consentendone l'identificazione e la quantificazione. Scansionando il fascio di ioni primari sulla superficie del campione, ToF-SIMS può generare immagini bidimensionali che raffigurano la distribuzione spaziale di specifiche specie molecolari o elementari. Il ToF-SIMS può fornire informazioni preziose sulla composizione chimica delle superfici, come composti organici e inorganici, polimeri, metalli, semiconduttori e materiali biologici. La tecnica è ampiamente utilizzata in vari campi, tra cui la scienza dei materiali, la chimica delle superfici, l'analisi dei film sottili, la ricerca sui semiconduttori, la ricerca biomedica e la scienza forense.

Il ToF-SIMS è uno strumento prezioso per l'analisi delle superfici nel campo delle scienze vegetali e può contribuire a una migliore comprensione delle proprietà chimiche e strutturali dei campioni vegetali<sup>2</sup>. Può essere utilizzato per studiare campioni vegetali come foglie o legno, fornendo preziose informazioni sulla composizione superficiale e sulle caratteristiche chimiche del campione vegetale. Nell'analisi dei campioni vegetali, la ToF-SIMS può fornire informazioni sulla distribuzione di vari elementi, composti organici e biomolecole presenti sulla superficie. Può rilevare e identificare un'ampia gamma di specie chimiche, tra cui lipidi, zuccheri, proteine, pigmenti, lignina, cellulosa e altri componenti importanti per comprendere la composizione e la struttura di foglie, legno e altri materiali vegetali. Analizzando la composizione molecolare e la distribuzione spaziale di questi composti, la ToF-SIMS può fornire informazioni sulla fisiologia, sul metabolismo e sulle interazioni ambientali delle piante. Può essere utilizzato per studiare gli effetti di fattori ambientali, come inquinanti o patogeni, sulla chimica di superficie delle foglie. Può anche essere utile per la caratterizzazione di campioni di legno, compresa l'identificazione di diverse specie di legno, la valutazione del degrado del legno e la valutazione dei metodi di trattamento<sup>3</sup>.

## Preparazione del campione

L'analisi ToF-SIMS richiede che il campione sia posto in condizioni di vuoto. Il motivo principale è che il campione viene bombardato con un fascio di ioni primari e gli ioni secondari risultanti vengono rilevati e analizzati. Il funzionamento dello strumento in condizioni di vuoto assicura che gli ioni secondari possano viaggiare liberamente verso il rivelatore senza significative dispersioni o interferenze da parte delle molecole di gas. Le condizioni di vuoto possono potenzialmente causare alcuni problemi o artefatti quando si analizzano campioni vegetali con ToF-SIMS, quali:

1 Benninghoven, A. (1994). Chemical analysis of inorganic and organic surfaces and thin films by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(10), 1023-1043.

2 Perkins, M. C., Bell, G., Briggs, D., Davies, M. C., Friedman, A., Hart, C. A., ... & Rutten, F. J. M. (2008). The application of ToF-SIMS to the analysis of herbicide formulation penetration into and through leaf cuticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(1), 1-13.

3 La Spada, F., Pane, A., Licciardello, A., Deboudi, A., Tuccitto, N., & Cacciola, S. O. (2022). A super absorbent polymer containing copper to control *Plenodomus tracheiphilus* the causative agent of mal secco disease of lemon. *Frontiers in Microbiology*, 13, 987056.

- Disidratazione del campione: Le condizioni di vuoto possono causare l'evaporazione dei composti volatili, con conseguente disidratazione del campione. I campioni vegetali, come le foglie o il legno, spesso contengono umidità e componenti volatili che possono andare persi durante il processo di vuoto. La disidratazione può influire sulla composizione superficiale del campione e alterare la distribuzione di alcuni composti.
- Cambiamenti strutturali: I campioni vegetali possono subire cambiamenti strutturali sottovuoto a causa della rimozione dell'umidità o delle variazioni di pressione. Queste alterazioni strutturali possono avere un impatto sulla chimica di superficie e sulla composizione complessiva del campione, influenzando potenzialmente i risultati dell'analisi ToF-SIMS.

Per attenuare questi problemi, è possibile adottare alcune precauzioni quando si analizzano campioni vegetali con ToF-SIMS sottovuoto:

- Ridurre al minimo il tempo di esposizione al vuoto per ridurre gli effetti della disidratazione.
- Considerare tecniche criogeniche o metodi alternativi di preparazione del campione per preservarne lo stato nativo.
- Utilizzare tecniche appropriate di manipolazione dei campioni e garantire un ambiente pulito per il vuoto per ridurre al minimo i rischi di contaminazione.

È importante valutare i requisiti specifici dello studio e consultare operatori esperti per determinare l'approccio più adatto per analizzare i campioni vegetali riducendo al minimo i potenziali effetti negativi delle condizioni di vuoto.

Le tecniche criogeniche per la preparazione dei campioni prevedono di sottoporre il campione a basse temperature utilizzando criogeni, come l'azoto liquido. Queste tecniche sono utilizzate per preservare lo stato nativo dei campioni e ridurre al minimo qualsiasi potenziale cambiamento o artefatto durante l'analisi<sup>4</sup>. Ecco alcune tecniche criogeniche utilizzate nella preparazione dei campioni:

**Criofissazione:** La criofissazione consiste nel congelare rapidamente il campione vegetale utilizzando azoto liquido o altri criogeni. Questa tecnica aiuta a immobilizzare la struttura del campione e a preservarne le proprietà in un momento specifico. La criofissazione è spesso utilizzata nella microscopia elettronica per catturare i campioni nel loro stato nativo, fornendo immagini ad alta risoluzione senza alterazioni strutturali significative.

**Criosezione:** La criosezione è una tecnica utilizzata per ottenere fette sottili (sezioni) di un campione congelato. Il campione vegetale viene incorporato in un mezzo, come una resina o una gelatina, e congelato rapidamente con azoto liquido. Il blocco congelato viene quindi sezionato con un criostato, che consente di tagliare con precisione il campione a basse temperature. La criosezione è comunemente utilizzata in varie applicazioni, tra cui l'istologia e la preparazione di campioni biologici per l'imaging o l'analisi.

**Criomicrotomia:** La criomicrotomia è simile alla criosezione, ma è utilizzata specificamente per tagliare sezioni sottili di campioni da analizzare al microscopio. Il campione viene congelato e un microtomo dotato di una camera criogenica viene utilizzato per tagliare fette sottili del campione mantenendo basse le temperature. La criomicrotomia è spesso utilizzata nella scienza dei materiali, nella biologia e in altri campi in cui la conservazione della struttura del campione è fondamentale.

**Crioinclusione:** La crioinclusione consiste nell'incorporare il campione in un mezzo crioprotettivo, come un composto OCT (Optimal Cutting Temperature) o una resina, e nel congelarlo per la successiva analisi. Il campione crioincluso può essere sezionato, montato e sottoposto a varie tecniche analitiche mantenendo l'integrità della struttura del campione.

Utilizzando tecniche criogeniche, i campioni possono essere conservati nel loro stato nativo,

<sup>4</sup> Passarelli, M. K., & Winograd, N. (2011). Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 976-990.

riducendo al minimo la disidratazione, i cambiamenti strutturali e altri artefatti che possono verificarsi durante i metodi tradizionali di preparazione dei campioni. La preparazione criogenica dei campioni è particolarmente utile per gli studi che coinvolgono campioni delicati o sensibili alla temperatura, come tessuti biologici, polimeri e materiali morbidi.

### Condizioni di analisi

Il danno da fascio ionico può verificarsi quando si analizzano campioni vegetali con tecniche come ToF-SIMS. Gli ioni primari ad alta energia della ToF-SIMS possono causare lo sputtering, ovvero la rimozione fisica di atomi o molecole dalla superficie del campione. Lo sputtering può portare alla perdita di strati superficiali, compresi i composti organici e le biomolecole. Ciò può influire sulla rappresentazione della reale composizione superficiale del campione e alterare la distribuzione spaziale di alcuni componenti. La deposizione di energia da parte del fascio di ioni può indurre modifiche strutturali nei campioni vegetali. Gli ioni possono rompere i legami chimici, alterare la disposizione delle molecole e causare cambiamenti nella morfologia della superficie del campione. Queste modifiche strutturali possono avere un impatto sulla chimica di superficie e alterare la distribuzione delle specie chimiche. Il fascio di ioni può anche indurre trasformazioni chimiche nel campione vegetale. Gli ioni ad alta energia possono rompere o riorganizzare i legami chimici, portando alla formazione di nuove specie chimiche o alla modifica di quelle esistenti. Ciò può provocare artefatti chimici o la produzione di composti secondari che non erano originariamente presenti sulla superficie del campione.

Per mitigare questi effetti, è importante considerare attentamente le condizioni del fascio ionico utilizzato nell'analisi. L'ottimizzazione dell'energia, della dose e delle dimensioni del fascio di ioni può aiutare a minimizzare l'entità dei danni causati ai campioni vegetali. È inoltre importante selezionare parametri di analisi appropriati per garantire che i dati ottenuti rappresentino accuratamente la composizione superficiale del campione. Inoltre, è possibile utilizzare tecniche complementari per corroborare e integrare i risultati ottenuti dall'analisi del fascio ionico. Tecniche come la microscopia, la spettroscopia o le tecniche di imaging che non coinvolgono fasci di ioni ad alta energia possono fornire ulteriori approfondimenti sulla struttura e sulla composizione dei campioni vegetali, contribuendo a convalidare i risultati ottenuti dall'analisi a fascio ionico.

La comprensione dei potenziali effetti del danneggiamento del fascio ionico e l'attento controllo delle condizioni sperimentali sono fondamentali per un'accurata interpretazione dei risultati e per ottenere informazioni significative sulla composizione superficiale dei campioni vegetali. I fasci di ioni cluster possono offrire alcuni vantaggi nell'analisi di campioni vegetali o di altri materiali sensibili<sup>5</sup>. Sono costituiti da cluster di atomi o molecole invece che da singoli ioni e possono offrire vantaggi rispetto ai fasci di ioni monoatomici, come la riduzione degli effetti di sputtering e di danno. I fasci di ioni cluster possono migliorare il rilevamento e la caratterizzazione di specie molecolari su campioni vegetali. Le maggiori dimensioni del cluster e l'impatto collettivo di più atomi o molecole in un cluster possono promuovere il desorbimento di frammenti molecolari intatti, fornendo informazioni molecolari più complete sul campione. Le dimensioni maggiori e la minore energia per atomo costituente determinano un'energia di deposito specifica che può indurre meno danni strutturali ai campioni vegetali. Ciò può contribuire a preservare l'integrità della struttura del campione, a minimizzare le trasformazioni chimiche e a fornire una rappresentazione più accurata della composizione della superficie. I fasci di ioni cluster possono migliorare la sensibilità di rilevamento di alcune specie sui campioni vegetali. La maggiore efficienza di desorbimento e ionizzazione dei cluster può portare a un aumento dell'intensità del segnale, consentendo la rilevazione di componenti a bassa abbondanza o in tracce che possono essere di interesse per l'analisi. Tuttavia, è importante notare che la scelta del fascio ionico, sia esso monoatomico o a cluster, dipende dai requisiti specifici dell'analisi e dalla natura del campione vegetale da studiare. Le condizioni ottimali del fascio di ioni devono essere attentamente selezionate per bilanciare l'esigenza di una sufficiente intensità del segnale, di un danno minimo e di una rappresentazione accurata della composizione superficiale del campione.

5 Winograd, N. (2005). The magic of cluster SIMS.

## Trattamento dei dati

L'analisi ToF-SIMS di campioni vegetali acquisiti utilizzando fasci di cluster produce probabilmente un insieme di dati molto ricco e complesso. L'analisi multivariata può essere molto utile per gestire e interpretare i complessi set di dati ottenuti dall'analisi ToF-SIMS<sup>6</sup>. L'analisi delle componenti principali (PCA) è una tecnica di analisi multivariata ampiamente utilizzata che può essere applicata ai dati ToF-SIMS per ridurre la dimensionalità, identificare modelli ed estrarre informazioni significative.

I dati ToF-SIMS spesso comprendono un gran numero di variabili (valori di intensità per ogni rapporto m/z). La PCA può condensare questo insieme di dati ad alta dimensione in un numero inferiore di componenti principali (PC), conservando la maggior parte della variazione rilevante dei dati. Questa riduzione della dimensionalità semplifica l'interpretazione e la visualizzazione dei dati. La PCA consente di esplorare i modelli e le somiglianze intrinseche del set di dati ToF-SIMS. Tracciando i campioni o le variabili nello spazio delle componenti principali, è possibile identificare cluster, tendenze o outlier che possono corrispondere a gruppi di campioni distinti, caratteristiche chimiche o composizioni superficiali. Questo aiuta a comprendere la struttura sottostante dei dati. La PCA aiuta a identificare le variabili più influenti (rapporti m/z) che contribuiscono alla variazione osservata nel set di dati. I valori di carico associati a ciascuna componente principale indicano il peso delle diverse variabili. Le variabili ad alto carico possono indicare rapporti m/z significativi per la differenziazione dei campioni o per cogliere differenze chimiche fondamentali. La PCA può essere utilizzata per la classificazione o la discriminazione dei campioni vegetali in base ai loro dati ToF-SIMS. Assegnando i campioni a gruppi o categorie specifiche utilizzando campioni di riferimento noti, la PCA può facilitare l'identificazione di somiglianze o differenze tra gruppi di campioni, favorendo la classificazione e la caratterizzazione. Prima della PCA, possono essere necessarie opportune fasi di pre-elaborazione dei dati, come la normalizzazione o il ridimensionamento, per rimuovere variazioni sistematiche o artefatti nel set di dati. In questo modo si garantisce che i risultati della PCA non siano falsati da fattori non correlati alla composizione del campione sottostante. Vale la pena notare che la PCA è solo una delle molte tecniche di analisi multivariata disponibili per i dati ToF-SIMS derivanti da set di dati vegetali. Altri metodi, come la regressione ai minimi quadrati (PLS) o gli algoritmi di clustering, possono essere utilizzati a seconda degli obiettivi e delle caratteristiche specifiche del set di dati. Le tecniche di analisi multivariata come la PCA possono estrarre efficacemente informazioni significative, rivelare schemi nascosti e aiutare l'interpretazione di insiemi di dati ToF-SIMS complessi, consentendo una comprensione più approfondita della composizione superficiale e della chimica dei campioni analizzati.

6 Tuccitto, N. (2018). Automated data mining of secondary ion mass spectrometry spectra. *Journal of Chemometrics*, 32(3), e2968.

# Protocollo di estrazione dei polifenoli del guscio di mandorla

## Introduzione

I composti fenolici sono presenti in diversi tipi di frutta a guscio e offrono diverse proprietà benefiche. Numerosi studi hanno dimostrato che questi composti hanno un impatto positivo sulla salute umana, offrendo effetti cardioprotettivi, neuroprotettivi, antidiabetici, antinfiammatori e antiossidanti. La valorizzazione degli scarti di mandorla e dei suoi sottoprodotti, ricchi di polifenoli, è emersa come una soluzione promettente per soddisfare la domanda di questi composti attivi.

## Obiettivo

Estrazione di sostanze naturali e biologicamente attive, che possono essere utilizzate per il controllo delle malattie delle piante e/o per scopi terapeutici nelle malattie umane e animali.

## Metodi

### 1- Metodologia per l'isolamento dei tegumenti (involucro)

Le mandorle intere vengono sgusciate e private del mallo. I semi di mandorla sono sottoposti al seguente protocollo sperimentale: Metodo di congelamento-scongelamento per isolare le bucce naturali delle mandorle (Mandalari et al., 2010a). Questa fase prevede il congelamento dei semi a  $-20^{\circ}\text{C}$  e il successivo scongelamento a  $4^{\circ}\text{C}$  (Mandalari et al., 2010a).

Le bucce delle mandorle vengono poi rimosse e lasciate asciugare all'aria. Vengono poi macinate con un mortaio e infine conservate al buio.

### 2- Estrazione dei lipidi totali (metodo Soxhlet)

Una fase preliminare di estrazione con il metodo Soxhlet a riflusso viene effettuata per rimuovere lipidi e pigmenti (Milbury et al., 2006) e per minimizzare il contenuto di olio nell'estratto secco.

Per determinare la resa in olio, il contenuto di grasso è stato estratto con il metodo del riflusso di Soxhlet, che massimizza la rimozione dell'olio dall'estratto secco. Sei grammi di bucce di mandorle macinate vengono inseriti in una cartuccia e introdotti in un estrattore Soxhlet, dotato di un pallone a fondo tondo da 250 mL alla base, contenente 220 mL di etere di petrolio. Il solvente viene riscaldato a circa  $55^{\circ}\text{C}$  per una durata di 6 ore. Una volta completata l'estrazione, il solvente ottenuto viene evaporato sotto vuoto a  $40^{\circ}\text{C}$  con un evaporatore rotante, dove ogni traccia di solvente residuo viene rimossa dall'olio estratto. Il risultato di questo processo è la frazione delipidata.

### 3- Estrazione dei polifenoli

La preparazione degli estratti polifenolici è stata effettuata utilizzando il metodo di macerazione indicato da Stankovi (2011) con lievi modifiche.

Cinque grammi di bucce di mandorle essiccate sono stati mescolati in matracci con 50 mL di etanolo (96%), un solvente polare (Mandalari et al., 2013). Dopo aver agitato le beute in un incubatore per 1 ora a temperatura ambiente, la miscela è stata lasciata in infusione per 24 ore al buio, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il contenuto delle beute è stato poi filtrato attraverso la carta da filtro Whatman n. 1 e i residui sono stati riestratti con un uguale volume di solvente. Dopo 48 ore, il processo è stato ripetuto e i surnatanti sono stati combinati e fatti evaporare sotto vuoto a  $40^{\circ}\text{C}$  con un evaporatore rotante (Babbar et al., 2011). Gli estratti ottenuti sono stati essiccati sotto una corrente di azoto e conservati a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 4- Quantificazione dei polifenoli totali con il metodo Folin-Ciocalteu

In ambiente alcalino, i polifenoli riducono il reattivo di Folin-Ciocalteu (F-C) - un complesso di acido fosfotungstico/fosfomolibdico (colore giallo) - in ossido di tungsteno e molibdeno (colore blu). La colorazione risultante, misurata mediante spettrofotometria a 760 nm, è proporzionale alla quantità di polifenoli presenti nel mezzo di reazione. I polifenoli totali sono stati determinati con il metodo di Folin Ciocalteu modificato da Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós

(1999). 200  $\mu\text{L}$  di estratto sono stati diluiti a 1 mL con acqua Milli-Q, quindi miscelati con 5 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu (1:10) e 4 mL di carbonato di sodio (1N). Dopo 1 ora, la miscela è stata misurata con uno spettrofotometro UV (Shimadzu, UV-1700) a 760 nm. I campioni sono stati preparati in triplo. I risultati sono stati espressi come equivalenti di acido gallico (GAE) facendo riferimento alla curva standard dell'acido gallico.

### **5- Quantificazione dei flavonoidi totali**

Il metodo utilizzato in questo test è quello descritto da Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) e modificato da Jahanban-Esfahlan e Jamei (2012). Si basa sulla reazione degli ioni di alluminio con le molecole di flavonoidi in condizioni basiche.

Il test è stato eseguito con una leggera modifica. Un totale di 1,5 mL dell'estratto è stato aggiunto a 450  $\mu\text{L}$  di  $\text{NaNO}_2$  al 5,3%, 900  $\mu\text{L}$  di  $\text{AlCl}_3\text{-H}_2\text{O}$  al 10% e 4 mL di  $\text{NaOH}$  1 M. La miscela viene agitata e lasciata riposare per 5 minuti prima di ogni aggiunta. Il volume finale viene portato a 15 mL con acqua Milli-Q. L'assorbanza viene misurata a 510 nm. I risultati sono espressi in mg di catechina equivalente per 1 g di massa secca (mg EC/g MS) (Kamtekar et al. 2014) determinati dalla curva di calibrazione della catechina.

### **6- Valutazione dell'attività antiossidante**

#### **6.1- Attività antiossidante totale**

Questo test si basa sulla riduzione del molibdeno (VI) a molibdeno (V) in ambiente acido da parte del potere antiossidante dell'estratto, che induce la formazione del complesso fosfato/Mo di colore verde (Prieto et al. 1999).

100  $\mu\text{L}$  di estratto di buccia di mandorla sono stati mescolati con 1 mL di una soluzione composta da acido solforico (0,6 M), fosfato di sodio (28 mM) ed eptamolibdato di ammonio (4 mM). La miscela è stata poi incubata in un bagno d'acqua a 95°C per 90 minuti. L'assorbanza è stata poi misurata a 695 nm.

L'attività antiossidante totale è stata espressa in mg di acido gallico equivalente per grammo di sostanza secca (mg EAG/g MS), determinata dall'equazione della curva di calibrazione standard.

#### **6.2- L'attività inibitoria del radicale DPPH-**

Il potenziale antiradicalico di un campione si riflette misurando l'attività inibitoria del radicale DPPH- (Scherer et Godoy. 2009).

Il DPPH- (2,2-difenil-1-picrilidrazile) è un radicale sintetico di colore viola intenso che assorbe nel dominio del visibile a una lunghezza d'onda di 517 nm (Binsan et al., 2008; Brand-Williams et al., 1995). Il test misura la capacità di un antiossidante (AH, generalmente composti fenolici) di ridurre il radicale chimico DPPH- (2,2-difenil-picrilidrazile) trasferendo un idrogeno all'atomo di azoto del radicale DPPH-, il che si manifesta con una decolorazione della soluzione che diventa gialla (Gülçin et al., 2006). Questa decolorazione spiega la capacità degli estratti di buccia di mandorla di intrappolare questo radicale, rilevato da uno spettrofotometro UV-visibile a 517 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  DPPH-).

La misurazione del potere antiradicalico mediante intrappolamento del radicale DPPH è stata effettuata secondo il protocollo descritto da Koh et al. (2011) con modifiche. 900  $\mu\text{L}$  di una soluzione etanolica di DPPH (60  $\mu\text{M}$ ), con un'assorbanza iniziale di circa 0,6 a 517 nm a temperatura ambiente, sono stati miscelati con 100  $\mu\text{L}$  di diverse concentrazioni di ciascun estratto da testare (0, 10, 20, 60, 100, 140, 180, 220, 260 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Dopo aver agitato, le provette sono state incubate per 30 minuti al buio, quindi le assorbanze dei campioni sono state misurate a  $\lambda_{\text{max}} = 517$  nm. La soluzione di controllo è stata preparata aggiungendo 100  $\mu\text{L}$  di etanolo a 900  $\mu\text{L}$  di soluzione di DPPH. Il controllo positivo è stato rappresentato da una soluzione dell'antiossidante standard Trolox (acido 3,4-diidro-6-idrossi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopirano-2-carbossilico), la cui assorbanza è stata misurata nelle stesse condizioni del campione in esame.

### 6.3- Saggio FRAP

La capacità antiossidante è stata misurata secondo Benzie e Strain (1996). Un volume di reagente FRAP, preparato con l'83,3% di acetato di ammonio (300 mM; pH = 3,6) e il 16,7% della miscela (50:50) di reagente tripiridiltriazina (TPTZ) in 40 mM di HCl e 20 mM di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , è stato riscaldato a 37°C per 30 minuti. L'assorbanza a 593 nm è stata registrata come dato iniziale. Quindi è stato aggiunto 1 mL di estratto antiossidante e, una volta completata la reazione cinetica, è stata misurata l'assorbanza finale. I risultati sono stati espressi in  $\mu\text{mol}$  di solfato ferroso eptaidrato ( $\text{Fe}^{2+}$ ) per 100 g di campione umido.

Un volume di 0,2 mL di ciascuno degli estratti a diverse concentrazioni, 0,5 mL di tampone fosfato (0,2 M, pH 6,6) e 0,5 mL di ferricianuro di potassio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; 1%) sono stati miscelati e incubati a 50°C per 20 minuti per ridurre il  $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$  a  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ . La reazione è stata arrestata con l'aggiunta di 0,5 mL di acido tricloroacetico al 10% (p/v), seguita da centrifugazione a 1000 rpm per 10 minuti. Infine, 1 mL dello strato superiore viene miscelato con un volume uguale di acqua distillata e 0,2 mL di cloruro di ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ; 0,1%). Le letture dell'assorbanza vengono effettuate rispetto a un bianco senza estratto a 700 nm. In questo esperimento, l'acido ascorbico (AA) è stato utilizzato come controllo positivo alle stesse concentrazioni scelte e nelle stesse condizioni operative. Sono stati tracciati i grafici di assorbanza ottenuti per le diverse concentrazioni utilizzate. Un aumento dell'assorbanza corrisponde a un aumento del potere riducente delle frazioni testate. La concentrazione efficace ( $\text{EC}_{50}$ ), definita come la concentrazione che fornisce 0,5 di assorbanza, è un indice utilizzato per confrontare ed esprimere le capacità riducenti dei composti fenolici (Wu et al., 2015).

### 7. Determinazione dei composti flavonoidi mediante HPLC

L'identificazione e la quantificazione dei composti fenolici sono state eseguite mediante cromatografia liquida utilizzando l'estratto iniziale concentrato con una corrente di azoto. L'estratto è stato filtrato (Nylon, 0,45  $\mu\text{m}$ , 0,25 mm) prima di essere iniettato nel cromatografo.

È stato utilizzato un HPLC serie 1100 con un rivelatore diode array (DAD) e un rivelatore a fluorescenza (FLD), serie 1200 (Agilent Technologies). La fase mobile è stata preparata con acqua Milli-Q acidificata con l'1% di acido formico (A = fase acquosa) e metanolo (B = fase organica).

I composti sono stati separati secondo il seguente gradiente, espresso come percentuale di A: 0-1 min fino al 95%, 1-25 min fino all'80%, mantenuto per 5 min, 30-90 min fino allo 0%, mantenuto per 10 min. Tra le due iniezioni consecutive è stato necessario un periodo di 40 minuti per equilibrare la colonna. La colonna utilizzata è stata una colonna Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) con una velocità di flusso costante di 1 mL/min e un volume di iniezione di 100  $\mu\text{L}$ . Per l'identificazione e la quantificazione dei flavonoidi, i segnali DAD sono stati registrati alle lunghezze d'onda di 280 e 360 nm e FLD a 230 e 310 nm, rispettivamente per l'eccitazione e l'emissione. Lo standard interno era la daidzeina, un isoflavone presente negli alimenti di origine vegetale (Bolling et al., 2010). I risultati sono stati espressi in mg di composti fenolici per 100 g di peso fresco.

### Bibliografia

1. Babbar, N., Oberoi, H.S., Uppal, D.S., Patil, R.T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44 : 391- 396.
2. Benzie, I.F., Strain, J. (1966). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
3. Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., and Kishimura, H. (2008). Antioxidative activity of Mun-goong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 106 (1) :185-193.
4. Bolling, B.W., Dolnikowski, G., Blumberg, J.B., Oliver, C.Y. (2010) Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry*, 122, 819-825.
5. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 28, 25-30.
6. Gülçin İ., Mshvildadze V., Gepdiremen A., Elias R. (2006). The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-( $\beta$ -Dglucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*, 20(2): 130-134.
7. Jahanban-Esfahlan, A., Jamei, R. (2012). Properties of biological activity of ten wild almond (*Prunus amygdalus* L.) species. *Turkish Journal of Biology*, 36, 201-209.
8. Kamtekar, S., Keer, V., Patil, V. (n.d.). (2014). Estimation of Phenolic content, Flavonoid content, Antioxidant and Alpha amylase

- Inhibitory Activity of Marketed Polyherbal Formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5.
9. **Koh, P. H., Mokhtar, R. A. M., Iqbal, M. (2011)**. Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity. *Human & Experimental Toxicology*. 31(1), 81-91.
  10. **Mandalari, G., Faulks, R. M., Bisignano, C., Waldron, K. W., Narbad, A., & Wickham, M. S. J. (2010b)**. In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis* L.). *FEMS Microbiology Letters*, 304(2), 116-122.
  11. **Mandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Lo Turco, V., Cacciola, F., Rich, G.T., Bisignano, C., Saija, A., Dugo, P., Cross, K.L., Parker, M.L., Waldron, K.W., Wickham, M.S.J. (2010a)**. Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 23: 166-174.
  12. **Mandalari, G., Arcoraci, T., Martorana, M., Bisignano, C., Rizza, L., Bonina, F. P., Trombetta, D., and Tomaino, A. (2013)**. Antioxidant and Photoprotective Effects of Blanch Water, a Byproduct of the Almond Processing Industry. *Molecules*, 18, 12426-12440.
  13. **Milbury, P.E., Chen, C.Y., Dolnikowski, G.G., Blumberg, J.B. (2006)**. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 027- 33.
  14. **Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999)**. Spectrophotometric Quantitation of antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex : Specific Application to The Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* ; 269 : 337-341.
  15. **Scherer, R., et Godoy, H. T. (2009)**. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-di-phenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* ; 112 (3) : 654-658.
  16. **Stankovi, M. S. (n.d.). (2011)**. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. Extracts. *Kragujevac Journal of Science*. 33 : 63-72.
  17. **Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999)**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*. 299, 152-178.
  18. **Wu, P., Ma, C., Li, N., Deng, Q., Yin, Y., Huang, R. (2015)**. Investigation of In vitro and In vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chemistry*. 173:194-202.
  19. **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999)**. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64, 555-559.

# Il prossimo 14 e 15 Novembre a Tunisi si terrà l'evento finale di Prometeo.



## Siete pronti?

# Informazioni generali su PROMETEO

## Beneficiario principale

Università degli Studi di Catania (UNICT)

## Partner

**P2:** Université de Tunis El Manar (UTM)

**P3:** Centre Technique des Agrumes (CTA)

**P4:** Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT)

**P5:** Agence Nationale de Promotion de la Recherche scientifique (ANPR)

**P6:** Comune di Palazzolo Acreide (PALAZZOLO)

**P7:** Centro di Ricerca per l'Innovazione e Diffusione della conoscenza (CERID)

**P8:** Expergreen S.R.L. (EXPERGREEN)

## IL PROGETTO PROMETEO IN CIFRE

Durata	<b>24 mesi</b>
Avvio del progetto	<b>29/10/2021</b>
Completamento	<b>28/10/2023</b>
Partner di progetto	<b>8</b>
Budget totale	<b>1.459.103,08 €</b>
Contributo UE	<b>1.291.659,13 €</b>

## LE ATTIVITÀ DEL PROGETTO PROMETEO

Numero eventi di diffusione e incontri tematici realizzati	<b>5</b>
Partecipanti coinvolti	<b>450+</b>
Sito web di progetto	<b>1</b>
Canali social	<b>4</b>

## I NOSTRI CONTATTI

**Sito del progetto:** <https://www.prometeo-italietunisie.eu>

**Indirizzo e-mail:** [info@prometeo-italietunisie.eu](mailto:info@prometeo-italietunisie.eu)

**Facebook:** <https://www.facebook.com/Prometeo.ItalieTunisie>

**Instagram:** [https://www.instagram.com/prometeo\\_italietunisie/](https://www.instagram.com/prometeo_italietunisie/)

**Twitter:** [https://twitter.com/prometeo\\_ItaTun](https://twitter.com/prometeo_ItaTun)

**Youtube:** <https://www.youtube.com/@prometeoitalietunisie4919>



Questo documento è stato creato e mantenuto con il supporto finanziario dell'Unione Europea nell'ambito del Programma ENI di Cooperazione Transfrontaliera (CT) "Italia-Tunisia" 2014-2020. Il suo contenuto è di esclusiva responsabilità del CERID e non riflette necessariamente le opinioni dell'Unione Europea e/o dell'Autorità di Gestione.