



DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA VITA**

CICLO XXXIV

COORDINATORE Prof. Massimo Valoti

CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E GENETICA DI PIANTE DI  
GOJI (*Lycium barbarum* L.) COLTIVATE IN TOSCANA E ANALISI  
NUTRACEUTICA DEI FRUTTI

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE: BIO/03

TUTOR: Dr. Claudio Cantini

DOTTORANDO: Dr. Letizia Poggioni

CO-RELATORE: Prof. Giampiero Cai

A.A. 2018-2021

# Indice

	Pag.
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>7</b>
1.1. Il genere <i>Lycium</i> : aspetti filogenetici	7
1.2. Goji: caratteristiche botaniche	8
1.3. Il Goji tra tradizione e breeding	9
1.4. I marcatori molecolari microsatelliti (SSR) nelle piante	10
1.5. Diversità molecolare nel Goji	12
1.6. Nutraceutici, <i>functional food</i> e composti funzionali	14
1.7. Dagli usi tradizionali ai recenti studi farmacologici: il Goji come <i>functional food</i>	15
1.8. Il Goji in Italia ed Europa	18
<b>2. Scopo della tesi</b>	<b>21</b>
<b>3. Materiali e metodi</b>	<b>22</b>
3.1. Area di studio	22
3.2. Dati termometrici e pluviometrici	22
3.3. Elaborazione <i>de novo</i> di una scheda morfologica specifica per la specie <i>Lycium barbarum</i> .	23
3.4. Campionamenti	25
3.4.1. Campionamento del materiale fogliare	25
3.4.2. Campionamento dei frutti	25
3.5. Estrazione del DNA	25
3.6. Marcatori molecolari	26
3.7. Protocollo PCR e sequenziamento	26
3.8. Preparazione degli estratti da frutto per i saggi colorimetrici spettrofotometrici	28
3.9. Analisi spettrofotometriche	28
3.9.1. Metodo FRAP	28
3.9.2. Metodo Folin-Ciocalteu	29
3.9.3. Metodo dei Sali di alluminio	29
3.10. Analisi HPLC	30
3.10.1. Analisi dei carotenoidi	30
3.10.2. Analisi dei polifenoli	30
3.10.3. Analisi degli zuccheri	31
3.10.4. Analisi degli aminoacidi	31
3.11. Analisi dei dati	32
3.11.1. Dati morfologici	32
3.11.2. Dati molecolari	32
3.11.3. Dati biochimici	33
<b>4. Risultati e discussione</b>	<b>34</b>
4.1. Analisi morfologica	34

4.1.1. Aspetto della pianta	34
4.1.2. La foglia	37
4.1.3. Il fiore	40
4.1.4. Il frutto	41
4.2. Analisi molecolare	47
4.2.1. Diversità genetica	48
4.2.2. Differenziazione genetica e distanza	49
4.2.3. Analisi della struttura	50
4.3. Analisi nutraceutica	54
4.3.1. Analisi spettrofotometriche colorimetriche	55
4.3.2. Analisi del profilo dei composti fenolici	61
4.3.3. Analisi del profilo dei carotenoidi	66
4.3.4. Analisi del profilo degli zuccheri	71
4.3.5. Analisi del profilo degli aminoacidi liberi	77
4.3.6. Correlazioni tra composti funzionali e parametri ambientali	81
<b>5. Conclusioni</b>	<b>84</b>
5.1. Analisi morfologica	84
5.2. Analisi molecolare	84
5.3. Analisi nutraceutica	85
5.4. Conclusioni generali	86
<b>Bibliografia</b>	<b>87</b>

## Abstract

*Lycium barbarum* L., commonly known as Goji, is a shrub belonging to the *Solanaceae* family, which includes many of the most important agricultural species in the World, such as potatoes, tomatoes, peppers, aubergines and tobacco.

Fruits, leaves, root bark and young shoots have been widely used in traditional Asian medicine for centuries and today represent a new frontier in medicine, nutraceuticals and functional foods, exploiting their beneficial properties.

Thanks to these therapeutic capacities and its adaptability to different environments, *L. barbarum* has acquired economic significance worldwide in recent decades. It can grow on our peninsula and since the early 2000s many farms turned to this new cultivation with the aim of marketing a 100% Italian product.

Since there is a lack of information on these plants grown in Italy, the aim of this PhD project was to study the genetic diversity and the morphological and nutraceutical characteristics of a set of plants derived from seed grown in an organic orchard located in Maremma, with the final aim of obtaining as much information as possible and making the most of their potential locally and on the Italian territory.

From a morphological point of view, the plants present a great diversity in habit, vigour and shape and size of the fruits and leaves. Compared to literature, the number of seeds is not only much more variable, but also much higher on average, and appears to be a character dependent on external factors. The shape of the fruit, on the other hand, remains constant from year to year and helps in a more immediate way to discriminate between the plants; four fruit shapes were found (oval, flat apex, round, chili pepper). Four clusters of plants were created based on the shape of the fruit (morphotypes), and then they were sampled in subsequent fruiting seasons for nutraceutical characterization.

For the molecular analysis, a set of microsatellite markers (SSR), never used before on this species in Europe, was developed. About 100 genomes were analyzed, seven of which belonged to accessions of known species (*L. barbarum* and *L. chinense*) from European Botanical Gardens. The analysis did not identify differences between the plants grown in the studied plantation, which constitute a homogeneous and separate population with respect to accessions with the reference genomes. Also, it derives from two different ancestral populations. Moreover, the morphotypes do not differ each other from a genetic point of view, and therefore cannot be traced back to different landraces or cultivars.

From a nutraceutical point of view, the high presence of beneficial substances and antioxidants is confirmed, although in lower concentrations than the values recorded in the native Asian countries, but in line with those of the European literature. The various morphotypes do not have so substantial differences between them, suggesting that they belong to the same cultivar and that the difference in

shape of the fruit does not influence the nutraceutical characteristics. Different years have instead led to significant differences, suggesting that climatic factors are decisive for these characteristics: the highest values of many compounds were recorded in 2019, that was the warmest and the wettest year. The fruiting season and its climatic trend also seem to have a decisive influence on the presence and concentration of some metabolites. This was important in understanding when fruits reached their highest nutraceutical potential: in fact, for the content of total antioxidants and flavonoids the best time seems to be the beginning of the fruiting season (July), while the total polyphenols and zeaxanthin have their peaks in September. This aspect can provide good indications for choosing the best time for harvesting based on the intended use of the product.

In conclusion, this information could be used together with the descriptors list and the set of SSR markers to characterize other accessions grown in Italy and to design breeding and conservation programs and for the traceability and sustainable use of the resources deriving from these plants.

\*\*\*

*Lycium barbarum* L., comunemente conosciuto come Goji, è un arbusto appartenente alla famiglia delle Solanacee, che comprende molte delle specie agricole più importanti del mondo, come patate, pomodori, peperoni, melanzane e tabacco.

Frutti, foglie, corteccia di radice e giovani germogli sono da secoli ampiamente utilizzati nella medicina tradizionale asiatica e oggi rappresentano una nuova frontiera nella medicina, nella nutraceutica e negli alimenti funzionali, che ne sfruttano le proprietà benefiche.

Grazie a queste capacità terapeutiche e alla sua adattabilità a diversi ambienti e climi, *L. barbarum* ha acquisito importanza economica a livello mondiale negli ultimi decenni. Esso può crescere anche nella nostra penisola e dai primi anni 2000 molte aziende agricole si sono orientate verso questa nuova coltivazione con l'obiettivo di commercializzare un prodotto 100% italiano.

Poiché mancano informazioni su queste piante coltivate in Italia, lo scopo del mio progetto di dottorato è stato quello di studiare la diversità genetica e le caratteristiche morfologiche e nutraceutiche di un insieme di piante derivate da seme coltivate in un frutteto biologico situato in Maremma, col fine ultimo di ottenere quante più informazioni possibile e sfruttarne al meglio il potenziale localmente e sul territorio italiano.

Dal punto di vista morfologico le piante presentano una grande variabilità nel portamento, vigoria e forma e dimensione di frutti e foglie. Rispetto alla letteratura, il numero di semi nel frutto non solo è molto più variabile, ma anche mediamente molto più alto, e sembra essere un carattere dipendente da fattori esterni. La forma del frutto invece rimane costante di anno in anno e aiuta in modo più immediato

a discriminare tra le varie piante. Sono state trovate quattro forme di frutto (ovale, apice piatto, tondo, peperoncino) e sono stati creati quattro cluster di piante in base a questo carattere (morfotipi).

Per l'analisi molecolare è stato messo a punto un set di marcatori microsattelliti (SSR), ancora mai utilizzato in ambito europeo su questa specie. Sono stati analizzati circa 100 genomi, di cui 7 appartenenti ad accessioni di specie nota (*L. barbarum* e *L. chinense*) provenienti da Orti Botanici europei. L'analisi non ha individuato differenze tra le piante coltivate nella piantagione studiata, le quali costituiscono una popolazione omogenea e separata rispetto alle accessioni con i genomi di riferimento, e deriva da due diverse popolazioni ancestrali. I morfotipi individuati attraverso la forma del frutto nell'analisi morfologica non differiscono dal punto di vista genetico, e quindi non sono riconducibili a differenti autoctoni o cultivar.

Dal punto di vista nutraceutico si conferma l'elevata presenza di sostanze benefiche e antiossidanti, seppur in concentrazioni inferiori rispetto ai valori registrati nei paesi nativi asiatici, ma in linea con quelli della letteratura europea. I vari morfotipi non hanno evidenziato sostanziali differenze tra loro, facendo supporre che essi siano appartenenti ad una stessa cultivar e che la differenza di forma del frutto non influenzi le caratteristiche nutraceutiche. Anni diversi hanno invece portato a differenze significative, suggerendo che i fattori climatici sono determinanti per queste caratteristiche: i valori più alti di molti composti sono stati registrati nel 2019, che è stato l'anno più caldo e più piovoso. Anche la stagione di fruttificazione e il suo andamento climatico sembrano avere un'influenza determinante sulla presenza e concentrazione di alcuni metaboliti. Questo è stato importante per capire quando i frutti hanno raggiunto il loro massimo potenziale nutraceutico: infatti per il contenuto di antiossidanti e flavonoidi totali il momento migliore sembra essere l'inizio della stagione di fruttificazione (luglio), mentre i polifenoli totali e la zeaxantina hanno i loro picchi in settembre. Questo aspetto può fornire buone indicazioni per scegliere il momento migliore per la raccolta in base alla destinazione d'uso del prodotto.

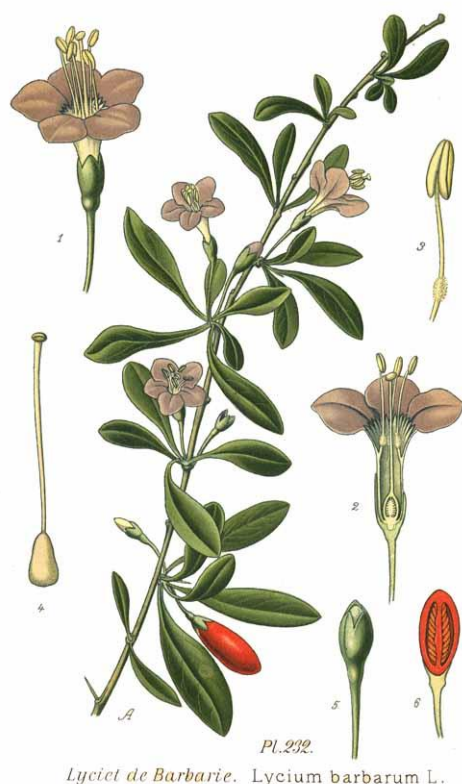
In conclusione, queste informazioni potrebbero essere utilizzate in futuro insieme alla lista dei descrittori e al set di marcatori SSR per caratterizzare altre accessioni coltivate in Italia e progettare programmi di breeding e conservazione e per la tracciabilità e l'utilizzo sostenibile delle risorse derivanti da queste piante.

# 1. Introduzione

## 1.1. Il genere *Lycium*: aspetti filogenetici

*Lycium* L. è un genere appartenente alla famiglia *Solanaceae*, la quale comprende molte delle specie d'interesse agricolo più importanti al mondo, tra le quali ritroviamo la patata, il pomodoro, la melanzana, il peperone e il tabacco (Olmstead et al., 2008). Fu Linneo che nel 1753 descrisse per la prima volta alcune specie del genere *Lycium* (*L. europaeum*, *L. barbarum* e *L. afrum*) nell'opera *Species Plantarum*. Quindici anni dopo il botanico Philip Miller descrisse la specie *L. chinense* (X. Liu et al., 2020).

Le specie appartenenti al genere *Lycium* sono generalmente degli arbusti o dei piccoli alberi, spesso con spine su fusto e rami e foglie semplici intere. Di solito si differenziano per la presenza di spine, la forma e la dimensione delle foglie, la lunghezza della corolla, la lunghezza dello stame, il colore del frutto, il sapore dei frutti e la dimensione e il numero di semi.



**Figura 1.** Tavola botanica che raffigura la pianta di *Lycium barbarum* in tutte le sue parti ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:232\\_Lycium\\_barbarum\\_L.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:232_Lycium_barbarum_L.jpg))

Ad oggi, questo genere comprende approssimativamente 97 specie distribuite in tutto il mondo in maniera disgiunta tra regioni subtropicali e temperate; molte di esse provengono da regioni aride e semiaride, ma alcune invece vivono in regioni subsaline o lungo le coste. Tra queste specie, 32 sono

originarie del Sud America, 24 del Nord America, 24 dell’Africa e 12 dell’Eurasia; due sono comuni in Eurasia e in Africa. Il *Lycium australe* è l’unica specie endemica dell’Australia e *L. sandwicense* è endemica delle isole del Pacifico. *L. carolinianum* cresce invece solo in Nord America e nelle isole del Pacifico (Yao et al., 2018).

Attraverso un’approfondita analisi filogenetica effettuata da Fukuda et al. (2001) sul DNA cloroplastico (cpDNA), è stato supposto che il genere *Lycium* si sia originato nel Nuovo Mondo, dove le specie sembrano essere raggruppate secondo un modello parafiletico; il suo centro di diversificazione potrebbe essere stato il Sud America; successivamente, potrebbe essersi diffuso attraverso dispersione a lunga distanza grazie al trasporto dovuto a uccelli frugivori, correnti oceaniche e venti verso l’Africa meridionale (Raven & Axelrod, 1974); da qui potrebbero essersi diversificate poi tutte le specie eurasiatiche e australiane, secondo modello monofiletico.

Tra le specie di *Lycium* euroasiatiche che negli ultimi decenni hanno raggiunto maggior rilievo economico, troviamo il *L. barbarum* L. e il *L. chinense* Mill., e in minor misura il *L. ruthenicum* Murr., comunemente chiamati Goji. I frutti, le foglie, la corteccia della radice e i giovani germogli di queste specie sono stati ampiamente utilizzati per centinaia di anni nella medicina tradizionale asiatica e a oggi rappresentano una nuova frontiera per quanto riguarda medicina, nutraceutica e functional food in virtù delle loro proprietà benefiche (Yao et al., 2018).

Ad eccezione di *L. ruthenicum*, che presenta bacche piccole e nere, le altre due specie (*L. barbarum* e *L. chinense*) non sono facilmente distinguibili solo mediante analisi morfologiche e istologiche tradizionali.

## 1.2. Goji: caratteristiche botaniche

*Lycium barbarum* L., *Lycium chinense* Mill. e *Lycium ruthenicum* Murr. sono arbusti legnosi decidui, spesso spinosi, con caratteristiche inter- e intra-specifiche molto variabili.

*L. ruthenicum* Murr. ha solitamente dimensioni minori rispetto alle altre due specie e può arrivare ad un’altezza di 1,5 m. Gli steli sono molto ramificati e i rami sono grigiastri o biancastri, eretti, ascendenti o prostrati, solitamente spinosi. Le foglie sono solitarie sui rami giovani e in fascicoli di 2-6 sui rami più vecchi; la lamina fogliare è verde-grigiastra, succulenta, lineare o subcilindrica, raramente lineare-oblancheolata. I fiori sono ermafroditi e hanno calice strettamente campanulato, con lobi irregolari, oblungi ovati. La corolla è di colore viola pallido, a forma d’imbuto. Il frutto è una bacca viola-nera, globosa, di 6-9 mm di diametro. I semi sono marroni, con dimensioni di 1,5 × 2 mm. La fioritura avviene solitamente da giugno a luglio e la fruttificazione in agosto, fino a settembre (Dhar et al., 2011).

*L. chinense* Mill. è la specie più affine a *L. barbarum* L. Ha un’altezza che va da 0,5 a 2 m. Il fusto ha molti rami di colore grigio chiaro, che possono essere assurgenti, curvi o penduli, con spine lunghe 0,5-2 mm.



Le foglie possono essere solitarie o raggruppate in 2-4; il loro margine può essere ovato, romboidale, lanceolato o lineare lanceolato. Il suo frutto è una bacca a due camere, rosso, ovoidale od oblungo, con semi numerosi, gialli, di 2,5-3 mm di diametro. Il fiore ha un peduncolo di 1-2 cm, con calice campanulato di 3-4 mm, diviso in 3-5 dalla metà, con lobi densamente ciliati; l'ovario è a bicamerato, con uno stilo. Gli stami sono solitamente cinque e strutturati con filamenti più lunghi delle antere, che sono deiscenti longitudinalmente; la corolla è viola chiaro, circa 0,9-1,2 cm; i tubi sono imbutiformi, più corti o uguali ai lobi, che hanno margini pubescenti (Amagase & Farnsworth, 2011; J. Chen et al., 2018; Yao et al., 2018).

*L. barbarum* L., la pianta oggetto di studio di questo lavoro di tesi, viene descritta in letteratura come alta da 0,5 a 2 m, con fusto e rami glabri o spinosi. Le foglie, solitarie o fascicolate, sono lanceolate o ellittiche allungate. I fiori hanno peduncolo di 1-2 cm, calice campanulato lungo 4-5 mm, solitamente bi-lobato, con lobi bi- o tri-dentati all'apice; l'ovario ha due camere e uno stilo. Come in *L. chinense*, gli stami sono solitamente cinque e i filamenti sono più lunghi delle antere, deiscenti longitudinalmente. La corolla è viola, imbutiforme, con i tubi di 8-10 mm, più lunghi dei lobi. I lobi sono 5-6 mm, espansi, con margini glabrescenti. Il frutto è una bacca a due camere solitamente rosso o giallo-arancio, oblungo od ovoidale, contenente solitamente da 4 a 20 semi di colore giallo-marrone, di circa 2 mm di diametro (Amagase & Farnsworth, 2011; J. Chen et al., 2018; Yao et al., 2018).

### **1.3. Il Goji tra tradizione e breeding**

La coltivazione del Goji in Oriente affonda le sue radici circa 1400 anni fa, quando iniziò la selezione di piante selvatiche utilizzando come via di propagazione il seme. Da lì in poi fu avviato un processo di addomesticamento durato centinaia di anni, che ha portato ad una differenziazione in landrace, varietà locali sviluppatasi in adattamento all'ambiente in cui vivevano e con caratteristiche migliorate rispetto ai progenitori selvatici. Successivamente, circa 600 anni fa, nella Cina nord-occidentale e in particolare nella regione autonoma di Ningxia, la coltivazione del Goji venne ulteriormente sviluppata, utilizzando come via di propagazione principalmente talee provenienti da piante eccellenti e con frutti di alta qualità (J. Chen et al., 2018).

La lunga storia di coltivazione del Goji ha visto quindi una serie di sforzi per il miglioramento delle *landrace* e *cultivar* mediante selezione sia naturale sia artificiale. Nella regione autonoma di Ningxia sono state selezionate e sviluppate più di dieci tradizionali landrace, alcune delle quali sono state ulteriormente migliorate negli ultimi 30 anni per ottenere piante con caratteri economicamente superiori, come il peso e la dimensione del frutto e il contenuto di zuccheri totale. A partire dagli anni '70, il Ningxia Research Center di Wolfberry Engineering Technology, ribattezzato poi National Wolfberry Engineering Research Center nel 2011, ha avviato un programma di miglioramento e

breeding a partire da quella che tradizionalmente è considerata la landrace più affidabile, la "Damaye". Essa produce frutti grandi e uniformi con poche variazioni nel corso degli anni e cresce fino ad un'altezza di 1,5 m con un diametro della chioma di 1,7 m in 6 anni. Il suo frutto ha forma sferoidale e 1000 frutti freschi pesano da 450 a 510 g. Una singola pianta può produrre fino 7–8 kg di frutta fresca (J. Chen et al., 2018).

Partendo dalla "Damaye", i programmi di breeding hanno sviluppato cultivar come 'Ningqi-1,' 'Ningqi-2,' e 'Ningqi-4' per selezione da mutanti superiori naturali, che sono stati poi rapidamente distribuiti ad altre regioni di coltivazione (J. Chen et al., 2018).

Sono stati inoltre effettuati incroci tra cultivar, come nel caso di "Ningqi 1" e "Ningqi 9" (un tetraploide) da cui è stato possibile selezionare una cultivar triploide, caratterizzata dal numero di semi molto basso o nullo, un contenuto elevato di zuccheri e aminoacidi e un gusto più piacevole rispetto a "Ningqi 1", nonché un'elevata resistenza all'infestazione da afidi (An et al., 1998).

Wang et al. (2005) hanno condotto uno studio incrociando *L. barbarum* con pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.): sono state selezionate sette linee tra 21 combinazioni incrociate e due di loro hanno fiorito e prodotto frutta, suggerendo quindi che *L. barbarum* presenta una vasta gamma di incroci all'interno della famiglia delle Solanacee.

#### **1.4. I marcatori molecolari microsatelliti (SSR) nelle piante**

Il breeding vegetale può essere considerato un processo coevolutivo tra l'uomo e le piante commestibili. L'uomo, fin dall'antichità, ha cercato di modificare le piante utilizzate in agricoltura per ottenere esemplari dalle caratteristiche sempre migliori. La sfida del miglioramento genetico delle piante risiede nel potenziamento simultaneo di tutti i tratti di interesse, un compito reso però più difficile dalle correlazioni genetiche tra i diversi tratti, che possono essere dovute a geni con effetti pleiotropici, al legame fisico tra i geni nei cromosomi o alla struttura genetica della popolazione. La selezione di un tratto cambierà i tratti correlati, a volte nella direzione desiderata, altre volte in modo sfavorevole. Per questo motivo, la selezione può portare a cambiamenti imprevisti, che normalmente rientrano nell'intervallo che si osserva per la pianta coltivata; quindi, si presume che non rappresentino alcun rischio per i consumatori o per l'ambiente.

La grande diversità dei metodi di breeding può essere semplificata in tre categorie: la selezione di varianti naturali vegetali mediante osservazioni all'interno di una popolazione; la selezione basata sull'accoppiamento controllato mediante selezione di piante che presentano la ricombinazione di geni desiderabili provenienti da genitori diversi; e la selezione vegetale basata sulla ricombinazione monitorata mediante selezione di geni specifici o profili marcatori, utilizzando strumenti molecolari per il monitoraggio della variazione all'interno del genoma (Breseghello & Coelho, 2013).

A questo proposito, l'analisi della variazione della sequenza del DNA è di fondamentale importanza negli studi genetici. In questo contesto, i marcatori molecolari sono uno strumento utile per saggiare la variazione genetica e hanno notevolmente migliorato l'analisi genetica delle piante coltivate.

Una varietà di marcatori molecolari, inclusi i polimorfismi della lunghezza del frammento di restrizione (RFLP), l'amplificazione casuale del DNA polimorfici (RAPD), i polimorfismi della lunghezza del frammento amplificato (AFLP) e i microsatelliti o ripetizioni di sequenza semplice (SSR), sono stati sviluppati in diverse piante coltivate (Amagase and Farnsworth, 2011). Tra le diverse classi di marcatori, i microsatelliti sono risultati essere molto utili per una gran varietà di applicazioni nella genetica vegetale e nell'allevamento grazie alla loro riproducibilità, natura multiallelica, ereditarietà codominante, abbondanza relativa e buona copertura del genoma (Powell et al., 1996). I recenti miglioramenti nell'analisi genetica e nei metodi di genotipizzazione hanno portato a una rapida espansione dell'uso di questo tipo di marcatore molecolare per affrontare questioni ecologiche (Selkoe & Toonen, 2006).

L'alto grado di variazione allelica rivelato dai microsatelliti risulta dalla variazione del numero di motivi ripetuti in un *locus* causata dallo slittamento della replicazione e/o dall'incrocio diseguale durante la meiosi. Si ritiene infatti che quando il DNA viene replicato, si verifichino errori nel processo e al filamento vengono aggiunti set extra di queste sequenze ripetute. Nel tempo, tali sequenze variano in lunghezza tra una *cultivar* e l'altra (Tharachand et al., 2012).

I microsatelliti possono essere sviluppati direttamente da librerie di DNA genomico o da librerie arricchite per microsatelliti specifici. In alternativa, essi possono anche essere rintracciati cercando in database pubblici come GenBank ed EMBL o attraverso la trasferibilità tra specie (Kalia et al., 2011).

Le informazioni fornite da questi marcatori sono quindi importanti per la valutazione delle risorse genetiche e vengono utilizzati per caratterizzare le accessioni mantenute nelle collezioni di germoplasma e come base per la selezione, stima, conservazione e utilizzo della biodiversità di qualsiasi popolazione (S.-R. Lee et al., 2018). Dato che la domanda di prodotti di origine vegetale con elevate proprietà benefiche, come erbe medicinali e functional food, sta aumentando di giorno in giorno, negli ultimi anni si è dimostrato di grande importanza non solo avviare programmi di breeding volti al miglioramento del materiale vegetale, ma anche caratterizzare queste materie prime attraverso marcatori molecolari (Tharachand et al., 2012). Importante risulta anche l'associazione tra questi ed i descrittori morfologici al fine di identificare i genotipi da cui partire per la selezione delle qualità migliori (Carvalho et al., 2009). I microsatelliti, quindi, sono utili anche nei programmi di breeding sia per studiare la struttura della popolazione e delle relazioni tassonomiche e filogenetiche che per scegliere appropriatamente i genitori per gli incroci (MAS, Marker Assisted Selection). Per migliorare le attività di breeding viene sempre più spesso applicata la mappatura e la marcatura di geni o QTL (Quantitative Trait Loci). L'analisi QTL comporta la selezione e l'ibridazione di linee parentali che

differiscono in uno o più tratti quantitativi e l'analisi della progenie segregante in modo da collegare il locus del tratto quantitativo ai marcatori del DNA noti. Questo tipo di analisi può essere impiegato per velocizzare il miglioramento genetico delle piante e per accelerare la creazione di nuove cultivar con caratteri migliorati. Nella mappatura QTL i microsatelliti possono aiutare nell'identificazione di geni candidati per i tratti di interesse, particolarmente vitali per un programma di breeding, come ad esempio la resa, la resistenza alle malattie, la tolleranza allo stress, la qualità del seme e del frutto ecc. (Asins, 2002; Kalia et al., 2011; T. Yang et al., 2022).

### 1.5. Diversità molecolare nel Goji

Come detto in precedenza (paragrafo 1.2) le tre specie identificate come Goji, e nel particolare le due specie più affini *L. barbarum* e *L. chinense*, risultano molto simili da un punto di vista botanico e solitamente la loro autenticazione avveniva mediante analisi morfologiche e istologiche, sebbene fosse abbastanza difficile operare una differenziazione sicura. Recentemente, molti metodi di analisi, come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la gascromatografia (GC), sono stati utilizzati per cercare di sviluppare un'impronta chimica che potrebbe differenziare le specie di *Lycium*, ma ciò non si è dimostrato sufficientemente discriminante poiché essendo specie strettamente correlate, anche i loro profili biochimici sono molto simili. Con il rapido sviluppo dei moderni metodi biologici, l'identificazione delle relazioni tra specie utilizzando metodi anatomici e fisico-chimici tradizionali viene integrata da tecniche di fingerprinting del DNA (Zhao et al. (2010).

Il primo lavoro che possiamo ritrovare in letteratura in questo ambito è quello di Zhang et al. (2001), che ha utilizzato la tecnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) per distinguere il *Lycium barbarum* da altre specie strettamente imparentate dello stesso genere. I risultati ottenuti hanno confermato che la tecnica RAPD può essere impiegata per distinguere specie strettamente correlate di *Lycium*.

Successivamente, il lavoro di Kwon et al. del 2009 ha isolato e caratterizzato 21 marcatori microsatelliti polimorfici sviluppati da *L. chinense* Mill. Tali marcatori hanno prodotto un totale di 86 alleli in 30 delle accessioni analizzate. Tutti i loci sono stati poi amplificati con successo per tutte le accessioni di *L. barbarum*. Questo lavoro rappresenta tuttora la base per quanto riguarda i marcatori microsatelliti e un set di questi è stato utilizzato anche in questo lavoro di tesi.

Il lavoro di Chung et al. (2009) ha cercato di discriminare cultivar diverse di *L. barbarum* attraverso l'uso dei marcatori SSR di Kwon et al. (2009): 41 cultivar provenienti da Corea e Cina sono state analizzate con 10 marcatori, che hanno rivelato un numero totale di 61 alleli. Dei marcatori totali, solo la metà sono stati utili ai fini della discriminazione e tutte le cultivar individuate sono state distinte grazie alla combinazione di questi cinque microsatelliti.

Successivamente, Zhao et al. (2010) hanno valutato la diversità genetica e la struttura della popolazione di 139 accessioni di *L. chinense* con 18 dei 21 marcatori SSR polimorfici di *L. chinense* di Kwon et al. (2009), rilevando un totale di 108 alleli. I risultati hanno mostrato che le 139 accessioni potevano essere suddivise in 3 gruppi distinti, che però mostravano una moderata differenziazione, condividendo almeno il 70% di discendenza. Oltre ai gruppi identificati da questa analisi, l'8,2% delle accessioni ha mostrato evidenza di discendenza da una popolazione mista, probabilmente risultante da *breeding*, addomesticamento nel corso dei secoli e da scambio di risorse, che hanno avuto grandi effetti sulla struttura della diversità.

In un recente lavoro di Zhang et al. (2018) sono stati analizzati i DNA di 19 accessioni, tra cui 14 di origine nota, quattro specie selvatiche (*L. ruthenicum* Murr., *L. barbarum* L., *L. chinense* Mill. var. *potaninii* Pojark., *L. yunnanense* Kuang) e un mutante con frutti bianchi ritrovato in natura. Attraverso l'utilizzo della tecnologia di sequenziamento di terza generazione, sono stati sviluppati marcatori RAD-seq, al fine di studiare il background genetico del goji cinese. I risultati ottenuti hanno mostrato che tutte le razze autoctone avevano l'antenato comune con *L. barbarum*, e la bassa diversità tra loro è stata attribuita alla selezione direzionale artificiale a lungo termine. L'accessione selvatica invece aveva una diversità genetica maggiore rispetto alle varietà autoctone e una maggiore similarità con la specie *L. ruthenicum*, da cui è stata supposta una discendenza per mutazione.

Per quanto riguarda invece la caratterizzazione del trascrittoma, nel 2017 Chen et al. hanno svolto uno studio approfondito sulla specie *L. barbarum*, mirato a fornire una risorsa per l'estrazione genica funzionale e per sviluppare marcatori EST-SSR che possano essere utilizzati per la valutazione della diversità genetica, la costruzione di mappe di collegamento, la mappatura fine di geni cruciali e riproduzione assistita da marcatori.

Nell'ambito di *breeding* e miglioramento, solo negli ultimi quattro anni sono state ottenute nuove conoscenze attraverso l'utilizzo dell'analisi QTL per ottenere nuove linee genetiche migliorate. Ad esempio, nel 2019 Gong et al. hanno utilizzato marcatori SNP per effettuare un'analisi QTL relativa ad alcuni tratti fotosintetici della generazione F1 ottenuta dalle cultivar di *L. barbarum* Ningqi n.5 e Zhongkeluchuan n.1.

Anche J. Zhao et al. (2019, 2021) hanno utilizzato marcatori SNP per l'analisi QTL di caratteristiche di frutto e foglie di due generazioni F1 ottenute rispettivamente dalle cultivar Ningqi n.1 con *L. chinense* e *L. yunnanense*. I loro lavori hanno non solo rilevato 55 QTL riproducibili come responsabili di tratti legati alle foglie e ai frutti, individuando marcatori selettivi promettenti per il *breeding* assistito da marcatori, ma hanno anche raccolto informazioni preziose sui marcatori SNP saturi e sui QTL affidabili per la clonazione basata sulla mappa di geni funzionali correlati alla resa e ai tratti morfologici in *Lycium* spp.

## 1.6. Nutraceutici, *functional food* e composti funzionali

Il termine “nutraceutica” è stato coniato dall’unione delle parole “nutrizione” e “farmaceutica” dal Dr. Stephen Defelice, fondatore e presidente della fondazione per l’innovazione in medicina (FIM) nel 1989. Secondo Defelice “i nutraceutici sono alimenti o parte di un alimento che fornisce benefici medici o per la salute, inclusa la prevenzione e/o il trattamento di una malattia” (Chauhan et al., 2013).

Il concetto di alimento funzionale è stato invece definito per la prima volta durante il “Consensus Meeting” dell’Unione Europea tenutosi a Madrid nell’ottobre del 1998. Gli alimenti funzionali sono alimenti ordinari che hanno componenti, ingredienti che incorporati conferiscono loro uno specifico medicinale o salute beneficio inoltre effetto nutritivo. Un alimento funzionale può quindi essere definito come “un prodotto alimentare da assumere nell’ambito della dieta abituale per avere effetti benefici che vanno oltre la funzione nutrizionale di base” (Kalra, 2003).

La grande varietà di composti organici prodotti dalle piante deriva dal loro metabolismo primario e secondario. I carboidrati, gli amminoacidi, gli acidi grassi e gli acidi organici sono metaboliti primari e sono coinvolti nella crescita, nello sviluppo, nella respirazione, nella fotosintesi e nella sintesi degli ormoni e delle proteine. Essi si trovano in tutte le specie all’interno di ampi gruppi filogenetici e sono prodotti utilizzando le stesse (o quasi le stesse) vie biochimiche.

Le piante producono anche una grande quantità di composti organici molto diversi tra loro che non partecipano direttamente alla crescita e allo sviluppo. Queste sostanze, chiamate metaboliti secondari, sono spesso distribuite in modo differenziato tra i gruppi tassonomici all’interno del regno vegetale. Sebbene sintetizzati principalmente per la difesa delle piante contro lo stress ossidativo, questi composti conservano la capacità di agire come antiossidanti *ex planta* e quindi contribuiscono ampiamente alle proprietà farmaceutiche e dietetiche degli alimenti di origine vegetale. Le loro proprietà antiossidanti includono la reattività a una varietà di specie reattive dell’ossigeno, nonché la chelazione dei metalli (Csepregi et al., 2016). Le loro funzioni, molte delle quali rimangono sconosciute, vengono chiarite con crescente frequenza. Secondo la nomenclatura adottata dalla British Nutrition Foundation, i metaboliti secondari delle piante possono essere suddivisi in 4 gruppi principali: composti fenolici e polifenolici (circa 8000 composti), terpenoidi (circa 25000 composti), alcaloidi (circa 12000 composti) e composti solforati. Essi, ad esempio, determinano il colore delle verdure, proteggono le piante da erbivori e microrganismi, attraggono gli impollinatori e gli animali che disperdono i semi e agiscono come molecole segnale in condizioni di stress (Hounsoume et al., 2008).

## 1.7. Dagli usi tradizionali ai recenti studi farmacologici: il Goji come *functional food*

Ad oggi, di tutte le 97 specie conosciute del genere *Lycium* solo 35 e 2 varietà sono utilizzate come cibo e/o medicinale: in Eurasia vengono utilizzate nove (64%) delle 14 specie e una varietà; nelle Americhe e

in Africa, dove risiedono la maggior parte (86%) delle specie di *Lycium*, solo il 31% (26 specie) di esse viene utilizzato come cibo e/o medicina; infine, le specie australiane e le due specie delle isole del Pacifico sono tutte utilizzate per scopi alimentari.

La parte della pianta più comunemente utilizzata in tutto il mondo è il frutto fresco o essiccato, sia per uso alimentare sia medicinale. Esso viene utilizzato per 28 specie, mentre delle altre specie vengono utilizzate anche le foglie e la corteccia delle radici, se non addirittura l'intera pianta. Le foglie possono essere consumate fresche, cotte e utilizzate come tè; esse, insieme alla corteccia delle radici, sono solitamente impiegate come medicinali, mentre i giovani germogli possono essere preparati come cibo. *L. barbarum*, *L. chinense* e *L. ruthenicum* sono le specie più frequentemente riportate in letteratura per la Cina; *L. europeum*, *L. intricatum* e *L. shawii* per il Mediterraneo e il Medio Oriente; *L. pallidum* per il Nord America e *L. afrum* per l'Africa (Yao et al., 2018).

Tradizionalmente i frutti secchi e la corteccia delle radici di *L. chinense* e *L. barbarum*, chiamati *Gouqi Zi* e *Digu Pi*, sono comunemente usati nella medicina e nella dieta cinesi (Chang & So, 2015; Wagner et al., 2011), ma le informazioni storiche in nostro possesso derivano prevalentemente dalla traduzione dagli ideogrammi cinesi e dalle figure delle piante negli antichi erbari. Poiché il concetto di specie è relativamente recente, non è facile dedurre dagli erbari storici se in passato siano state usate specie uguali o diverse e non sempre erano riportati dati su quali parti della pianta venivano utilizzate.

La medicina tradizionale cinese si basa su un sistema teorico formato dall'integrazione di teoria, metodo, prescrizioni ed erbe. Questo sistema unico di teoria medica è caratterizzato dall'olismo come principio fondamentale dominante, con il *qi* essenziale, lo *yin-yang* e la teoria delle cinque fasi come fondamento filosofico; organi, canali e collaterali (*zang-fu*), energia vitale (*qi*), sangue e fluidi essenziali come fondamento fisiologico e patologico; e la differenziazione e il trattamento della sindrome come approccio diagnostico e curativo.

Da un punto di vista biochimico, sono stati effettuati molti studi per conoscere la composizione del profilo nutraceutico delle varie parti della pianta.

Come alimento funzionale, le bacche di goji stanno assumendo sempre maggiore diffusione in molti Paesi, anche al di fuori del loro mercato tradizionale. Essi vengono solitamente commercializzati come alimenti salutari nei paesi occidentali, soprattutto in Nord America e nei paesi europei (Ma et al., 2019; Cheng et al., 2015).

Le bacche di Goji sono spesso incorporate in formulati erboristici: ad esempio, 15 g di bacche di goji al giorno sono considerati utili per fornire un adeguato apporto di zeaxantina, stimato a 3 mg/die come integratore alimentare per la salute degli occhi (C. Y. Cheng et al., 2005).

Le bacche di goji sono considerate un'ottima fonte di macronutrienti: essi includono il 46% di carboidrati, il 16% di fibre alimentari, il 13% di proteine e l'1,5% di grassi. Ci sono studi che hanno

riportato la presenza di riboflavina, tiamina, acido nicotinico e minerali come rame, manganese, magnesio e selenio nelle bacche di goji (Luo et al., 2014). I componenti ad alta attività biologica nelle bacche di goji sono polisaccaridi, carotenoidi e fenoli (C. Wang et al., 2010). Questi composti funzionali sono legati alle proprietà salutari delle bacche di goji.

Il gruppo più importante di composti presenti nelle bacche di goji sono i polisaccaridi. I polisaccaridi comprendono il 5-8% della frutta secca e si trovano nella forma idrosolubile di polisaccaridi di *L. barbarum* altamente ramificati (Kulczyński & Gramza-Michałowska, 2016). Si ritrovano inoltre sei tipi di monosaccaridi (arabinosio, galattosio, glucosio, ramnosio, mannosio, xilosio e acido galatturonico) (Amagase & Farnsworth, 2011).

I carotenoidi sono il secondo gruppo più significativo dei composti biologicamente attivi con proprietà benefiche per la salute presenti nella bacca di goji. Il loro contenuto totale può variare dallo 0,03 allo 0,5% nel frutto secco. Essendo responsabili della caratteristica colorazione da arancione a rosso, i carotenoidi liposolubili si trovano a livelli estremamente elevati nelle bacche di goji (Potterat, 2010). Uno dei carotenoidi più comuni presenti nelle bacche di goji è la zeaxantina sotto forma di zeaxantina dipalmitato. Nella maturazione delle bacche di goji, il contenuto di zeaxantina può raggiungere circa il 77,5% dei carotenoidi totali. Ad oggi, le bacche di goji sono considerate tra le migliori fonti naturali di zeaxantina. Le frazioni di b-carotene (35,9 µg/g), criptoxantina e neoxantina (72,1 µg/g) vengono rilevate anche negli estratti di bacche di goji (Peng et al., 2005; C. Wang et al., 2010).

Gli acidi fenolici e i flavonoidi sono un'altra fondamentale classe di composti presenti nelle bacche di goji. Tra questi ritroviamo l'acido caffeico (3,73 µg/g), l'acido caffeoilchinico (0,34 µg/g), l'acido clorogenico (12,4 µg/g), l'acido p-cumarico (6,06 µg/g), la quercetina-diglicoside (66,0 µg/g), il kaempferolo-3-O-rutinoside (11,3 µg/g) e la rutina (42,0 µg/g). Questi composti fenolici hanno una capacità antiossidante molto elevata (Endes et al., 2015).

Le bacche di Goji contengono anche l'1,0-2,7% di amminoacidi liberi, di cui la più abbondante è la prolina. È stata confermata anche la presenza di taurina e betaina (Lu et al., 2021; Potterat, 2010). Ulteriori composti presenti nei frutti di Goji sono: vitamine, come tiamina, riboflavina e acido ascorbico con il suo precursore glucosidico (2-O-β-D--glucopiranosile). La concentrazione di vitamina C è stata trovata a 42 mg/100 g (Donno et al., 2015). Llorent-Martínez et al. (2013) ha confermato la presenza di molti elementi minerali, i più comuni dei quali sono potassio (1460 mg/100 g), sodio (550 mg/100 g), fosforo (184 mg/100 g), magnesio (90 g/100 g) e calcio (50 mg/100 g). È interessante notare che la concentrazione di ferro di 5,5 mg/100 g è elevata rispetto all'assunzione dietetica di riferimento. Il goji contiene anche acidi organici, come acido citrico, acido malico, acido fumarico e acido shikimico (Mikulic-Petkovsek et al., 2012). Gli acidi grassi più comuni sono: acido palmitico, acido linoleico e acido miristico. Secondo la letteratura, le bacche di Goji forniscono 370 kcal/100 g di frutta secca (Ma et al., 2019).



Per comprendere se le proprietà benefiche attribuite a queste specie trovasse fondamento scientifico, studi recenti hanno analizzato diverse specie di *Lycium*, principalmente *L. barbarum* e *L. chinense*, e sono stati isolati e identificati più di 350 composti (D. Qian et al., 2017). La bioattività e gli effetti di estratti o composti grezzi sono stati valutati in studi farmacologici ed è risultato che molti degli usi tradizionali hanno un effettivo fondamento scientifico (Tabella 1).

**Tabella 1.** Bioattivi generali dei composti o degli estratti di *Lycium spp* (da Yao et al., 2018).

Bioattività	Materiale vegetale	Composti	References
Capacità antiossidante	Frutto, foglie	Flavonoidi, polisaccaridi, pigmenti, acidi grassi	Benchenouf et al., 2017; Donno et al., 2015; Le et al., 2007; Mocan et al., 2017, 2014; Wang et al., 2010
Spermatogenesi	Frutto	Polisaccaridi	Luo et al., 2014; Qian and Yu, 2016; Shi et al., 2018
Protezione della retina	Frutto	Zeaxantina e/o luteina, polisaccaridi	Chu et al., 2013; Pavan et al., 2014
Epatoprotezione	Frutto, radici	Zeaxantina dipalmitato, polisaccaridi, betaina, flavonoidi, frutti	Ahn et al., 2014; He et al., 2014; Xiao et al., 2012; Zhang et al., 2010
Anti-aging	Frutto, foglie	Frutti, polisaccaridi, vitamine, pigmenti	Bucheli et al., 2011; Li et al., 2018
Immunomodulazione	Frutto	Complessi polisaccaridi-proteine, polisaccaridi, pigmenti	Chen et al., 2012; Tang et al., 2012; Zhang et al., 2014
Capacità antitumorale	Frutto	Complessi polisaccaridi-proteine, polisaccaridi	Cui et al., 2012; He et al., 2014; Tang et al., 2012
Skin care	Frutto	Polisaccaridi, succo, glicoconiugati	Liang and Zhang, 2007; Reeve et al., 2010
Capacità antimicrobica		Lyciumoside I, AcOEt-soluble fraction	Kim et al., 2000; Lee et al., 2005
Capacità antidiabetica	Frutto	Estratto acquoso, polisaccaridi, acidi organici e alcaloidi	Song et al., 2012; Ye et al., 2008
Capacità antiaterosclerotica	Frutto, semi	Olio di semi, polisaccaridi	Jiang et al., 2007; Ming et al., 2009
Capacità ipotensiva	Frutto	Estratto acquoso, polisaccaridi	Mi et al., 2012a, 2012b
Neuroprotezione	Frutto	Estratto acquoso, polisaccaridi, estratto alcalino	Mi et al., 2013; Wang et al., 2014
Capacità antiaffaticamento	Frutto	Polisaccaridi, betaina	Kim and Baek, 2014; Wu and Guo, 2015

Ad esempio, l'effetto anti-invecchiamento del *Lycium* (probabilmente l'intera pianta di *L. chinense* o *L. barbarum*) era registrato fin dall'Erbale di Shennong, risalente circa al 100 d.C. Studi recenti hanno dimostrato che composti come polisaccaridi, vitamine, pigmenti ed estratti grezzi dei frutti di *Lycium* hanno una funzione rigenerativa sulle lesioni della retina legate all'età e svolgono un'azione protettiva della macula della retina (Bucheli et al., 2011; S. Li et al., 2018; X. Li et al., 2021).

*Xiaoke* è un termine usato negli antichi manuali erboristici per descrivere sintomi simili al diabete attuale: studi *in vivo* hanno dimostrato che l'estratto acquoso, i polisaccaridi, gli acidi organici e gli alcaloidi della corteccia delle radici e dei frutti di *L. chinense* e *L. barbarum* hanno un effetto sul metabolismo lipidico e sul ripristino dello stress ossidativo (Luo et al., 2004; Shi et al., 2018; Ye et al., 2008). Inoltre, è stato recentemente dimostrato un effetto antifatica ed epatoprotettivo dei frutti del *Lycium* e della corteccia delle radici (He et al., 2014; Xiao et al., 2012), già registrato nel passato.

### **1.8. Il Goji in Italia ed Europa**

Le piante di *L. barbarum* crescono bene in zone soleggiate, a temperature di circa 21-23 °C, con suoli alcalini (Kulczyński & Gramza-Michałowska, 2016), sono resistenti alla siccità, crescono rapidamente e fanno frutti già nel primo anno di semina, ma esistono diversi effetti negativi legati all'utilizzo della monocoltura di questa specie (Y. Wang et al., 2019). Nel lungo termine si possono manifestare una diminuzione della biodiversità, un diverso livello di degrado tra sottosuolo e gli strati più superficiali, un declino dei valori del pH del suolo e la variazione dei nutrienti presenti in esso. Per questi motivi risulta fondamentale fornire le opportune conoscenze agli agricoltori per poter ridurre l'impatto ambientale tramite il minor uso di fertilizzanti e composti chimici, un ampliamento dell'uso di risorse rinnovabili e un miglioramento dell'uso di acqua (Na et al., 2021).

Grazie alla sua adattabilità e resistenza ai climi da rigidi a secchi e alla prolungata esposizione alla radiazione solare, *L. barbarum* riesce a crescere e riprodursi sulla nostra penisola. Infatti, nell'ultimo decennio anche in Italia si è molto diffusa la coltivazione del Goji e nel 2016 sono state prodotte circa 50 tonnellate di frutti, rendendo il nostro Paese il maggior produttore a livello europeo. Tra le regioni produttrici di Goji possiamo ricordare il Veneto, la Toscana, l'Umbria, il Lazio, la Puglia e la Calabria (Bertoldi et al., 2019), che ad oggi è la regione più produttiva: dal 2012 nella Piana di Sibari sono coltivate più di 150000 piante per un'estensione di 38 ha.

Alle nostre latitudini di solito la raccolta dei frutti inizia solitamente in tarda primavera (fine maggio/inizio giugno) e si protrae anche fino a novembre. La pratica più diffusa per la conservazione e consumazione del frutto prevede il processo di essiccazione.

Nel corso dell'ultimo decennio le ricerche effettuate sul goji dalla ricerca italiana sono state molte, tutte prevalentemente incentrate sulla ricerca dei vari composti ad alto valore sia nutrizionale sia farmaceutico.

Uno dei primi lavori è stato quello di Donno et al. nel 2015, dove sono stati valutati dei tratti di qualità e il livello di composti potenzialmente bioattivi in comparazione ad alcuni dei frutti più comuni. Montesano et al. (2016) hanno messo a punto un metodo semplice HPLC-ELSD per l'analisi dello zucchero nel frutto di goji. Nel 2017 Ruffo e colleghi hanno valutato il contenuto di carotenoidi, l'attività antiossidante e l'inibizione della perossidazione lipidica di estratti di goji calabrese in confronto a un estratto di goji cinese, utilizzato come riferimento. Nello stesso anno, Niro et al. si sono occupati della valutazione nutrizionale delle bacche di goji fresche e secche coltivate in sempre in Calabria. Anche Protti et al. (2017) hanno valutato il profilo analitico di antiossidanti selezionati e capacità antiossidante totale frutti di goji. (Tripodo et al., 2018) si sono occupati dell'ottimizzazione di estrazione liquida pressurizzata per composti fenolici bioattivi di goji. Fratianni et al. (2018) hanno valutato l'effetto di un pretrattamento fisico ed essiccazione sui carotenoidi nel goji. Bertoldi et al. (2019) hanno effettuato una caratterizzazione e tracciabilità geografica di goji italiano mediante l'analisi dei microelementi. Più recentemente, (Spano et al., 2021) hanno stilato il profilo metabolomico di frutti freschi di goji di due cultivar coltivate in Italia. Da un punto di vista biomedico invece, nel 2016 Ceccarini et al. hanno valutato gli effetti protettivi in vitro delle bacche di goji coltivate in Umbria su cellule di carcinoma epatocellulare umano, ottenendo dei buoni risultati.

Anche a livello europeo sono stati compiuti diversi studi sul goji e sui suoi utilizzi in biomedica: Mocan e collaboratori (2017, 2014) hanno lavorato sia sui frutti sia sulle foglie di goji di provenienza italiana e rumena. Benchennouf et al. (2017), Kafkaletou et al. (2018) e Skenderidis et al. (2019, 2018) hanno invece lavorato su materiale vegetale coltivato in Grecia. Più di recente Ilić et al. (2020) hanno effettuato la caratterizzazione chimica, la valutazione delle proprietà antiossidanti e antimicrobiche delle bacche di Goji coltivate in Serbia.

## 2. Scopo della tesi

Alla luce di tutte le conoscenze presenti nella letteratura scientifica italiana e internazionale, e poiché mancano informazioni dettagliate sulle piante coltivate in Italia, lo scopo di questo lavoro di tesi di dottorato è stato quello di studiare la diversità genetica e le caratteristiche botaniche e nutraceutiche di piante di *Lycium barbarum* coltivate in una piantagione biologica situata in Maremma, nella zona di Magliano in Toscana. Queste piante derivano prevalentemente da seme e non si hanno informazioni precise sulla loro origine o sull'appartenenza ad una o più specifiche *cultivar*; perciò, il fine ultimo di questo lavoro è quello di poter selezionare piante con caratteristiche superiori, adatte ad essere clonate per talea.

Il progetto è stato strutturato in maniera stratificata, per poter ottenere informazioni originali sulla specie, capire come questa vive e si adatta alle condizioni ambientali/climatiche locali, e acquisire dati utili agli agricoltori per migliorare la qualità nutraceutica dei loro prodotti.

Gli **obiettivi specifici** perseguiti sono stati quindi:

1. una iniziale **caratterizzazione morfologica**, utilizzando una lista di descrittori creata *de novo* per la specie *L. barbarum*, l'osservazione e annotazione di alcune importanti variabili quali la data prima maturazione dei frutti, la scalarità della maturazione e il successivo rilevamento di dati biometrici di foglie, fiori e frutti.
2. La **caratterizzazione molecolare** delle piante analizzate morfologicamente, attraverso l'utilizzo di marcatori microsatelliti (SSR) con metodica PCR e sequenziamento al fine di effettuare una discriminazione genetica tra gli individui e possibilmente un'identificazione varietale;
3. Un'indagine del **profilo nutraceutico** dei frutti di piante con caratteristiche salienti e ben riconoscibili, utilizzando sia saggi colorimetrici spettrofotometrici sia analisi HPLC per l'individuazione di composti benefici per la salute umana quali polifenoli (flavonoidi, acidi fenolici), carotenoidi, zuccheri e aminoacidi. Tra i carotenoidi particolare attenzione è stata posta nell'individuazione della zeaxantina, un composto che svolge un ruolo importante nella protezione della macula della retina e che viene impiegato nel trattamento delle patologie degenerative dell'apparato oculare.
4. Stabilire come l'anno di produzione e il momento di raccolta durante la stagione di fruttificazione influiscano sulla composizione dei principali metaboliti secondari e composti funzionali e sulla loro attività antiossidante, basandosi sulle relazioni con i **parametri ambientali**, quali temperatura e piovosità.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1. Area di studio

I campioni sono stati raccolti durante tre stagioni consecutive (2018, 2019 e 2020) nella piantagione biologica dell'Azienda Agricola Bragaglia, una delle prime coltivazioni di goji in Toscana. Il campo si trova nell'entroterra maremmano a circa 250 m s.l.m., vicino a Magliano in Toscana (42° 38'29.75 "N, 11° 16'17.45" E) (Figura 2). Attualmente la piantagione è composta da 1 ettaro di circa 1800 piante, impalcato in file di circa 130 m, con densità di impianto di 1,6 m x 2,8 m. Le piante derivano da semi provenienti da frutti biologici di *Lycium barbarum* d'importazione, di cui però non è stato possibile stabilirne l'esatta provenienza.

Da un punto di vista geopedologico la zona è abbastanza varia e le formazioni geolitologiche, in relazione alla loro datazione e alle caratteristiche dei suoli a cui hanno dato origine, possono essere divise in due raggruppamenti principali: un settore occidentale piuttosto uniforme, dove prevalgono rilievi arenacei di tipo macigno o pietraforte, e un settore orientale, in corrispondenza delle formazioni calcaree e argillo-scistose, che appare più articolato. I suoli sono in generale non molto profondi, con substrato roccioso talvolta affiorante. La loro tessitura va da franco-limosa a franco-sabbiosa nella parte occidentale derivata dal macigno (sub-acidi/alcalini), mentre sono a tessitura franco-argillosa o franco-limosa nella parte orientale derivata dalle formazioni calcaree (alcalini).



**Figura 2.** Immagine satellitare della piantagione di *L. barbarum* oggetto di studio (Google Earth Pro © 2021 Google LLC).

### 3.2. Dati termometrici e pluviometrici

Nei pressi dell'area di studio sono presenti delle stazioni di rilevamento meteorologico del sistema SIR della Regione Toscana (<https://www.sir.toscana.it>), attraverso le quali è stato possibile raccogliere dati

termometrici e pluviometrici giornalieri, utili per la caratterizzazione meteo climatica dell'area (Tabella 2). I dati, estrapolati da file d'archivio Excel, sono stati elaborati per ottenere:

- temperatura media annuale, calcolata come la media delle temperature medie mensili;
- temperatura media dei mesi di fruttificazione (luglio, agosto, settembre, ottobre, novembre);
- precipitazioni annuali e precipitazioni mensili dei mesi di fruttificazione (luglio, agosto, settembre, ottobre, novembre).

**Tabella 2.** Valori medi ( $\pm ds$ ) delle temperature ( $^{\circ}C$ ) e mm totali di pioggia dei mesi di fruttificazione nelle tre stagioni, registrati nei pressi di Magliano in Toscana, nell'area di coltivazione di *L. barbarum*.

	2018			2019			2020		
	mm	$^{\circ}C$	$\pm ds$	mm	$^{\circ}C$	$\pm ds$	mm	$^{\circ}C$	$\pm ds$
Luglio	4	25,5	$\pm 7,7$	30,6	26,1	$\pm 8,5$	6,4	25,8	$\pm 8,6$
Agosto	77,4	25,9	$\pm 7,8$	1	26,4	$\pm 8,4$	46,2	27,3	$\pm 8,3$
Settembre	47	22,5	$\pm 7,4$	82,4	22	$\pm 7,3$	65,8	22,1	$\pm 8,0$
Ottobre	87,6	18,4	$\pm 6,0$	114,8	18,4	$\pm 6,2$	82,2	14,7	$\pm 5,8$
Novembre	136,6	13	$\pm 5,4$	291,6	13	$\pm 4,5$	54	13	$\pm 5,8$
Stagione di fruttificazione	352,6	21,1	$\pm 6,9$	520,4	21,2	$\pm 7,0$	254,6	20,6	$\pm 7,3$
Annuale	966,8	16,3	$\pm 6,8$	916,8	16,2	$\pm 6,8$	536,2	16,2	$\pm 6,5$

### 3.3. Elaborazione *de novo* di una scheda morfologica specifica per la specie *Lycium barbarum*

Le piante oggetto di studio sono state selezionate tramite campionamento casuale semplice nella piantagione, poi cartellate e registrate in base alla loro posizione nei filari in campo. Per poter effettuare una discriminazione morfologica accurata di ogni singola pianta, è stata costruita una scheda riportante una serie di descrittori, attingendo da schede preesistenti create per la valutazione di alberi e arbusti da frutto.

I parametri presi in considerazione per la specie *L. barbarum* sono stati: portamento (eretto, espanso, pendulo); vigoria; attitudine pollonifera; presenza di nuovi tralci assurgenti; spinescenza; forma, margine, colore e brillantezza della foglia; presenza di fiori e loro caratteristiche; presenza di rami fruttiferi; forma, colore e dimensione del frutto (Figura 3). Sono state inoltre registrate: la facilità al distacco e sapore del frutto, la presenza e la tipologia di impollinatori e la presenza e la tipologia di parassiti.

L'analisi morfologica di frutti e foglie è stata effettuata su un minimo di 20/25 campioni per ogni pianta e le misurazioni sono state effettuate a seguito dell'acquisizione delle immagini tramite fotocamera Canon 650D ed elaborazione tramite il software free ImageJ® (Schneider et al., 2012). I frutti sono stati inoltre pesati con bilancia analitica (Sartorius AG, Otto-Brenner-Str.20, 37079 Goettingen, Germany, 0,0001 g) e il contenuto zuccherino in  $^{\circ}Brix$  è stato misurato con rifrattometro portatile.

<b>ID pianta</b>			
<b>Luogo</b>			
<b>Data</b>		<b>Ora</b>	
<b>Rilevatore</b>			

<b>Fase</b>	Vegetativa			
	Fioritura			
	Fruttificazione			
<b>Portamento</b>	Eretto			
	Espanso			
	Pendolo			
<b>Vigoria</b>	Scarsa (0)			
	Media (1)			
	Elevata (2)			
	Molto elevata (3)			
<b>Attitudine pollonifera</b>	Assente (0)			
	Scarsa (1)			
	Media (2)			
	Elevata (3)			
<b>Tralci nuovi</b>	Assurgenti		Non assurgenti	
<b>Spinescenza</b>	Assente		Presente	
	<b>Se presente, su quali rami:</b>			
<b>Foglia</b>	<b>Forma</b>		<b>Margine</b>	
	Lanceolata		Intero	
	Ovata		Lobato	
	Altro:		Altro:	
	<b>Intensità colore verde pagina superiore</b>		<b>Brillantezza pagina superiore</b>	
	Chiaro		Scarsa	
	Medio		Media	
		Elevata		

<b>Fiori</b>	Assenti		Presenti	
	Isolati			
	Raggruppati			
	Se raggruppati, in che numero			
	<b>Osservazioni:</b>			
<b>Rami fruttiferi</b>	Assenti			
	Presenti			
<b>Frutti</b>	<b>Forma</b>		<b>Colore del frutto maturo</b>	
	Rotonda		Bianco	
	Ovale		Giallo	
	A peperoncino		Arancio	
	Con fondo piatto		Rosso	
	Altro:		Altro:	
	<b>Dimensione</b>		<b>Facilità del distacco</b>	
	Piccolo		Bassa	
	Medio		Media	
	Grande		Elevata	
	<b>Sapore</b>			
	Sgradevole (0)		Molto gradevole (3)	
	Poco gradevole (1)		Gradevole (2)	
<b>Impollinatori</b>	Presenti			
	Assenti			
	<b>Specie riconosciute:</b>			
<b>Parassiti /malattie</b>	Si			
	No			
	<b>Specie riconosciute:</b>			

Figura 3. Lista di descrittori creata *de novo* con caratteri morfologici e aspetti qualitativi specifici per la specie *L. barbarum*.

### **3.4. Campionamenti**

#### **3.4.1. Campionamento del materiale fogliare**

Il materiale fogliare è stato campionato durante la stagione 2019-2020 per poter estrarre il DNA necessario per la caratterizzazione molecolare tramite marker microsatelliti. Le foglie sono state scelte per massimizzare la resa dell'estrazione: per ogni pianta, sono state raccolte le foglie nuove, più tenere, situate nella parte apicale del tralcio nuovo. Ogni campione è stato raccolto a mano e inserito in sacchetti di plastica o vial contrassegnate. Il materiale è stato conservato a 4°C e processato nell'arco di 48 h.

#### **3.4.2. Campionamento dei frutti**

I frutti utilizzati per le analisi nutraceutiche sono stati raccolti su un minimo di cinque piante per ogni morfotipo individuato sulla base delle caratteristiche morfologiche descritte nella scheda in Figura 3. Sono stati raccolti su tutta la chioma i frutti giunti a maturazione commerciale, integri e privi di alterazioni.

I vari pool sono stati raccolti durante 3 stagioni di fruttificazione: 1 campionamento durante la stagione 2018, 7 campionamenti nel 2019 e 8 campionamenti nel 2020. Nelle stagioni 2019 e 2020 i campionamenti sono stati effettuati in vari timepoint durante il periodo di fruttificazione (luglio, settembre, ottobre, novembre). Nel mese di agosto non sono mai stati raccolti frutti poiché le piante non hanno mai fornito materiale idoneo al campionamento. Dopo il campionamento, i frutti sono stati ridotti in polvere in azoto liquido e conservati a -20°C fino al successivo utilizzo.

### **3.5. Estrazione del DNA**

Il DNA per le indagini molecolari è stato estratto da materiale fogliare tramite metodo CTAB di Doyle & Doyle (1987), con modifiche. 150 mg di foglie giovani, con un miglior rapporto massa di DNA/massa di tessuto, sono state pestellate finemente in tampone CTAB (CTAB 2%, Tris/HCl 200 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, PVP K30 1%), e quindi poste in incubatore a 65°C per 30 min. Dopo la centrifuga, il surnatante è stato trattato in ghiaccio con una soluzione di cloroformio:isoamilalcol (24:1), che elimina gran parte delle proteine e dei pigmenti (tra cui la clorofilla) e il surnatante è stato quindi raccolto in una nuova eppendorf e incubato a 37°C con 4 uL di RNase A per 15 min. Quindi alla soluzione è stato aggiunto isopropanolo per favorire la precipitazione del pellet di DNA. Per migliorare la qualità del DNA estratto, sono stati effettuati lavaggi con due tipi di wash solution: la prima composta da etanolo 76% e sodio acetato 200 mM, e la seconda composta da etanolo 76% e ammonio acetato 10 mM.



Il pellet di DNA è stato quindi asciugato sotto cappa per circa 10 min e risospeso in 80 uL di acqua sterile. La qualità e la quantità del DNA risospeso è stata valutata attraverso lettura spettrofotometrica con Biophotometer® Eppendorf e successivamente con corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,2%.

### **3.6. Marcatori molecolari**

Per l'esame della struttura genetica della popolazione e della variabilità genetica dei campioni, sono stati selezionati 15 microsatelliti (Tabella 4). I marcatori usati sono stati scelti e disegnati sulla base del lavoro di Kwon et al. (2009).

### **3.7. Protocollo PCR e sequenziamento**

Il DNA estratto è stato diluito con acqua ultrapura (UltraPure™ DEPC-Treated Water, Invitrogen™) fino ad una concentrazione di 25 ng/mL. Il metodo utilizzato per l'amplificazione dei marcatori scelti è quello di Schuelke (2000). Per ogni marcatore è stata creata una mix contenente H<sub>2</sub>O MilliQ, Buffer 1X, dNTPs (0.2 mM), Primer Fw (2 pmol), Primer Rv (8 pmol), Primer M13(-21) (8 pmol) (FAM o HEX), Taq 1U e 2 uL di campione (@ 50 ng di DNA), per un totale di 25 uL per pozzetto.

Le condizioni di amplificazione PCR sono state le seguenti: 94°C (5 min), quindi 30 cicli a 94°C (30 s)/ 58°C (45 s)/ 72°C (45 s), seguiti da 8 cicli 94°C (30 s)/ 55°C (45 s)/ 72°C (45 s) e un'estensione finale a 72°C per 10 min. La verifica dei prodotti di amplificazione è stata effettuata ogni volta con una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,2%. Le piastre sono state conservate a -20°C fino al sequenziamento.

L'analisi di frammenti di PCR è stata eseguita mediante elettroforesi capillare automatica in fluorescenza, su sequenziatore a singolo capillare ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Per la corsa è stato usato un capillare di 47 cm e il polimero POP4. Il modulo di corsa utilizzato è stato il GS STR POP4 (1 ml) G5. Per la corsa è stato caricato 1 mL (più o meno diluito) di PCR in 14 mL di formammide deionizzata e GeneScan500LIZ Size Standard come standard interno di peso molecolare. L'analisi è stata effettuata tramite software Gene Scan Analysis v. 5.1 (Applied Biosystems). Il sizing è stato effettuato tramite software Gene Maker (SoftGenetics LLC).

**Tabella 4.** Elenco dei marcatori microsatelliti utilizzati e loro caratteristiche principali.

Marker	Repeat motif	Forward/Reverse	Primer sequence (5'-3')	Size	A	MAF	He	Ho	PIC	Ta (°C)
GB-LCM-003	(CA) <sub>6</sub> , (CAA) <sub>4</sub>	Fw Rv	CTACACCATTCGGCCAAC TGCATGGCCGTGTATATG	270-276	3	0.83	0.17	0.29	0.27	57
GB-LCM-021	(AT) <sub>4</sub>	Fw Rv	ATCAAGGCGCTATTTCCC GGCCGGGATCTGTTAGAC	237-321	3	0.83	0.17	0.29	0.27	58
GB-LCM-022	(CA) <sub>21</sub> , (YA) <sub>12</sub>	Fw Rv	CGCGCAGTAATTCCATGT TGCATGGCCGTGTATATG	103-245	2	0.67	0.00	0.44	0.35	58
GB-LCM-025	(GAG) <sub>4</sub>	Fw Rv	AAGACAGCACGCCAAAAA AGCCACCCCAACTAAAA	258-267	3	0.58	0.83	0.54	0.46	58
GB-LCM-029	(TG) <sub>3</sub> , (TG) <sub>2</sub>	Fw Rv	TGGATGGTCTATGCATGTTG CAAGCCACCAAACCTTCA	204-206	2	0.75	0.50	0.38	0.30	58
GB-LCM-037	(TTA) <sub>4</sub>	Fw Rv	CTGCTTAAACGATTGCCG GAAAGAGCCCAATGCAAA	253-262	2	0.50	1.00	0.50	0.38	58
GB-LCM-044	(GT) <sub>13</sub>	Fw Rv	GTGTGTGGGGTCTGAGC CAAAGTCACAACGTGCGCA	319-339	2	0.80	0.00	0.32	0.27	56
GB-LCM-075	(CA) <sub>15</sub>	Fw Rv	TCTCCTTCGGACCCATTT TTGGCATAAGGTGCTCGT	136-228	5	0.40	0.80	0.72	0.68	58
GB-LCM-087	(GCW) <sub>34</sub>	Fw Rv	CTCCTGAATACCCTGGGC AGAAGAAGCAGCAGCACG	117-240	5	0.58	0.50	0.61	0.58	58
GB-LCM-104	(GTT) <sub>2</sub> , (GTT) <sub>2</sub>	Fw Rv	TTTGAATGAAACGACGG ACACCCCGAGACTTAGC	289-346	3	0.58	0.50	0.57	0.50	58
GB-LCM-119	(CA) <sub>4</sub> , (CA) <sub>4</sub>	Fw Rv	AATGTACATCGCCCCA GATTCGGAGCCTGCTTTT	276-286	3	0.50	1.00	0.57	0.48	58
GB-LCM-120	(TG) <sub>2</sub> , (TG) <sub>3</sub>	Fw Rv	GATTCAGGCCGAATGAGA CACATGGCGTATGGACAA	162-22	2	0.58	0.50	0.49	0.37	58
GB-LCM-145	(AT) <sub>4</sub> , (AT) <sub>4</sub>	Fw Rv	CGTGACTAGTCCCCGAAC TGTATGATCCCACTCGCC	243-255	2	0.50	1.00	0.50	0.38	58
GB-LCM-166	(TTC) <sub>3</sub>	Fw Rv	CTGAGAGCTGATGTGGC AGGAGGAGAAGGGGGAAG	213-225	3	0.50	1.00	0.58	0.49	58
GB-LCM-167	(GA) <sub>7</sub> , (GA) <sub>18</sub>	Fw Rv	CTTGAAGATGGAGGAAAGCA CCCAAATTAAGGGGCA	193-227	6	0.40	0.60	0.76	0.73	58
GB-LCM-199	(CA) <sub>9</sub> , (CA) <sub>2</sub>	Fw Rv	CCATTTGCACCACAAAGG TAAGGGCCCTCTCAACG	293-317	3	0.67	0.67	0.49	0.42	58

### 3.8. Preparazione degli estratti da frutto per i saggi colorimetrici spettrofotometrici

Ciascun campione di laboratorio è stato realizzato unendo i pool di bacche raccolte da almeno cinque piante per morfotipo, selezionate all'interno del frutteto. 1 g della polvere (vedere la sezione 2.2) è stato omogeneizzato in 3 mL di acetone al 70% da Turrax (IKA a base di Ultra-Turrax® T25, Saint Louis, MS, USA) per 5 minuti, quindi sonicato (Elma Transsonic T460/H, Wezikon, Svizzera) per 20 minuti, omogeneizzato una seconda volta e infine centrifugato per 5 minuti a 4000 rpm (Centrifuga Eppendorf® 5702, Amburgo, Germania).

### 3.9. Analisi spettrofotometriche

#### 3.9.1. Metodo FRAP

Il metodo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) è una procedura semplice ed economica che misura i livelli totali di antiossidanti in un campione. La proprietà antiossidante viene valutata da una reazione redox che si verifica tra il substrato (donatore di elettroni) e gli ioni  $\text{Fe}^{3+}$  (accettore di elettroni), producendo ioni  $\text{Fe}^{2+}$ . Questa riduzione è monitorata spettrofotometricamente dal cambiamento nel colore della soluzione di  $\text{Fe}^{3+}$  con TPTZ (2,4,6-tris (2pyridyl) -s-triazine), che diventa blu e assorbe la radiazione elettromagnetica alla lunghezza d'onda di 593 nm (Benzie & Strain, 1999, 1996).

Il reagente FRAP è stato prodotto mescolando tampone acetato 300 mM (pH 3.6), una soluzione di 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM e di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM in un rapporto 10:1:1. Il tampone acetato 300 mM è stato preparato miscelando 3,1 g di acetato di sodio triidrato ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) con 16 ml di acido acetico glaciale e portato a 1 litro con acqua distillata. La soluzione TPTZ è stata preparata producendo una soluzione di 10 mM TPTZ in etanolo 100%.

Il metodo prevede che 2040  $\mu\text{l}$  di tampone acetato, 200  $\mu\text{l}$  di TPTZ e 200  $\mu\text{l}$  di cloruro ferrico siano aggiunti a 20  $\mu\text{l}$  di estratto. L'estratto è stato diluito ogni volta 1:2 in  $\text{H}_2\text{O}$  per garantire la corretta lettura spettrofotometrica. Come bianco sono stati utilizzati 20  $\mu\text{l}$  di acqua al posto dell'estratto. Per ogni estratto sono state fatte tre repliche tecniche. Una volta aggiunti estratto (o acqua) e reagente FRAP in tubi da 10 mL, ogni tubo è stato vortexato e la reazione è stata fatta procedere a 37°C per 1 ora in stufa. La lettura è stata quindi eseguita con spettrofotometro (Shimadzu UV- 1280) a 593 nm.

I valori di assorbanza ottenuti sono stati inseriti in una curva standard ottenuta dall'interpolazione delle assorbanze di concentrazioni note (0,078125 - 0,15625 - 0,3125 - 0,625 - 1,25 - 2,5 mmol/L) di solfato ferroso eptaidrato ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

Per ogni estratto sono state realizzate tre repliche tecniche. Infine, sono stati calcolati la media e la deviazione standard. I risultati sono stati espressi in mmol di  $\text{Fe}^{2+}$  equivalenti per g di materiale (mmol  $\text{Fe}^{2+}$ eq/g).

### 3.9.2. Metodo Folin-Ciocalteu

Il metodo utilizzato per la determinazione della concentrazione dei polifenoli totali è quello proposto da Folin e Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927) per la determinazione della tirosina. Il metodo Folin-Ciocalteu è uno dei più popolari per l'analisi dei fenoli (Singleton & Rossi, 1965) e il suo principio è la riduzione del reagente Folin-Ciocalteu (FCR) in presenza di fenoli con conseguente produzione di molibdeno - blu di tungsteno, la cui intensità aumenta linearmente con la concentrazione di fenoli nel mezzo di reazione di ossidazione, condotta a pH intorno a 10 (soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e che viene misurato spettrofotometricamente a 765 nm.

Il protocollo utilizzato è quello di Singleton et al. (1999) con alcune modifiche: ad una provetta sono stati aggiunti 500 µl di estratto diluito 1:10 in acqua deionizzata MilliQ. Sono stati quindi aggiunti 3000 µl di H<sub>2</sub>O, 250 µl FCR, 750 µl di sodio carbonato e infine altri 950 µl di H<sub>2</sub>O. I tubi sono stati quindi vortexati e posti in stufa a 37°C per 30 min per fare avvenire la reazione. Il bianco è stato fatto lasciando reagire 500 µl di H<sub>2</sub>O anziché di estratto diluito.

La curva di calibrazione standard è stata creata utilizzando concentrazioni note di acido gallico (3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 µg/mL) e interpolando queste con le relative assorbanze. La misura spettrofotometrica è stata effettuata a 765 nm. Per ogni estratto sono state realizzate tre repliche tecniche. Infine, sono stati calcolati la media e la deviazione standard. I risultati sono stati infine espressi come mg GAE (acido gallico equivalenti) per 1 g di materiale.

### 3.9.3. Metodo dei Sali di alluminio

Il saggio spettrofotometrico basato sulla formazione di un complesso di alluminio è una delle procedure più comunemente utilizzate per la cosiddetta determinazione dei flavonoidi totali, poiché il contenuto di questi composti è considerato un parametro importante per la valutazione di campioni di alimenti o piante medicinali.

Per la valutazione dei flavonoidi totali negli estratti di frutto è stato utilizzato il metodo di Smirnova & Pervykh (1999). 500 uL estratto non diluito sono stati aggiunti a 1,5 mL etanolo 95% in tubi da 10 mL. Successivamente sono stati aggiunti 100 uL cloruro di alluminio, 100 uL acetato di potassio e 2800 uL H<sub>2</sub>O. Dopo aver vortexato i tubi, la reazione è avvenuta con incubazione per 30 min a temperatura ambiente. La curva di calibrazione standard è stata creata utilizzando concentrazioni note di quercetina (3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 µg/mL) e interpolando queste con le relative assorbanze. La misura spettrofotometrica è stata effettuata a 415 nm. Per ogni estratto sono state realizzate tre repliche tecniche. Infine, sono stati calcolati la media e la deviazione standard. I risultati sono stati infine espressi come mg di quercetina equivalenti per 1 g di materiale.

### 3.10. Analisi HPLC

#### 3.10.1. Analisi dei carotenoidi

Per analizzare il profilo dei carotenoidi presenti nei frutti, è stato utilizzato il metodo di Barba et al. (2006). L'estratto è stato preparato pesando 0.3 g di campione in polvere, aggiunto a 10 mL di esano/acetone/etanolo (50:25:25, v/v/v). La soluzione è stata quindi omogenizzata in Ultra Turrax (IKA®). Sono stati quindi aggiunti 1,5 mL di H<sub>2</sub>O distillata e poi il mix è stato vortexato. 1mL di surnatante è stato poi prelevato e asciugato in Vacufuge.

L'estratto ottenuto è stato quindi risospeso in 0,4 mL di una soluzione di esano/acetone/etanolo (50:25:25, v/v/v).

L'analisi HPLC è stata effettuata con HPLC Waters 996 Photodiode Array Detector (DAD) con colonna di separazione RP-C18 (Supelco Kromasil 100A-5u-C18 4,6 mm x 250 mm) non termostatata. La fase mobile era composta da metanolo/ACN (A, 90:10, v/v) e trietanolamina (TEA, 9 mM). Il flusso era settato a 0,9 mL/min e il volume di iniezione a 10 µL. La lunghezza d'onda di rilevamento era 475 nm, con run time di 20 min. La curva di calibrazione standard è stata costruita con 5 punti: 6,25-12,5-25-50-100 µg/mL per i seguenti composti: b-carotene e zeaxantina.

#### 3.10.2. Analisi dei polifenoli

L'estratto è stato preparato secondo il metodo di Tokuşoğlu et al. (2003). Un grammo di materiale è stato aggiunto a 1 mL di una soluzione di acetone 70%, HCl 1% (v/v) e 0,5 mg/mL tert-butildidroquinone (TBHQ) e quindi omogenizzato in UltraTurrax (IKA®). Sono stati quindi aggiunti 1,2 mL di HCl (1,2 M) e la soluzione è stata messa in incubazione in agitatore a 90°C per 2 h. Successivamente la soluzione è stata raffreddata a T°C ambiente e poi sonicata per 3 min. L'estratto è stato quindi centrifugato 5 min a 3000 g e filtrato con membrana 0,45 µm.

L'analisi con HPLC è stata effettuata secondo il metodo Kumar et al. (2008) con HPLC Waters 996 Photodiode Array Detector (DAD) con colonna C18 non termostatata (SUPELCO Kromasil 100A-5u-C18 250 mm x 4.6 mm diametro interno). La fase mobile era composta da (A) H<sub>2</sub>O e (B) acetonitrile con 0,02% acido trifluoroacetico (TFA) con il seguente gradiente di eluizione lineare: 0–5 min, 80% A–20% B; 5–8 min, 60% A–40% B; 8–12 min, 50% A–50% B; 12–17 min, 60% A–40% B; 17–21 min, 80% A–20% B. Il flusso era settato a 1,0 mL/min. Il volume di iniezione era di 10 µL. La lunghezza d'onda di rilevamento era 365 nm per flavonoidi, 325 nm per acidi fenolici. Le curve di calibrazione standard sono state costruite con 5 punti (range di concentrazione 5-100 µg/mL) per i seguenti composti: quercetina, rutina, kaempferolo, acido caffeico e acido clorogenico. I risultati ottenuti sono stati espressi in µg/g.

### 3.10.3. Analisi degli zuccheri

Per la determinazione degli zuccheri, 0,1 g di materiale sono stati estratti con 1 mL di acqua deionizzata Milli-Q. I campioni sono stati lisati con Ultra Turrax e la soluzione ottenuta è stata filtrata con filtri da 0,45 µm. L'analisi è stata effettuata con HPLC Waters 2487 IR con colonna C18 SUGAR- PARK I a scambio ionico (300 mm x 6,5 mm, Waters), impacchettata con microparticelle di gel a scambio cationico in forma di calcio e termostata a 90 °C. La fase mobile era costituita da 100% acqua distillata e il flusso settato a 0,5 mL/min. Il volume di iniezione era di 20 µL, con run-time di 20 minuti. Il segnale proveniente dal rivelatore era inviato tramite un convertitore A/D ad un computer e gestito da Software Clarity CSW-32. Le concentrazioni dei carboidrati sono state calcolate utilizzando delle curve di riferimento, costruite utilizzando standard certificati con concentrazioni variabili da 0,1 a 10 mg/ml. I risultati sono stati espressi mg/g.

### 3.10.4. Analisi degli aminoacidi

Gli aminoacidi sono stati determinati fluorimetricamente dopo pre-derivatizzazione utilizzando il metodo WATERS AccQ.Tag per HPLC. Il sistema HPLC è costituito da WATERS LC-MODULE 1 e rivelatore fluorimetrico 2475 e colonna C18 250 mm x 4,6 mm, 5µm, termostata a 40 °C. I campioni e gli standard di riferimento, sono stati trattati secondo il protocollo di derivatizzazione, contenuto nel relativo manuale. 0,1 g di materiale sono stati estratti con 1 mL di acqua deionizzata Milli-Q. I campioni sono stati lisati con Ultra Turrax e la soluzione ottenuta è stata filtrata con filtri da 0,45 µm. A 10 µl di campione sono stati aggiunti 70 µl di tampone borato e 20 µl reagente fluorescente, per un volume finale di 100 µl. Gli standard, che vengono corsi in duplicato prima di ogni lettura, sono stati trattati nel seguente modo: a 10 µl di standard aminoacidici proteici e 10 µl di standard aminoacidici non proteici sono stati aggiunti 60 µl di tampone borato e 20 µl di reagente fluorescente. Campioni e standard così trattati, sono stati quindi incubati a 55°C per 15 minuti. Per la fase mobile è stato utilizzato un gradiente formato un tampone a base di fosfati, sodio acetato e trietilammina, a pH 5 (A) e una soluzione di acetonitrile al 60% in acqua MilliQ (B): 0-0,84 min, 100%A; 0,84-25 min, 98%A; 25-31,70 min, 93%A; 31,70-53,40 min, 90%A; 53,40-61,80 min, 67%A; 61,80-63,50 min, 75%A; 63,50-70 min, 100%A. Il volume di iniezione era 5 µl di campione o standard e il flusso era settato a 1,5 ml/min. La lunghezza d'onda di eccitazione era di 250 nm mentre quella di emissione era di 395 nm.

Il segnale proveniente dal rivelatore era inviato tramite un convertitore A/D ad un computer e gestito da Software Clarity CSW-32. Le concentrazioni degli aminoacidi sono state calcolate utilizzando delle curve di riferimento, costruite utilizzando standard certificati con concentrazioni variabili partendo da 50 nmoli/mL. I risultati sono stati infine espressi in µg/g.

### 3.11. Analisi statistica dei dati

I dati raccolti in questo lavoro di tesi riguardano vari aspetti della pianta: le sue caratteristiche morfologiche, il suo background genetico e le proprietà nutraceutiche dei suoi frutti. Come descritto nei paragrafi precedenti, per poter ottenere tali dati sono stati effettuati diversi tipi di analisi, sia qualitative sia quantitative. Per poter ottenere delle informazioni significative, sono state condotte delle analisi statistiche diverse a seconda dei dati in analisi.

#### 3.11.1. Dati morfologici

I dati ottenuti dalla scheda di descrittori sono stati raccolti ed elaborati con Microsoft Excel per Mac (©Microsoft 2021, All Rights Reserved). Le immagini di foglie e frutti sono state elaborate con il software libero Image J (<http://imagej.nih.gov/ij>) per ottenere parametri morfometrici quali: lunghezza (mm), larghezza (mm), area (mm<sup>2</sup>) e descrittore di forma (Shape descriptor). I dati ottenuti sono stati analizzati mediante: la statistica descrittiva, per ottenere valori medi, loro deviazione standard, valori massimi e minimi e range; l'analisi della varianza (ANOVA a una via con variabile di gruppo a ANOVA a due vie) e il test multi-range post-hoc di Bonferroni applicato quando  $p \leq 0,05$  per sottolineare le differenze all'interno di ciascuna variabile; e infine un'analisi discriminante (Jackknifed classification) sulle foglie per verificare se la classificazione effettuata tramite valutazione visiva trovasse una corrispondenza con i valori dello shape descriptor circularity misurati per ogni pianta. Le elaborazioni sono state effettuate con il software StatPlus (© AnalystSoft Inc. 2021).

#### 3.11.2. Dati molecolari

I dati ottenuti dal sequenziamento sono stati elaborati col software GeneMarker® (© 2020 SoftGenetics, LLC. All rights reserved). Le frequenze alleliche e l'eterozigosi osservata e attesa sono state stimate come media di tutti i *loci*. Gli stimatori della statistica F di Weir e Cockerham (Weir & Cockerham, 1984) sono stati applicati per analizzare la diversità genetica sia all'interno che tra le popolazioni. La deviazione di  $F_{IS}$  da zero è stata testata per tutti i *loci* in tutte le popolazioni sotto l'ipotesi nulla dell'equilibrio di Hardy-Weinberg mediante un test di permutazione basato su 1000 repliche. I valori  $F_{ST}$  sono stati stimati per valutare l'entità della differenziazione tra le popolazioni. La distanza genetica di Nei (1978) è stata calcolata per confronti a coppie di popolazioni, sotto un modello di allele infinito. L'analisi delle coordinate principali (PCoA) è stata eseguita sulla base di quelle distanze genetiche a coppie tra gli individui. Per queste analisi abbiamo utilizzato Genetix 4.05.2 (Belkhir, 1999). Per studiare la presenza di strutturazione genetica nelle popolazioni studiate, sono state utilizzate le analisi di clustering bayesiano implementate nel programma STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard et al., 2000). In primo luogo, abbiamo determinato il numero più probabile di pool genetici ancestrali (K) basato sui genotipi dei

microsatelliti nucleari. Ciò è stato effettuato tramite il metodo K sviluppato Evanno et al. (2005), usando HARVESTER (Earl & VonHoldt, 2012).

### **3.11.3. Dati biochimici**

I dati analitici sono stati analizzati con il software StatPlus per MacOS (© AnalystSoft Inc. 2021) mediante statistica descrittiva e test ANOVA a una via con variabile di gruppo e ANOVA a due vie con il software StatPlus (© AnalystSoft Inc. 2021) Il test multi-range post-hoc di Bonferroni è stato applicato quando  $p \leq 0,05$  per sottolineare le differenze all'interno di ciascuna variabile. L'analisi di correlazione lineare è stata applicata per scoprire la relazione tra le variabili espressa come coefficiente di correlazione di Pearson.



## 4. Risultati e discussione

### 4.1. Analisi morfologica

L'analisi morfologica della pianta di *L. barbarum* è stata effettuata partendo dalla lista di descrittori ideata *de novo* per lo scopo. Essa è stata creata sulla base di liste preesistenti (Bellini et al., 2007), utilizzate per la descrizione e caratterizzazione di alberi e arbusti da frutto di interesse commerciale.

Tale lista ha permesso di eseguire una prima discriminazione qualitativa visiva delle caratteristiche salienti della pianta (aspetto generale della pianta, foglie, fiori e frutti) e di poter successivamente valutare quantitativamente alcuni dei parametri, al fine di ottenere dati utili alla caratterizzazione e comprendere se tra questi esistessero dei caratteri maggiormente discriminanti e quindi capire come questi potessero influire sulla scelta delle piante per successiva propagazione per talea.

#### 4.1.1. Aspetto della pianta

I caratteri portamento (Figura 4), vigoria, attitudine pollonifera e portamento dei tralci nuovi hanno permesso di descrivere come la pianta occupa lo spazio, il suo stato di salute e la sua capacità di rigenerarsi.

Nella Tabella 5 è riportata la frequenza di ciascuna delle caratteristiche sopra menzionate sul totale delle piante selezionate: i tre tipi di portamento sono risultati essere uniformemente distribuiti nella popolazione in esame, con la maggior parte delle piante (39,3%) aventi un portamento espanso, seguite da quelle con portamento eretto (33,3%) e poi pendulo (27,4%).

**Tabella 5.** Frequenza dei principali caratteri osservati nelle piante campionate: portamento, vigoria, attitudine pollonifera e portamento dei tralci nuovi.

<b>Portamento</b>	<b>%</b>	<b>Vigoria</b>	<b>%</b>	<b>Attitudine pollonifera*</b>	<b>%</b>	<b>Tralci nuovi</b>	<b>%</b>
eretto	33,3	scarsa	11,9	assente	36,9	assurgenti	32,1
espanso	39,3	media	59,5	scarsa	29,8	non assurgenti	67,9
pendulo	27,4	elevata	21,4	media	21,4		
		molto elevata	7,1	elevata	11,9		

\* assente = 0 polloni; scarsa= da 1 a 2 polloni; media= da 3 a 4 polloni; elevata= da 5 polloni in su.

La vigoria, caratteristica che rispecchia anche lo stato di salute della pianta, è risultata essere generalmente buona, poiché solo l'11,9% delle piante valutate mostrava vigoria scarsa, riconoscibile in piante con poche foglie, tralci nuovi non ben sviluppati e assenza di frutti.

L'attitudine pollonifera, valutata sulla base del numero di polloni generati dalle radici superficiali, è risultata essere assente nel 36,9% delle piante, mentre il 63,1% della popolazione ha presentato tale caratteristica.

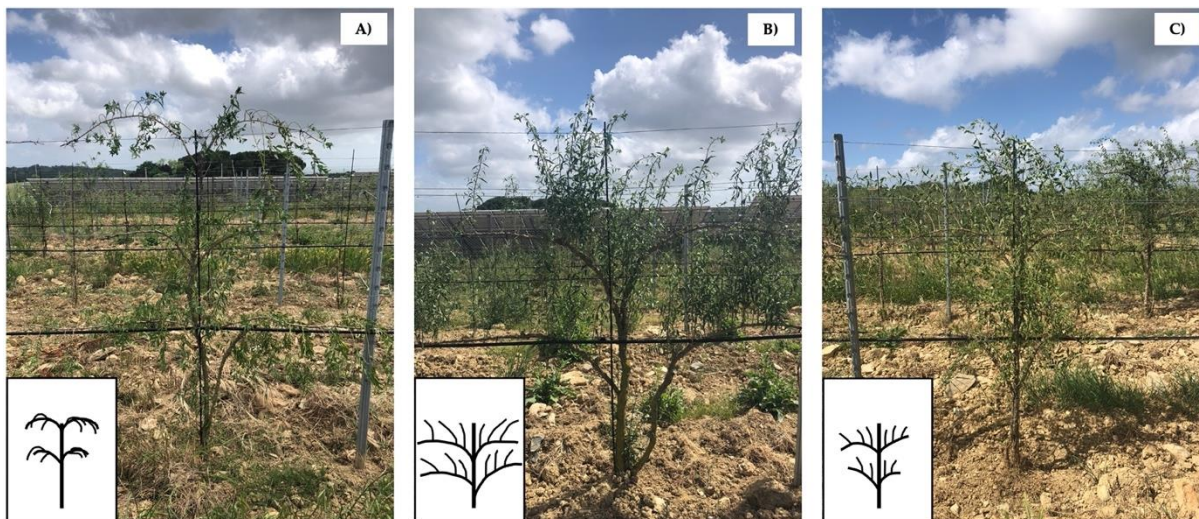


Figura 4. Portamento della pianta di *L. barbarum*: pendulo (A), espanso (B) ed eretto (C).

Il 67,9% delle piante presentava tralci nati nell'anno con portamento non assurgente. Le piante con tralci assurgenti rappresentavano il 32% del totale, di cui il 59,3% con portamento espanso e il 40,7% con portamento eretto. Tutte le piante con portamento pendulo invece presentavano tralci non assurgenti (Figura 5).

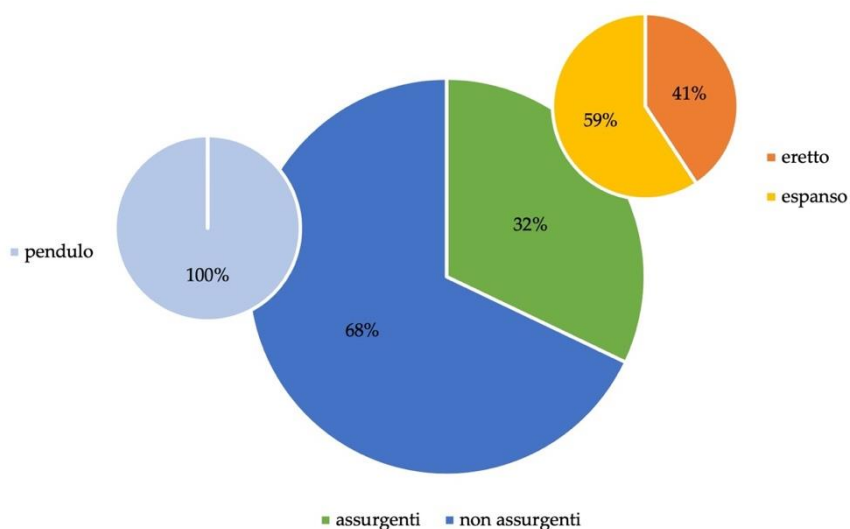


Figura 5. Grafico a torta che rappresenta il numero percentuale di piante con tralci nuovi assurgenti e non assurgenti (torta centrale) e i corrispondenti tipi di portamento rilevati (torte laterali).

Tra i descrittori inizialmente selezionati, solo alcuni hanno effettivamente avuto rilevanza nella discriminazione delle piante selezionate, come emerge ad esempio anche dal lavoro di Rodríguez-Medina et al. (2010) sulla specie *Psidium guajava*. Infatti, in questo studio sono stati presi in considerazione più di 50 descrittori e infine è stato identificato un minimo di descrittori altamente discriminatori, indispensabili per la classificazione delle accessioni.

Il portamento si è dimostrato un descrittore piuttosto importante, in quanto ha permesso di discriminare tre principali tipologie di pianta sulla base del loro modo di occupare lo spazio. Nella popolazione in esame i tre tipi di portamento si sono manifestati uniformemente e hanno mostrato anche una relazione con la presenza di tralci nuovi assurgenti: ad esempio il 100% delle piante con portamento pendulo avevano tralci nuovi non assurgenti, cioè tendenti a ricadere verso il basso.

La vigoria è una caratteristica che, seppure visivamente possa essere confusa o attribuita alla tipologia di portamento, è marcatamente determinata da fattori ambientali e climatici: dai risultati è emerso che il 59,5% delle piante mostrasse una vigoria media, quindi la maggior parte delle piante della popolazione dimostrava una buona capacità di rispondere al caldo estivo, senza però mostrare né spiccate capacità di resistenza, né particolari segni di sofferenza, manifestati invece dall'11,9% della popolazione, che presentava foglie ingiallite o parzialmente secche e frutti anneriti che non raggiungevano la completa maturazione.

Come già detto, l'attitudine pollonifera ci dà un'indicazione sulla capacità della pianta di rigenerarsi, nel caso di *L. barbarum* dalle radici superficiali, ma è anche una caratteristica che viene associata all'invasività di una specie (Möllerová, 2005; Wakeling & Bond, 2007). Nell'area di studio la maggior parte delle piante analizzate ha mostrato di avere questa capacità in vari gradi (da scarsa a molto elevata), ma i fattori che ne hanno determinato la manifestazione potrebbero essere da ricercare non solo nella genetica, ma anche nelle caratteristiche geopedologiche dell'area di studio. Infatti, il substrato roccioso e le rocce affioranti rendono probabilmente difficoltoso l'approfondimento dell'apparato radicale, così che le piante tendono a svilupparlo più superficialmente. Nonostante questo, le condizioni microclimatiche della zona, estremamente ventosa e poco piovosa, non permettono sempre un buono sviluppo di polloni, soprattutto nel periodo estivo, a causa della forte evaporazione superficiale del terreno. Le condizioni del sito influenzano anche lo sviluppo, la crescita e la sopravvivenza dei polloni. Le temperature fresche del suolo ritardano o inibiscono la comparsa dei polloni e ritardano la crescita delle piantine (Mundell et al., 2007). In specie come di pioppo tremulo, che è intollerante all'ombra, le basse intensità luminose rallentano la crescita dei polloni e ne riducono quindi la sopravvivenza (Landhäusser & Lieffers, 2001).

#### 4.1.2. La foglia

Grazie all'utilizzo del software ImageJ, è stato possibile misurare vari parametri fogliari, quali area, perimetro, lunghezza, larghezza e lo shape descriptor circularity per ogni pianta su un set rappresentativo di foglie (Tabella 6). Le foglie analizzate sono state sempre raccolte dal settore medio-apicale dei tralci nuovi fruttificanti di ogni pianta, così da rendere uniformi e confrontabili i dati raccolti.

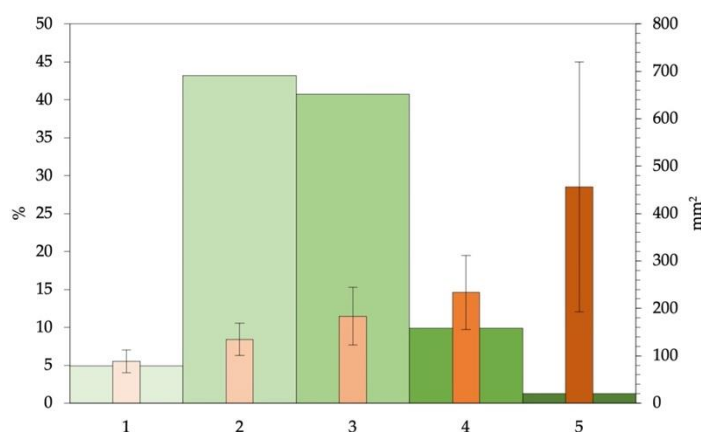
**Tabella 6.** Medie e deviazioni standard dei principali caratteri delle foglie misurate: area, perimetro, larghezza; lunghezza e *circularity* (shape descriptor). I valori sono espressi in mm<sup>2</sup> per l'area e in mm per le altre variabili dimensionali.

	Area	Perimetro	Larghezza	Lunghezza	Circularity
media	166,22±79,66	72,95±21,01	9,18±2,24	28,64±6,51	0,41±0,11
min	35,16	29,43	3,95	10,61	0,10
max	1189,81	197,68	23,45	75,86	0,71
range	1154,65	168,25	19,50	65,25	0,61

In generale, le foglie di *L. barbarum* hanno presentato un'area fogliare media di 166,22 mm<sup>2</sup> (±79,66 ds), perimetro medio di 72,95 mm (±21,01), larghezza media di 9,18 (±2,24), lunghezza media di 28,64 (±6,51) e *circularity* media di 0,41 (±0,11). Tutti questi valori mostrano una grande variabilità all'interno della popolazione, come si può evincere dalle deviazioni standard.

Sulla base di un'analisi discriminante (Jackknifed classification) sono stati creati dei gruppi di classificazione delle piante sulla base dell'area fogliare media, tenendo conto anche delle relative deviazioni standard.

Una volta ottenuta la percentuale massima di appartenenza a ciascuna classe, sono state calcolate le frequenze (Figura 6), le medie e le deviazioni standard delle medie, mostrate nella Tabella 7.

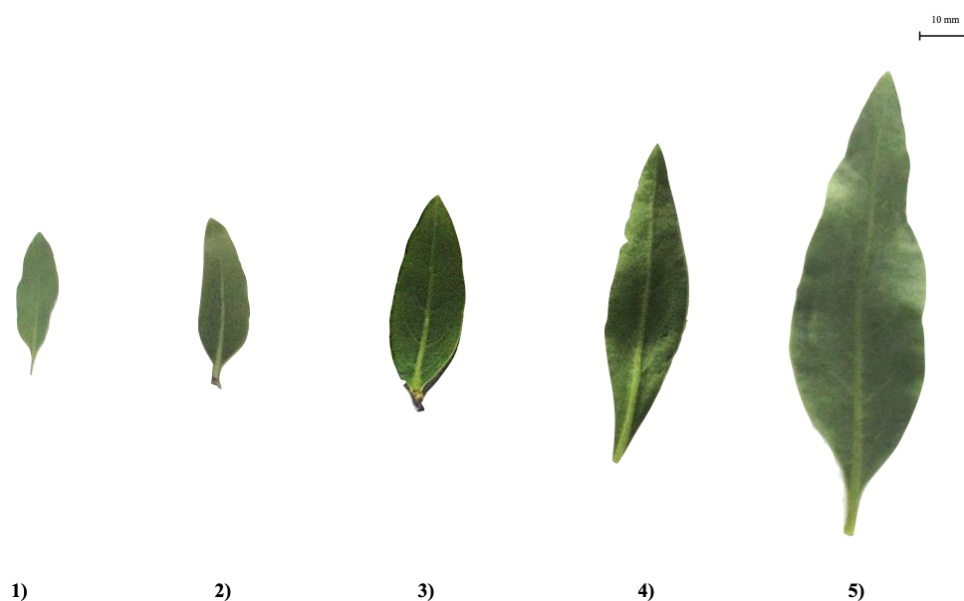


**Figura 6.** Frequenze (% , in verde) e relativi valori medi delle aree fogliari (mm<sup>2</sup>, in arancio) delle 5 classi di grandezza delle foglie.

**Tabella 7.** Frequenza delle classi di aree fogliari osservate nelle piante campionate e relativo valore medio ( $\pm$ deviazione standard).

Classe	Range	%	Media	ds
1	76-100	4,94	88,40	24,15
2	101-160	43,21	134,52	34,21
3	161-210	40,74	183,47	61,05
4	211-254	9,88	233,56	78,20
5	>255	1,23	456,07	263,46

Nella la Figura 7 sono raffigurati le 5 classi di grandezza riscontrati nella popolazione oggetto di studio. La maggior parte delle piante apparteneva alle classi 2 e 3 (rispettivamente 43,21% e 40,74%), mostrando quindi una dimensione fogliare media che va da 134,52 mm<sup>2</sup> ( $\pm$ 34,21) a 183,47 mm<sup>2</sup> ( $\pm$ 61,05). Le due classi estreme (1 e 5) sono quelle meno rappresentate e in particolare la classe 1, con valori di 88,40 mm<sup>2</sup>  $\pm$ 24,15 è risultata essere anche quella con minore variazione, mentre la classe 5, con valori di 456,07 mm<sup>2</sup>  $\pm$ 263,46, è risultata essere quella con la variazione maggiore.



**Figura 7.** Classi di grandezza delle foglie riscontrati in base alle aree fogliari nelle piante di *L. barbarum* L. appartenenti alla popolazione oggetto di studio. 1) = 76-100 mm<sup>2</sup>; 2) = 101-160 mm<sup>2</sup>; 3) = 161-210 mm<sup>2</sup>; 4) = 210- 254 mm<sup>2</sup>; 5) > 255 mm<sup>2</sup>.

Nella Tabella 8 sono riportati alcuni casi specifici con le dimensioni fogliari estreme: la pianta 7\*11 è stata quella che ha mostrato le dimensioni medie minori tra tutte le piante osservate e con una variabilità piuttosto bassa (ds= 27,55 e range= 103,79 mm<sup>2</sup>); di contro, la pianta 10\*9 (classe 5) è stata quella che ha mostrato maggiore dimensione media (456,07 mm<sup>2</sup>) e anche maggiore variabilità (ds= 263,46 e range= 1023,33 mm<sup>2</sup>). La pianta 10\*18, appartenente invece alla classe 2, è risultata invece essere quella con variabilità minore (ds= 17,38 e range= 57,94 mm<sup>2</sup>).

**Tabella 8.** Casi specifici estremi riscontrati tra le piante oggetto di studio (i valori delle aree sono espressi in mm<sup>2</sup>).

Pianta	Area media	ds	Min	Max	Range	Classe
7*11	82,45	27,55	35,16	138,95	103,79	1
10*18	106,75	17,38	85,72	143,66	57,94	2
10*9	456,07	263,46	166,48	1189,81	1023,33	5

Per quanto riguarda la classificazione sulla base della forma della foglia, come si evince dalla Tabella 9, quella predominante è risultata essere la lanceolata (54,8%), mentre la meno rappresentata è stata la forma ovata (4,8%). La categorizzazione è stata fatta dapprima in maniera visiva tramite osservazione diretta in campo, dopo di che le foglie sono state raccolte, fotografate e analizzate con apposito software. Da qui è stato poi calcolato il valore medio della circularity per ogni tipologia: le foglie con forma lanceolata hanno presentato una C media di 0,36 ( $\pm 0,07$ ), le foglie ovato-lanceolate 0,48 ( $\pm 0,07$ ) e quelle ovate, 0,53 ( $\pm 0,02$ ). L'analisi ANOVA ha inoltre evidenziato una differenza altamente significativa ( $p$ -value= 0,00) tra tutti e tre i gruppi.

Nella Figura 8 sono rappresentate le 3 tipologie di forma fogliare riscontrati.

**Tabella 9.** Frequenza delle forme fogliari osservate nelle piante campionate e relativo valore medio dello shape descriptor circularity ( $\pm$ deviazione standard).

Forma della foglia	%	Circularity
lanceolata	54,8	0,36 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
ovato-lanceolata	35,7	0,47 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
ovata	4,8	0,58 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>  $p$ -value $\leq$ 0,01

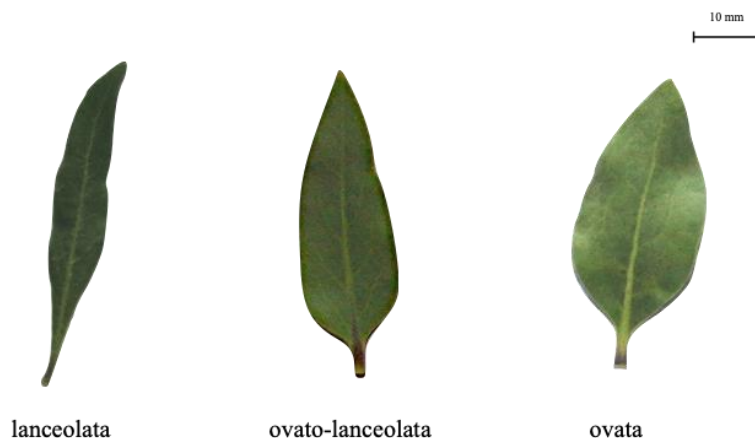
Questi valori sono stati valutati staticamente attraverso un'analisi discriminante che ha confermato la bontà della classificazione visiva, come riportato nella Tabella 10.

**Tabella 10.** Risultati dell'analisi discriminante (Jackknifed classification matrix) effettuata per verificare se i valori di circularity delle foglie misurati per ogni pianta corrispondessero alla valutazione visiva nelle tre categorie di forma.

	lanceolata	ovato-lanceolata	ovata	% corretta
lanceolata	<b>38</b>	8	0	83
ovato-lanceolata	2	<b>24</b>	4	80
ovata	0	0	<b>4</b>	100
totale	40	32	8	<b>83</b>

Eigenvalues = 0.911

Nei lavori dove vengono elencate le caratteristiche morfologiche della pianta di *L. barbarum*, le foglie vengono quasi sempre descritte come “lanceolate”, “ellittiche allungate” o “da lanceolate a ovate”, senza fornire una descrizione più accurata (Amagase & Farnsworth, 2011; Potterat, 2010; Yao et al., 2018).



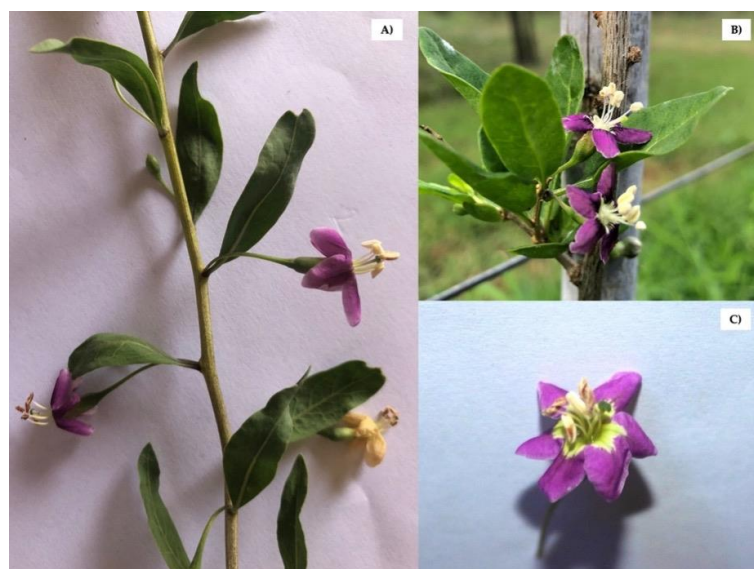
**Figura 8.** Forme tipo delle foglie riscontrate nelle piante di *L. barbarum* L. appartenenti alla popolazione oggetto di studio.

La forma della foglia in alcune specie di interesse commerciale è invece un’importante caratteristica che aiuta nella discriminazione varietale, come ad esempio nella pianta di caffè selvatico *Coffea kihansiensis* (Kusolwa et al., 2019) o nella papaya *Carica papaya* L. (de Oliveira et al., 2012).

#### 4.1.3. Il fiore

Per ogni pianta oggetto di studio sono stati analizzati anche i fiori (Figura 9). I fiori sono presenti sui tralci nuovi lignificati. Le osservazioni sui fiori sono state effettuate contestualmente a quelle effettuate sulle foglie, quindi sempre sul segmento medio-apicale dei tralci nuovi fruttificanti, per rendere omogenee e ripetibili le osservazioni.

Come già ritrovato in letteratura (Amagase & Farnsworth, 2011; Potterat, 2010) i fiori hanno corolla imbutiforme viola chiara con 5 petali e 5 stami. Le antere sono giallo pallido, deiscenti longitudinalmente. Il pistillo centrale è verde chiaro ben visibile (Figura 9B). Solitamente è stato riscontrato che al numero dei petali corrisponde il numero degli stami. Il 94,3% delle piante analizzate aveva solo fiori con 5 petali, ma il 5,7% di queste mostrava anche la presenza di fiori anomali con 6 petali e 6 stami (Figura 9C), insieme ai canonici fiori con 5 petali.



**Figura 9.** Fiori di *L. barbarum*: (A) ramo nuovo appena lignificato con fiori; (B) fiori fotografati in campo; (C) fiore anomalo con 6 petali.

Come si evince dalla Tabella 11, il 7,5% delle piante analizzate presentava fiori singoli, mentre il 28,3% fiori solo raggruppati e il 64,2% fiori sia singoli sia raggruppati. Il 34,0% delle piante aveva fiori raggruppati in gruppi di 2, mentre il 58,3% aveva fiori raggruppati in gruppi di 3 o più fiori, fino ad un massimo osservato di 6.

**Tabella 11.** Frequenza di alcune delle caratteristiche dei fiori osservate nelle piante campionate.

<b>Fiori</b>	<b>%</b>
singoli	7,5
raggruppati	28,3
singoli e raggruppati	64,2
<b>n. fiori/gruppo</b>	
1	7,5
2	34,0
≥3	58,5

#### 4.1.4. Il frutto

Grazie all'utilizzo del software ImageJ, è stato possibile misurare vari parametri del frutto, quali area, perimetro, lunghezza, larghezza e lo shape descriptor circularity per ogni pianta su un set rappresentativo di frutti.

Prima di tutto, in via generale, sono state raccolte informazioni riguardanti gli stadi di maturazione del frutto, così da poter effettuare i campionamenti sempre allo stesso stadio.



Nella Figura 10 sono raffigurati i 4 stadi principali di maturazione, che si susseguono nell'arco di 10-13 giorni, a seconda delle condizioni ambientali. In Mikulic-Petkovsek et al. (2012) si ritrova che i giorni medi per la maturazione del frutto di goji in Slovenia centrale sia di 13,7. In questo lavoro di tesi il numero medio di giorni per la maturazione è stato individuato a 11,5 giorni.

Lo stadio S1 è il primo, che va dal momento in cui avviene l'allegagione ai primi 3-5 giorni; il frutto si presenta molto duro e completamente verde. Dopodiché esso passa allo stadio S2, in cui il frutto è di colore prevalentemente verde, con invaiatura arancio inferiore al 50% della superficie del frutto; tale stadio ha una durata di 2-4 giorni. Si passa poi allo stadio S3, in cui i frutti sono quasi completamente invaiati, di colorazione arancio. L'ultimo stadio, S4, è quello di completa maturazione, con il frutto che appare completamente di colore rosso-arancio brillante e consistenza morbida ma che non si deforma al tatto. In tale stadio il frutto, giunto circa al suo decimo-dodicesimo giorno, si distacca facilmente dal suo picciolo.



**Figura 10.** Stadi di maturazione di *L. barbarum*: S1) stadio di frutto completamente immaturo (verde); S2) stadio di frutto invaiato <50% (prevalentemente verde); S3) stadio di frutto invaiato >50% (prevalentemente arancio); S4) stadio di frutto completamente maturo (completamente rosso-arancio).

Nella Tabella 12 sono riportati i risultati delle misurazioni di vari parametri sui frutti nei 4 stadi di maturazione: area, larghezza, lunghezza, *circularity*, numero di semi, contenuto zuccherino in °Brix e peso.

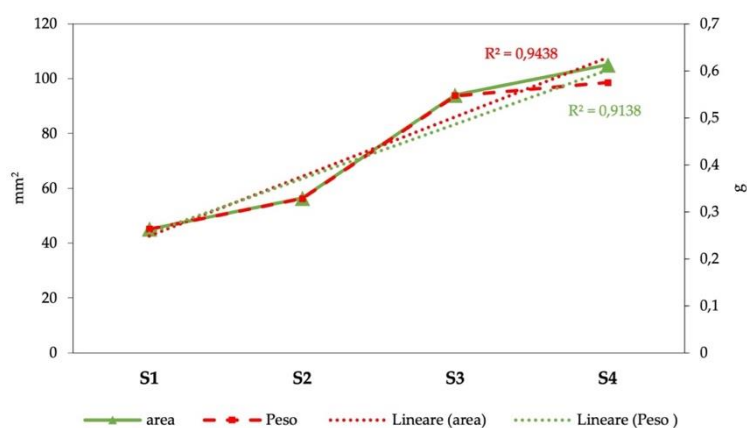
**Tabella 12.** Valori medi ( $\pm$ ds) dei principali caratteri: area, larghezza; lunghezza, *circularity* e peso dei frutti nei 4 stadi di maturazione. I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p$ -value $\leq 0,01$ )

	Area (mm <sup>2</sup> )	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Circularity	Peso (g)
S1	45,14 $\pm$ 13,16 <sup>a</sup>	5,35 $\pm$ 1,23 <sup>d</sup>	11,45 $\pm$ 2,05 <sup>g</sup>	0,62 $\pm$ 0,06	0,263 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>
S2	56,35 $\pm$ 5,81 <sup>a</sup>	6,66 $\pm$ 0,71 <sup>d</sup>	11,15 $\pm$ 0,73 <sup>g</sup>	0,70 $\pm$ 0,07	0,328 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>
S3	94,01 $\pm$ 20,74 <sup>b</sup>	7,85 $\pm$ 0,53 <sup>e</sup>	15,45 $\pm$ 2,56 <sup>h</sup>	0,67 $\pm$ 0,06	0,547 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>
S4	105,04 $\pm$ 21,46 <sup>b</sup>	9,76 $\pm$ 1,35 <sup>f</sup>	14,36 $\pm$ 1,67 <sup>h</sup>	0,78 $\pm$ 0,08	0,575 $\pm$ 0,151 <sup>b</sup>

$p$ -value= 0,00

Per quanto riguarda le dimensioni dei frutti, l'area nei quattro stadi di maturazione ha presentato una differenza significativa tra i frutti dello stadio S1 ( $45,14 \pm 13,16 \text{ mm}^2$ ) e quelli degli stadi S3 e S4 (rispettivamente  $94,01 \pm 20,74 \text{ mm}^2$  e  $105,04 \pm 21,46 \text{ mm}^2$ ) e tra i frutti dello stadio S2 ( $56,35 \pm 5,81 \text{ mm}^2$ ) e quelli degli stadi S3 e S4. Il coefficiente  $R^2 (=0,9438)$  indica che il parametro misurato cresce linearmente quindi, la grandezza del frutto tende ad aumentare in maniera lineare durante la maturazione del frutto. Anche per quanto riguarda la larghezza del frutto, è stata registrata una differenza significativa tra i frutti dello stadio S1 ( $5,35 \pm 1,23 \text{ mm}^2$ ) con quelli degli stadi S3 e S4 (rispettivamente  $7,85 \pm 0,53 \text{ mm}^2$  e  $9,76 \pm 1,35 \text{ mm}^2$ ), quelli di S2 ( $6,66 \pm 0,71 \text{ mm}^2$ ) con S3 e S4; anche la lunghezza dei frutti ha presentato una differenza significativa dello stadio S1 ( $11,45 \pm 2,05 \text{ mm}^2$ ) con S3 e S4 (rispettivamente  $15,45 \pm 2,56 \text{ mm}^2$  e  $14,36 \pm 1,67 \text{ mm}^2$ ) e dello stadio S2 con S3 e S4 ( $11,15 \pm 0,73 \text{ mm}^2$ ) ( $p\text{-value} = 0,00$ ).

Come mostrato nella Figura 11, l'area e il peso dei frutti crescono in maniera regolare durante la maturazione. Per entrambi i parametri misurati le linee di tendenza hanno mostrato un coefficiente  $R^2$ , che spiega rispettivamente il 91% e il 94% della variabilità dei parametri misurati: con il procedere dello sviluppo del frutto, esso aumenta in dimensione e in peso.



**Figura 11.** Valori medi ( $\pm ds$ ) delle aree (in verde) e dei pesi (in rosso) dei frutti nei 4 stadi di maturazione, espressi rispettivamente in  $\text{mm}^2$  e g. Le medie sono calcolate su pool di almeno 25 frutti per gruppo.

Per capire se alcuni parametri fossero influenzati da fattori ambientali e stagionali o fossero caratteri determinati geneticamente, è stata condotta una semplice indagine su un numero limitato di piante, scelte casualmente tra quelle oggetto di studio (P1, P2 e P3), per due stagioni consecutive (2019 e 2020). Sono stati campionati 100 frutti nel 2019 e 33 frutti nel 2020 (sempre allo stadio S4, vedi Figura 9 e Tabella 12) per ogni pianta, per un totale di 399 frutti per pianta. Essi sono stati pesati singolarmente, fotografati e quindi sono stati contati i semi di ciascun frutto e misurato l'SSC con rifrattometro portatile. Nella Tabella 13 sono mostrati i risultati di tali osservazioni. L'F-statistics è stata utilizzata per identificare il peso di ogni variabile. La statistica post-hoc ha identificato differenze significative tra le piante attraverso comparazione a coppie.

In generale, il numero dei semi è risultato essere molto variabile (da 3 a 69) e sono state riscontrate delle differenze significative anche da pianta a pianta per tutte le tre osservazioni. Il numero però è risultato essere molto stabile tra frutti della stessa pianta nel corso della stessa stagione. Confrontando invece il numero di semi dei frutti sia totali sia delle singole piante, si è osservata una differenza statisticamente significativa tra l'anno 2019 e 2020. Da ciò è stato supposto che tale carattere dipendesse più strettamente da fattori esterni, quali parametri ambientali e impollinazione.

Allo stesso modo, anche il contenuto zuccherino e il peso si sono dimostrati parametri che hanno subito delle variazioni significative nel corso delle due stagioni di osservazione, facendo supporre che fossero legati anch'essi maggiormente a fattori esterni.

**Tabella 13.** Valori medi ( $\pm$ es) dei caratteri: numero di semi, circularity, zuccheri disciolti in °Brix e peso in piante analizzate durante gli anni 2019 e 2020. I valori contrassegnati da lettere diverse differiscono statisticamente tra loro.

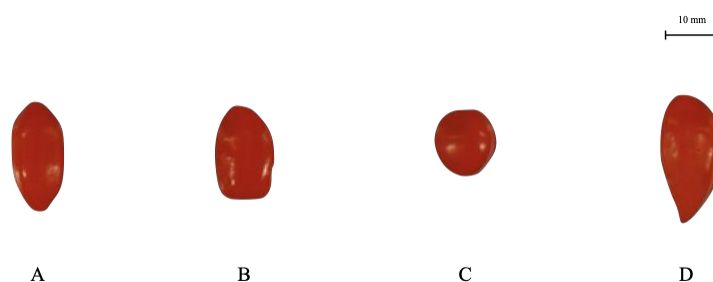
	<b>Semi (n)</b>	<b>Circularity</b>	<b>SSC (°Brix)</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>P1</b>	41,40 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	15,12 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,01
<b>P2</b>	38,78 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	0,78 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	21,07 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,01
<b>P3</b>	29,75 $\pm$ 0,78 <sup>b</sup>	0,75 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	19,90 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,01
<b>F<sub>P</sub></b>	<b>0,000**</b>	<b>0,001**</b>	<b>0,000**</b>	0,881
<b>2019</b>	38,07 $\pm$ 0,43	0,77 $\pm$ 0,00	20,014 $\pm$ 0,16	0,62 $\pm$ 0,01
<b>2020</b>	35,22 $\pm$ 0,74	0,75 $\pm$ 0,01	17,381 $\pm$ 0,28	0,44 $\pm$ 0,01
<b>F<sub>A</sub></b>	<b>0,001**</b>	<b>0,023*</b>	<b>0,000**</b>	<b>0,000**</b>
<b>F<sub>PxA</sub></b>	<b>0,000**</b>	0,453	<b>0,000**</b>	<b>0,002*</b>

\*  $p$ -value  $\leq$  0,05; \*\*  $p$ -value  $\leq$  0,01

Solo il parametro circularity, che ci dà un'indicazione sulla forma del frutto, si è dimostrato costante nelle due stagioni di osservazione: infatti l'analisi ANOVA a due vie effettuata secondo le variabili "pianta" e "anno" congiuntamente, ha dimostrato che non ci fossero differenze significative, e che quindi i frutti della stessa pianta mantenessero la loro forma costante da una stagione di fruttificazione all'altra.

Sulla base di quest'ultimo risultato, si è proceduto all'analisi delle forme dei frutti, individuando diverse tipologie di forma, e grazie a queste è stato possibile raggruppare le piante con frutti della stessa forma ed effettuare quindi dei campionamenti di frutti per eseguire delle analisi chimiche utili alla caratterizzazione nutraceutica.

Sulla base delle osservazioni in campo, sono state riscontrate 4 forme principali di frutto (Figura 12): ovale (A), con fondo piatto (B), rotondo (C) e a peperoncino (D). Come mostrato nella Tabella 14, la forma preponderante è risultata essere quella ovale (35,1%), mentre quella più rara è stata quella a peperoncino (3,1%). È stato inoltre riscontrato che in molti casi (30,9% delle piante osservate) la forma del frutto non era valutabile poiché o non era riconducibile ad una sola categoria o la pianta non aveva frutti o i frutti presenti erano alterati. In quest'ultimo caso, le alterazioni erano riconducibili sia all'attacco di parassiti (ad es. formiche) sia al disseccamento prematuro.



**Figura 12.** Forme dei frutti riscontrate nelle di *L. barbarum* L. appartenenti alla popolazione oggetto di studio (A= ovale; B= apice piatto; C= rotondo; D= peperoncino).

**Tabella 14.** Frequenza delle forme dei frutti osservate nelle piante campionate.

Forma del frutto	%
Ovale	35,1
Apice piatto	10,3
Rotondo	19,6
Peperoncino	3,1
Non valutabile	30,9

Nella Tabella 15 sono mostrati i valori medi e le relative deviazioni standard dei principali caratteri dei frutti e delle foglie misurati nei vari morfotipi individuati sulla base della forma del frutto.

**Tabella 15.** Valori medi ( $\pm$ ds) dei principali caratteri dei frutti e delle foglie misurati nei quattro morfotipi individuati sulla base della forma del frutto (vedi Figura 11): area, larghezza, lunghezza e circularity.

		A	B	C	D
<b>Frutto</b>	Area	84,34 $\pm$ 20,45	99,88 $\pm$ 20,16	77,97 $\pm$ 20,44	81,24 $\pm$ 15,80
	Lunghezza	12,90 $\pm$ 1,35	13,21 $\pm$ 1,07	10,22 $\pm$ 0,55	12,58 $\pm$ 1,17
	Larghezza	8,39 $\pm$ 0,88	9,44 $\pm$ 0,46	7,75 $\pm$ 0,45	8,48 $\pm$ 0,97
	Circularity	0,77 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,07	0,77 $\pm$ 0,05
<b>Foglia</b>	Area	117,15 $\pm$ 22,76	116,05 $\pm$ 22,64	239,11 $\pm$ 80,07	351,54 $\pm$ 39,62
	Lunghezza	31,21 $\pm$ 3,40	25,10 $\pm$ 2,08	37,18 $\pm$ 5,41	40,08 $\pm$ 3,45
	Larghezza	7,03 $\pm$ 0,90	7,97 $\pm$ 1,14	10,22 $\pm$ 1,94	13,11 $\pm$ 1,33
	Circularity	0,29 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,03

Per quanto riguarda la forma delle foglie, basandosi sulla classificazione mostrata in Tabella 9, quelle dei morfotipi A ( $0,29 \pm 0,03$ ) e C ( $0,39 \pm 0,03$ ) sono risultate essere lanceolate, mentre quelle dei morfotipi B ( $0,44 \pm 0,06$ ) e D ( $0,46 \pm 0,03$ ) ovato-lanceolate. Inoltre, dalla valutazione dell'area fogliare, le foglie di D sono quelle più grandi ( $351,54 \pm 39,62 \text{ mm}^2$ ), mentre quelle di B quelle più piccole ( $116,05 \pm 22,64 \text{ mm}^2$ ).

Anche per la forma del frutto, lo shape descriptor si è rivelato importante, sebbene subordinato all'analisi visiva: infatti i frutti dei morfotipi A (ovale,  $0,77 \pm 0,06$ ) e D (a peperoncino,  $0,77 \pm 0,05$ ) mostrano un valore pressoché identico poiché entrambi con forma allungata, mentre i frutti dei morfotipi B (fondo piatto,  $0,82 \pm 0,09$ ) e C (rotondo,  $0,88 \pm 0,07$ ) presentano un valore più vicino a 1 e quindi più rotondeggiante.

## 4.2. Analisi molecolare

Per poter ottenere informazioni riguardanti l'origine delle piante analizzate e capire se i quattro morfotipi individuati potessero essere riconducibili ad altrettante varietà (o cultivar), è stata condotta un'analisi molecolare avvalendosi dell'uso di marcatori molecolari microsatelliti (SSR). Tale analisi è stata condotta su un numero rappresentativo di piante provenienti dalla piantagione oggetto di studio (Campo, n=81), insieme ad alcune accessioni di *L. barbarum* (LB, n=4) e *L. chinense* (LC, n=3) provenienti da orti botanici europei. Sono stati inizialmente presi in considerazione 16 marcatori SSR e sono stati analizzati gli elettroferogrammi delle amplificazioni PCR. Dopo aver effettuato il *sizing* delle taglie alleliche, sono stati scelti 9 di questi marcatori con il maggior grado di diversità allelica che sono stati quindi utilizzati per la caratterizzazione.

Nella Tabella 16 sono elencati i 9 marcatori utilizzati per la caratterizzazione molecolare delle piante oggetto di studio.

In generale il numero di alleli attesi andava da un minimo di 2 a un massimo di 6, mentre il numero di alleli osservato è stato da 2 a 5. Il numero di alleli osservati nella popolazione Campo andava da un minimo di 1 ad un massimo di 4, mentre la popolazione LB da un minimo di 1 ad un massimo di 3 e la LC da 1 a 2.

**Tabella 16.** Elenco dei marcatori utilizzati per la discriminazione delle varie accessioni

Marker	A <sub>a</sub>	A <sub>o</sub>	A <sub>o</sub> LB	A <sub>o</sub> LC.	A <sub>o</sub> Campo	Taglie alleliche osservate (bp)	Range (bp)
GB-LCM-021	3	4	3	1	4	240, 248, 264, 318	78
GB-LCM-025	3	3	2	2	2	256, 265, 277	21
GB-LCM-075	5	2	1	1	1	187, 230	43
GB-LCM-087	5	4	3	2	3	211, 217, 222, 225	14
GB-LCM-104	3	3	2	2	3	330, 335, 342	12
GB-LCM-119	3	2	2	1	2	277, 281	4
GB-LCM-166	3	3	2	2	4	207, 211, 217	10
GB-LCM-167	6	5	2	2	3	187, 195, 201, 207, 211	24
GB-LCM-199	2	3	1	2	3	292, 302, 314	22

A<sub>a</sub>= numero di alleli atteso;

A<sub>o</sub>= numero di alleli osservato

Il locus GB-LCM-167 è quello che ha mostrato il numero più elevato di alleli (n=5), mentre GB-LCM-075 e GB-LCM-119 sono stati quelli con il numero minore (n=2). Solo GB-LCM-25, GB-LCM-104 e GB-LCM-166 hanno mostrato lo stesso numero di alleli rispetto al numero atteso (n=3) e GB-LCM-199 ha mostrato invece un numero maggiore rispetto a quello atteso (n=3). Il locus GB-LCM075 è risultato essere l'unico sempre omozigote, con picco a 187 bp per la popolazione LB e LC e a 230 bp per Campo.

Il locus GB-LCM-021 si è dimostrato quello con range più ampio (78 bp e 4 alleli), mentre il locus GB-LCM-119 quello con range più ristretto (4 bp e 2 alleli).

Le taglie alleliche osservate in tutti i genotipi analizzati sono riassunte nella Tabella 17.

**Tabella 17.** Taglie alleliche osservate (bp) in tutti i genotipi analizzati, raggruppati sulla base della popolazione di appartenenza (LB= accessioni di *L. barbarum* da orti botanici europei; LC= accessioni di *L. chinense* da orti botanici europei; Campo= accessioni della coltivazione oggetto di studio)

	GB- LCM021	GB- LCM025	GB- LCM075	GB- LCM087	GB- LCM104	GB- LCM119	GB- LCM166	GB- LCM167	GB- LCM199
LB	240/318 248/318	265/265 265/277	187/187	211/211 213/213 217/217	335/341	277/281 281/281	211/211 211/217	201/201 201/207	302/302
LC	248/248	256/256 265/265	187/187	211/211 211/222	335/335 335/341	281/281	211/211 217/217	187/201 201/201	292/302
Campo	240/318 250/318 264/264 318/318	265/265 265/277 277/277	230/230	211/217 217/217 225/225	330/335 335/341	277/277 277/281	207/207 207/211 211/211 207/217 211/217 217/217	195/201 201/201 201/207 201/211	292/302 302/302 302/314

#### 4.2.1. Diversità genetica

Nella Tabella 18 sono mostrati i risultati relativi all'analisi della variabilità genetica e del differenziamento. I tre gruppi esaminati hanno mostrato valori di eterozigosi molto più elevati rispetto a quelli attesi: infatti i valori di  $H_o$  sono risultati per tutte uguali a 1, contro valori di  $H_e$  che variavano da 0,526 a 0,545.

**Tabella 18.** L'eterozigosi prevista ( $H_e$ ) e quella osservata ( $H_o$ ) sono riportate per ciascun locus e ciascuna popolazione, insieme alla media di tutti i loci. Il  $F_{IS}$  è riportato anche per tutti i tre gruppi e come stima complessiva per ciascuna popolazione (ultima riga).

Gruppi	Diversità				
	n	$N_A$	$H_e$	$H_o$	$F_{IS}$
LB	4	2,56	0,545	1	-0,83
LC	3	2,33	0,537	1	-0,86
Campo	81	2,78	0,526	1	-0,90
Totale	88	2,56	0,536	1	

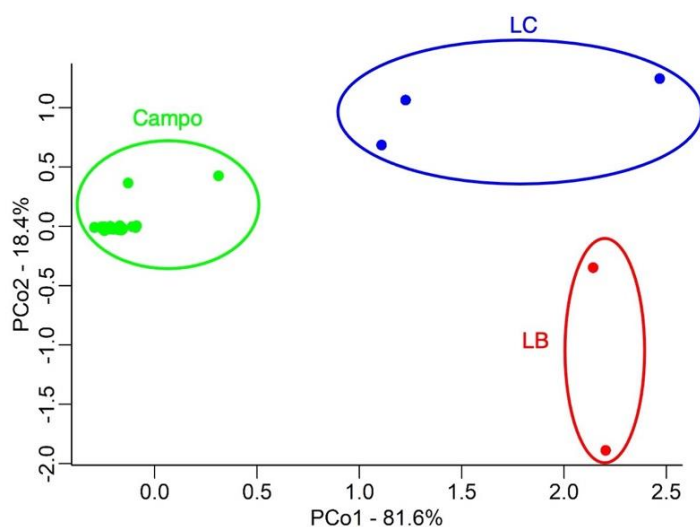
I tre gruppi hanno mostrato un numero medio simile di alleli per locus: la popolazione LB ha ottenuto un numero medio di 2,56, la LC di 2,33 e il Campo di 2,78 e in generale il numero medio di alleli per locus è stato 2,56.

I valori del coefficiente di inbreeding  $F_{IS}$ , che indica la varianza delle frequenze alleliche all'interno della popolazione, hanno mostrato valori da -0,83 (LB) a -0,90 (Campo): il valore negativo evidenzia un eccesso di eterozigosi nelle popolazioni, quindi una variabilità molto elevata.

#### 4.2.2. Differenziazione genetica e distanza

L'indice di fissazione  $F_{ST}$ , che riflette il grado di differenziazione genetica, variava da 0,072 a 0,344, con una media di 0,222 per locus, indicando un livello di moderata diversità genetica. L'analisi di  $F_{ST}$  a coppie ha invece mostrato un coefficiente pari a 0 tra le popolazioni LB e LC, che di conseguenza non sono distinguibili, 0,213 tra LB e Campo e 0,257 tra LC e Campo, suggerendo invece un buon grado di differenziamento tra queste, senza però rilevare valori significativi.

L'analisi delle coordinate principali (PCoA), mostrata nella Figura 13, ha evidenziato che i genotipi della popolazione LB ( $n=4$ ) fanno effettivamente parte di una stessa popolazione (quella della specie *L. barbarum*) e due di loro sono perfettamente identici, tranne un elemento, che ha mostrato caratteristiche più simili alla popolazione Campo. La popolazione Campo (verde), che si supponeva fosse composta esclusivamente da *L. barbarum*, è risultata al suo interno molto omogenea, ma probabilmente risultante da un mix di due genomi.



**Figura 13.** Analisi delle coordinate principali (PCoA) effettuata sui risultati delle tre popolazioni: LB (rosso), LC (blu), Campo (verde). Ogni pianta è rappresentata da un punto in uno spazio bidimensionale rappresentato dai due primi PCo, che spiegano rispettivamente l'81,6 (PCo1) e il 18,4% (PCo2) della variazione totale. La distanza euclidea tra le piante si basa sulle loro differenze genotipiche.



### 4.2.3. Analisi della struttura

A tale proposito, la struttura di popolazione nei tre gruppi identificati (Tabella 19) è stata studiata mediante la procedura Bayesiana. In primo luogo, è stato stimato che il numero più probabile di cluster di origine (K, o pool genetici omogenei) sulla base di  $\Delta K$  (cioè il tasso di cambiamento del secondo ordine della funzione di verosimiglianza rispetto a K) fosse uguale a 3, indicando così che tre pool genetici hanno modellato la struttura genetica delle popolazioni analizzate. Sulla base di ciò, è stata ottenuta la proporzione finale di ciascuno dei tre ipotetici pool genici presenti in ciascuna popolazione.

**Tabella 19.** Analisi Bayesiana della struttura genetica delle popolazioni sulla base dei 3 cluster identificati.

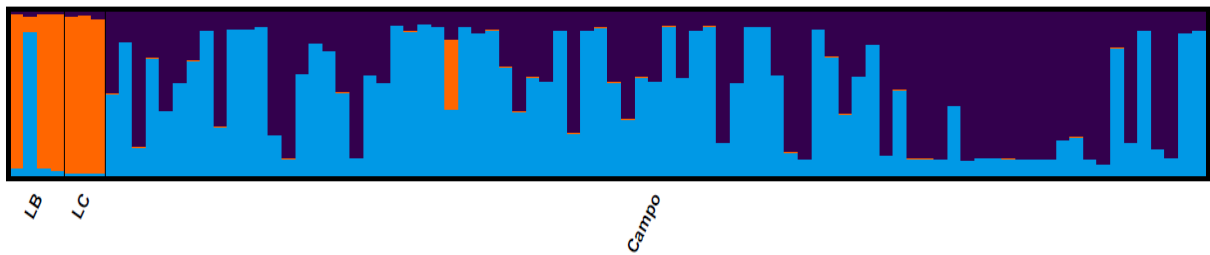
	n.	Cluster dedotti		
		1	2	3
LB	4	0,008	0,254	<b>0,739</b>
LC	3	0,036	0,021	<b>0,943</b>
Campo	81	<b>0,458</b>	<b>0,534</b>	0,008

In linea generale si può affermare che il gruppo LB e il gruppo LC derivano la quasi totalità del loro genoma ad un'unica popolazione ancestrale (K=3, rispettivamente per il 73,9% e 94,3%), mentre il gruppo Campo può essere considerato un mix bilanciato di altri due pool genici diversi (K=1 45,8% e K=2 53,4%).

In particolare, il gruppo LB presenta tracce delle altre due popolazioni, di cui K=2 è quella più presente (25,4%), mentre nel gruppo LC K=1 e K=2 rappresentano rispettivamente lo 3,6% e lo 2,1% del genoma delle piante analizzate, facendo supporre una maggiore vicinanza tra i gruppi LB e Campo (che si crede sia costituito da piante di *L. barbarum*)

Nella Figura 14 è raffigurata il grafico a barre dell'analisi Bayesiana della struttura genetica delle popolazioni sulla base del genoma di ogni singola pianta. Ogni barra rappresenta il genoma di una pianta e i colori diversi rappresentano il cluster di appartenenza (K=1 viola; K=2 celeste; K=3 arancio).

Le piante della popolazione LC appaiono geneticamente uniformi, mentre, come si può vedere dal grafico in figura, la seconda pianta del gruppo LB non ha lo stesso genoma delle altre tre dello stesso gruppo (arancio), bensì è assimilabile a quello del cluster a cui appartiene il gruppo "Campo" (celeste). Infatti, tale pianta presenta circa l'80% di genoma composto dal pool genico predominante del gruppo Campo (celeste).



**Figura 14.** Analisi Bayesiana della struttura genetica delle popolazioni sul genoma delle singole piante. Ogni barra rappresenta il genoma di una pianta. I colori diversi rappresentano il cluster di appartenenza (K=3 arancio; K=1 e 2 celeste).

La popolazione Campo appare anch'essa geneticamente uniforme, ad eccezione dell'albero n.33 del pool genico. Infatti, questa pianta presenta un genoma composto per buona parte dalla componente arancione, cioè quella in cui sono state inserite le piante degli altri due gruppi (LB e LC). Come riassunto nella Tabella 20, la prima pianta è un'accessione di *L. barbarum* proveniente dall'Orto Botanico di Mainz (Germania), contrassegnata con l'ID LBL2, mentre la seconda (ID M8-6) è una pianta appartenente alla coltivazione oggetto di studio (situata presso Magliano in Toscana), di cui però non si conoscono le origini. Da queste informazioni non è possibile stabilire il motivo di tali attribuzioni.

**Tabella 20.** Informazioni ottenute grazie alla lista di descrittori (vedi paragrafo 4.1) relative alle due piante outsider.

	LBL2	M8-6
<b>Provenienza</b>	Orto Botanico di Mainz (Germania)	ignota
<b>Luogo di campionamento</b>	Azienda sperimentale S. Paolina CNR-IBE (Follonica)	Azienda agricola biologica Bragaglia (Magliano in Toscana)
<b>Portamento</b>	Espanso	Espanso
<b>Vigoria</b>	Scarsa	Scarsa
<b>Attitudine pollonifera</b>	Assente	Assente
<b>Tralci nuovi</b>	assurgenti	Non assurgenti
<b>Foglia</b>	Lanceolata, classe 1	Lanceolata, classe 2
<b>Fiore</b>	5 petali	5 petali
<b>Frutto</b>	ovale	Non valutabile

I risultati ottenuti ci forniscono molte informazioni interessanti circa la piantagione oggetto di studio. Prima di tutto possiamo affermare che i marcatori utilizzati, come indicato in molti lavori (Kwon et al., 2009; Xin et al., 2013; W.-G. Zhao et al., 2010) non ci aiutano a discriminare efficacemente le specie affini *Lycium barbarum* e *L. chinense* (possibile attraverso marcatori che utilizzano la regione ITS2 come codice a barre principale, come in Xin et al., 2013), poiché i microsatelliti rappresentano una variabilità neutra (Kalia et al., 2011). Le due specie sono infatti molto simili anche da un punto di vista morfologico, oltre che filogenetico, e vengono spesso utilizzate indiscriminatamente sul mercato erboristico e di prodotti

etnici sulle base delle proprietà benefiche del tutto assimilabili (Yao et al., 2018). La differenza che rende ad esempio distinguibili i frutti freschi è il diverso grado di dolcezza e di gradevolezza: infatti, i frutti di *L. barbarum* sono molto più dolci e gustosi rispetto a quelli di *L. chinense*, che in alcuni casi viene utilizzato come adulterante (Amagase & Farnsworth, 2011).

Quindi, la grande similarità genetica dei gruppi LB ed LC risiede probabilmente nell'appartenenza a una comune popolazione ancestrale asiatica, come dimostrato anche dal lavoro di Fukuda et al. (2001) e in quanto i marcatori utilizzati sono stati sviluppati inizialmente in *L. chinense* e poi amplificati in *L. barbarum* da Kwon et al., con lo scopo di contribuire alla promozione dell'allevamento molecolare e alla comprensione della struttura della popolazione nel genere *Lycium*.

Infatti, il gruppo Campo, di cui non si hanno delle precise informazioni riguardanti l'origine, sembra avere minore diversità con la pianta LBL2 del gruppo LB (formato da accessioni di *L. barbarum* provenienti da orti botanici europei), che presenta circa un 80% di genoma appartenente al cluster comune K=2 (corrispondente al 53% del genoma del Campo). Le piante appartenenti al gruppo Campo possono però essere discendenti da una cultivar o una landrace di *L. barbarum* diversa rispetto alle accessioni analizzate in questo lavoro di tesi e più vicina a quella da cui discende la pianta outsider LBL2, la quale a sua volta si differenzia molto dalle sue ipotetiche conspecifiche del gruppo LB.

Inoltre, i quattro morfotipi individuati sulla base della forma del frutto sono risultati essere identici da un punto di vista genetico. Nella Figura 14 le prime quattro barre del grafico nel gruppo Campo corrispondono, nell'ordine, alle piante modello per le quattro forme identificate in origine: B, A, C, D.

Come si può vedere, i quattro morfotipi hanno un genoma composto in percentuali variabili prevalentemente da K=1 e K=2, e nel caso di B, C e D anche da un'esigua percentuale del genoma proveniente da K=3. Anche andando a confrontare nel dettaglio tutte le piante con caratteristiche simili, non si notano pattern ripetuti. Ciò fa supporre che il set di marcatori utilizzati non sia in grado di discriminare tra i vari morfotipi individuati tramite analisi morfologica.

I risultati di questa analisi possono essere spiegati ad esempio dal lavoro di D. Zhang et al. (2018), svolto su un totale 19 accessioni, comprendenti quattro specie selvatiche (*L. ruthenicum* Murr., *L. barbarum* L., *L. chinense* Mill. var. *potaninii* Pojark., *L. yunnanense* Kuang) un mutante con frutti bianchi selvatico e una serie di specie autoctone, landrace, incroci e mutanti attribuite alla specie *L. barbarum*. Le quattro specie sono risultate essere geneticamente vicine, e le varie *landrace* avevano l'antenato comune in *L. barbarum*, che potrebbe essere la causa della stretta relazione genetica tra di esse. La bassa diversità delle specie autoctone può essere una conseguenza della selezione direzionale artificiale a lungo termine, che elimina le linee (e i geni) non adatti alla produzione agricola e determina una morfologia simile ("evoluzione convergente") tra specie autoctone di diversi progenitori. Da questo studio è stato suggerito che per mettere in atto uno sviluppo a lungo termine del goji cinese, dovrebbe essere

introdotto più materiale proveniente dal germoplasma del goji nei vari programmi di *breeding* al fine di arricchire il pool genetico e prevenire il deterioramento della qualità causato dalla consanguineità.

Anche lo studio di W.-G. Zhao et al. del 2010, in cui è stata valutata la diversità genetica e la struttura della popolazione di 139 accessioni di *L. chinense* utilizzando 18 marcatori SSR ripresi dal sopracitato Kwon, ha dimostrato che le accessioni studiate condividevano almeno il 70% di discendenza all'interno di ciascuno dei tre gruppi dedotti. Oltre ai gruppi identificati da questa analisi, l'8,2% delle accessioni mostrava evidenza di discendenza da una popolazione mista. Questa miscela è stato supposto che fosse il risultato del recente breeding, della storia dell'addomesticamento e dello scambio di risorse, che hanno così avuto grandi effetti sulla struttura della diversità. Poiché la variabilità genetica è presente nei programmi di riproduzione, il flusso genico mediato dall'uomo può esistere all'interno di una popolazione a causa della riproduzione, risultando in una grande quantità di variazione attribuita alle differenze all'interno dei gruppi (84,7%) piuttosto che tra i tre gruppi dedotti. In generale però è stato stabilito che esisteva una moderata differenziazione tra i tre gruppi.

### 4.3. Analisi nutraceutica

Alla luce di queste informazioni circa l'origine e la differenziazione genetica delle piante oggetto di studio, è stata effettuata un'accurata analisi nutraceutica dei frutti.

Negli ultimi anni il goji ha raggiunto molta popolarità in tutto il mondo ed è attualmente considerato come un superfood dalle spiccate proprietà nutraceutiche (Amagase & Farnsworth, 2011). Infatti, la ricerca di colture alternative ad alto valore nutritivo ha accresciuto l'interesse per il goji anche al di fuori del suo normale areale di distribuzione naturale (Benchennouf et al., 2017; Mikulic-Petkovsek et al., 2012; Mocan et al., 2019a). Nonostante ciò, i lavori presenti in letteratura che analizzano materiale proveniente da coltivazioni del territorio italiano sono ancora pochi, sebbene in Italia esistano da almeno un decennio aziende produttrici di questo frutto.

Nel presente lavoro di tesi di dottorato sono state fatte delle analisi mirate a comprendere il profilo nutraceutico di piante di *L. barbarum* coltivate in una azienda biologica maremmana e poter quindi sfruttare il potenziale di tale specie sul territorio italiano.

Le analisi sono state effettuate su dei pool di frutti maturi (vedi stadio S4, Figura 10, sezione 3.1.3) raccolti da gruppi di piante scelte sulla base della forma del frutto. Per ogni morfotipo individuato (vedi Figura 11, sezione 3.1.3) sono state campionate 5 piante. Le metodologie utilizzate sono state: saggi colorimetrici spettrofotometrici per la determinazione dell'attività antiossidante totale (FRAP), dei polifenoli totali (TPC, Total Polyphenols Content) e dei flavonoidi totali (TFC, Total Flavonoids Content); analisi HPLC per polifenoli, carotenoidi, zuccheri e aminoacidi.

I risultati ottenuti sono stati successivamente analizzati in via generale e secondo vari criteri, quali:

- il morfotipo, che in questo caso non rappresenta anche un diverso genotipo, ma può comunque essere un fattore discriminante per quanto riguarda il contenuto di composti bioattivi;
- l'anno di campionamento, che ci puoi aiutare a capire come le piante rispondono ai fattori ambientali e climatici nel corso del loro sviluppo in anni diversi consecutivi;
- il mese di campionamento, che può aiutarci a capire come le piante rispondono nell'immediato ai fattori ambientali, come accumulino i metaboliti primari e secondari, poiché le bacche di goji maturano in maniera scalare e vengono raccolti in un periodo di diverse settimane.

Nel mese di agosto non sono stati mai effettuati campionamenti durante i tre anni di monitoraggio, probabilmente poiché le elevate temperature e il forte disseccamento non permettevano alle piante di portare a termine lo sviluppo e la maturazione dei frutti (vedi tabella 2 in Materiali e Metodi).

Queste elaborazioni sono state utilizzate al fine di valutare quale sia tra questi il parametro più discriminante e infine capire come ottenere frutti al massimo del loro potenziale nutraceutico, sfruttando semplicemente campionamenti differenziati nel tempo.

### 4.3.1. Analisi spettrofotometriche colorimetriche

L'analisi generale dei risultati dei saggi colorimetrici (Tabella 21) ha mostrato valori medi di TPC di  $2,93 \pm 0,55$  mg GAE/g con un range che andava da un minimo di 1,85 a un massimo di 4,40 mg GAE/g, di TFC di  $0,16 \pm 0,05$  mg QE/g con un range da 0,07 a 0,29 mg QE/g e di FRAP di  $0,03 \pm 0,01$  mmol Fe<sup>2+</sup>eq/g, da un minimo di 0,01 a un massimo di 0,09 mmol Fe<sup>2+</sup>eq/g.

**Tabella 21.** Valori medi totali ( $\pm ds$ ), minimi e massimi relativi ai tre saggi colorimetrici spettrofotometrici effettuati su frutti maturi, espressi rispettivamente in mg GAE/g, mg QE/g e mmol Fe<sup>2+</sup>eq/g.

	Media	ds	Min	Max	Range
TPC	2,93	0,55	1,85	4,40	2,55
TFC	0,16	0,05	0,07	0,29	0,22
FRAP	0,03	0,01	0,01	0,09	0,08

Tali valori sono risultati essere in linea con quanto riportato in letteratura, ad esempio nel lavoro di Donno et al. (2015) condotto su frutti coltivati in Piemonte, dove essi raggiungevano i  $268,35 \pm 13,05$  mg GAE/100 g FW per il TPC e  $19,36 \pm 1,46$  mmol Fe<sup>2+</sup>eq/kg per il FRAP. Sono inoltre risultati essere comparabili con quelli riportati per altre specie frutticole comuni, come *Ribes nigrum* ( $434,43 \pm 99,66$  mg GAE/100 g FW e  $76,86 \pm 8,55$  mmol Fe<sup>2+</sup>eq/kg FW), *Actinidia deliciosa* ( $70,23 \pm 17,74$  mg GAE/100 g FW e  $13,39 \pm 1,01$  mmol Fe<sup>2+</sup>eq/kg FW) e *Citrus sinensis* ( $158,70 \pm 1,91$  mg GAE/100 g FW e  $12,43 \pm 0,18$  mmol Fe<sup>2+</sup>eq/kg FW), riconosciute per essere alimenti dalle spiccate proprietà benefiche.

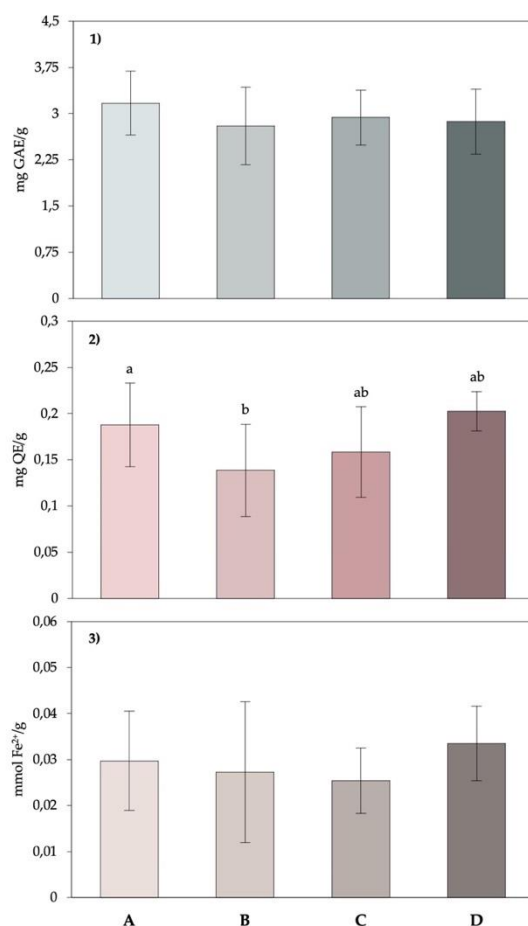
Anche nel lavoro di Mocan et al. (2019), condotto su frutti provenienti da Italia (Lazio) e Romania, sono mostrati valori comparabili con questi (espressi per g di peso secco e quindi circa 3 volte più concentrati), evidenziando comunque una differenza tra quelli italiani, più ricchi di polifenoli totali e flavonoidi totali e quelli rumeni, con valori di 3,31-23,49 mg GAE/g DW e 2,39-11,03 mg QE/g DW, probabilmente a causa del diverso suolo e clima delle due piantagioni.

Lo studio condotto da Lu et al. (2019) su frutti provenienti da diverse zone della Cina ha mostrato anch'esso dei valori di TPC del tutto comparabili con quelli qui presentati, tenendo sempre in considerazione che sono stati ottenuti su frutti essiccati, da un minimo di 5,70 a un massimo di 9,96 mg GAE/g DW.

In un altro studio effettuato da Mikulic-Petkovsek et al. (2012) sono stati confrontati i valori di TPC di varie specie di frutti e bacche prodotte in Europa. I valori ottenuti per il goji ( $1319 \pm 61$  mg GAE/kg) confermano quanto ottenuto in questo lavoro di tesi, e inoltre presentano valori del tutto confrontabili con quelli di altri frutti di rilevanza commerciale analizzati come: *Vaccinium macrocarpon* ( $4522 \pm 368$ ), *Rubus fruticosus* ( $1332 \pm 49$ ), *Rubus idaeus* ( $1076 \pm 105$ ), *Morus nigra* ( $1749 \pm 93$ ), *Fragaria x ananassa* ( $863 \pm 68$ ) e *Ribes rubrum* ( $547 \pm 42$ ).

I risultati di TPC ottenuti con il metodo Folin-Ciocalteu risultano sempre molto confrontabili tra loro, e raramente si osservano delle forti discrepanze nei risultati ottenuti su una stessa matrice in studi diversi, poiché sia il metodo di estrazione dal materiale vegetale sia la procedura è molto ben standardizzata, sempre calibrata con lo standard di acido gallico. Diverso invece è il discorso per metodi per determinare il TFC, che spesso si avvale di diversi metodi di estrazione e protocolli modificati per la quantificazione, anche qualora venga usato il saggio dei Sali di alluminio; e anche per il saggio FRAP si assiste in molti casi all'utilizzo di sostanze con il Trolox (un equivalente idrosolubile della vitamina E) come standard di calibrazione, che ha una risposta diversa rispetto al canonico solfato ferroso.

Per verificare se i morfotipi identificati avessero delle differenze da un punto di vista nutraceutico, è stata effettuata un'analisi statistica dei dati mirata. I risultati delle analisi spettrofotometriche sono mostrati nella Figura 15.



**Figura 15.** Valori medi ( $\pm$ ds) di 1) TP; 2) TF; 3) FRAP. Le medie sono state calcolate per quattro morfotipi (A, B, C, D), espressi rispettivamente in mg GAE/g, mg QE/g e mmol Fe<sup>2+</sup> eq/g. I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p$ -value  $\leq 0,01$ ).

Il contenuto di polifenoli totali non ha presentato differenze statisticamente significative tra i vari gruppi, con concentrazioni simili che andavano da un massimo di  $3,17 \pm 0,52$  mg GAE/g del morfotipo

A (frutto ovale) a un minimo di  $2,80 \pm 0,63$  del morfotipo B (frutto con fondo piatto). Anche per quanto concerne l'analisi FRAP non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i morfotipi, con valori approssimativi di  $0,03 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$ .

Solo l'analisi dei flavonoidi totali ha mostrato delle differenze: in particolare il morf. D (frutto a peperoncino), è quello con i valori maggiori ( $0,20 \pm 0,02 \text{ mg QE/g}$ ), ed è risultato statisticamente diverso da C ( $0,16 \pm 0,05$ ) e da B ( $0,14 \pm 0,05$ ), che è a sua volta risultato statisticamente diverso da A ( $0,19 \pm 0,05$ ).

Nel lavoro di Zhang et al. (2016) le analisi spettrofotometriche effettuate sugli estratti di frutti freschi di otto genotipi provenienti dalla Cina hanno mostrato tra questi delle differenze significative. I valori riportati in generale sono di gran lunga superiori per tutti i saggi rispetto a quelli di questo lavoro di tesi. Per il TPC, i valori medi andavano da  $26,9$  a  $73,4 \text{ mg GAE/g FW}$ . Il saggio per la valutazione dei flavonoidi totali (TFC) ha mostrato invece valori da  $37,2$  a  $54,7 \text{ mg RE/g FW}$ , nonostante sia stata usata la rutina al posto della quercetina come standard di riferimento. Le differenze riscontrate sono sicuramente dovute al diverso genotipo, poiché le piante sono state tutte campionate all'interno del National Goji Germplasm Repository della Ningxia Academy of Agricultural Sciences (Ningxia, Cina).

Per quanto riguarda invece altre specie, Hwang et al. (2019) hanno valutato l'influenza dello stadio di maturazione e della cultivar sulle proprietà fisico-chimiche, sui profili di zuccheri e acidi organici e sulle composizioni antiossidanti delle fragole. È stato visto che il contenuto di polifenoli totali, flavonoidi totali e antiossidanti totali (questi ultimi valutati con metodi diversi da quello utilizzato in questo lavoro di tesi) nelle diverse cultivar differivano con la varietà e anche con lo stadio di maturazione dei frutti al momento della raccolta. Per questa specie è stato addirittura stabilito che i frutti acerbi mostrino un contenuto più elevato di composti bioattivi e quindi manifestino un forte potenziale di utilizzo nella produzione di alimenti funzionali.

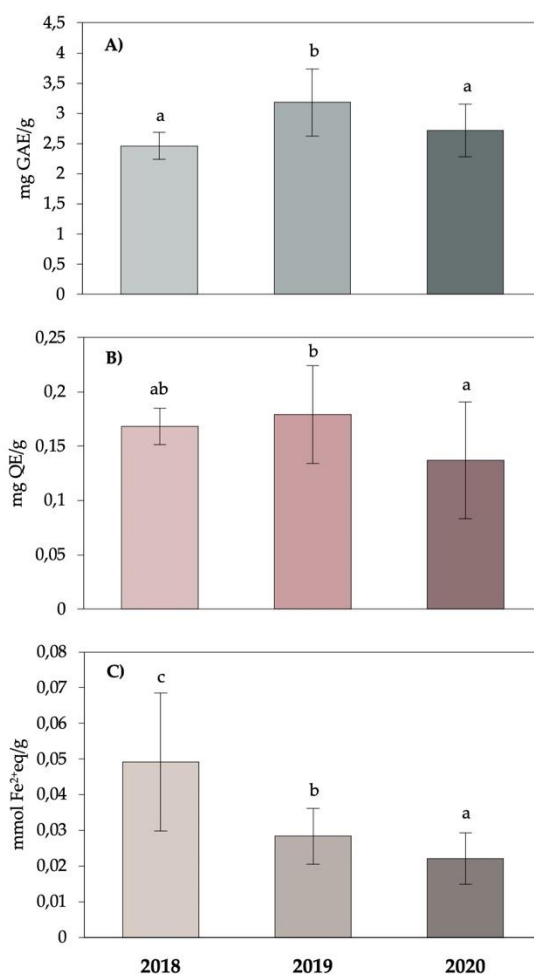
I frutti maturi (S4) di piante appartenenti ai 4 morfotipi (A, B, C e D) sono stati poi analizzati per i tre anni di campionamento (2018, 2019 e 2020) per valutare come le piante in questione rispondessero in anni diversi di fruttificazione.

Nella Figura 16 sono riportati i grafici relativi ai tre saggi colorimetrici (TPC, TFC e FRAP) analizzati secondo l'anno di campionamento.

Nell'anno 2019 sono stati misurati  $3,18 \pm 0,55 \text{ mg GAE/g}$  (TPC), più elevati e statisticamente diversi rispetto ai valori riscontrati negli anni 2018 ( $2,46 \pm 0,22 \text{ mg GAE/g}$ ) e 2020 ( $2,72 \pm 0,43 \text{ mg GAE/g}$ ). Per quanto riguarda i flavonoidi totali (TFC), i valori misurati nell'anno 2019 ( $0,18 \pm 0,05 \text{ mg QE/g}$ ) sono risultati essere più elevati e diversi statisticamente rispetto a quelli del 2020, che però non differiscono da quelli del 2018 ( $0,17 \pm 0,02 \text{ mg QE/g}$ ). I polifenoli totali e il contenuto totale di flavonoidi hanno



mostrato entrambi i valori più alti nel 2019, che è stato l'anno con la stagione di fruttificazione più calda e piovosa



**Figura 16.** Valori medi ( $\pm$ ds) di A) PT; B) FT; C) FRAP, espressi rispettivamente in mg GAE/g, mg QE/g e mmol Fe<sup>2+</sup> eq/g. Le medie sono state calcolate per i tre anni di campionamento (stagioni di fruttificazione 2018, 2019 e 2020). I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p < 0,05$ ).

Infine, i valori di FRAP hanno mostrato delle differenze statisticamente significative tra tutti gli anni di campionamento (2018:  $0,05 \pm 0,02$  mmol Fe<sup>2+</sup> eq/g; 2019:  $0,03 \pm 0,01$  mmol Fe<sup>2+</sup> eq/g; 2020:  $0,02 \pm 0,01$  mmol Fe<sup>2+</sup> eq/g), con tendenza al decremento costante nei tre anni consecutivi. In questo caso l'anno con i valori maggiori (2018) è quello in cui sono stati registrati sia piovosità sia temperatura media più elevati annui, ma non durante la sola stagione di fruttificazione. Uno studio di Alfaro et al. (2013) sul frutto di murtilla (*Ugni molinae* Turcz), hanno mostrato una tendenza all'aumento del contenuto totale di polifenoli e dell'attività antiossidante con l'aumento delle precipitazioni, in accordo con le nostre osservazioni. Molti studi attribuiscono differenze nel livello dei composti fenolici e dell'attività antiossidante in frutta e verdura dello stesso genotipo coltivate in luoghi o anni diversi a variazioni delle condizioni ambientali, come temperatura, disponibilità di acqua (siccità o precipitazioni), intensità della luce, salinità e impollinazione. Diversamente, uno studio di Bolling et al. (2010) sulle mandorle

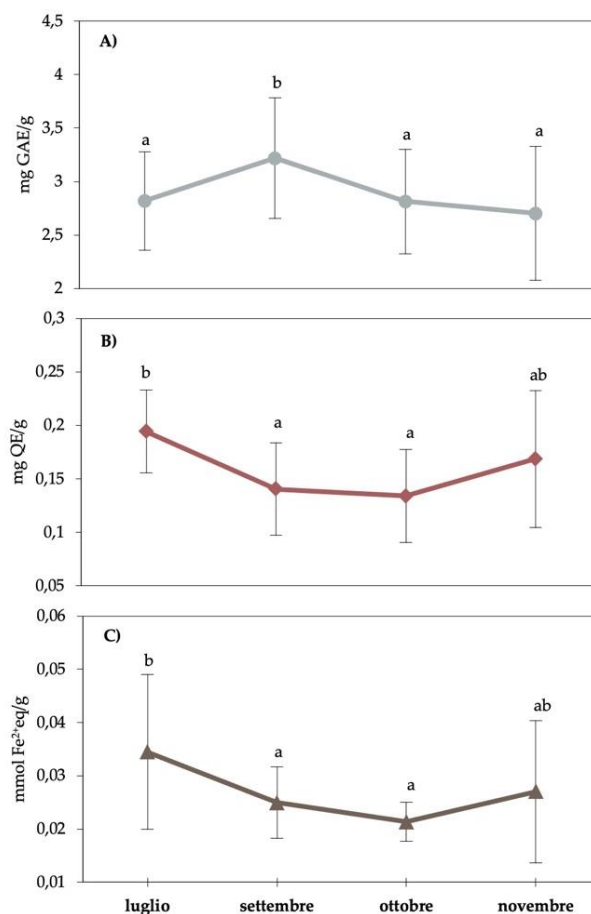
della California ha affermato che il contenuto di flavonoidi e l'attività antiossidante possono dipendere maggiormente dalla cultivar, e quindi da fattori genetici, piuttosto che dalle differenze stagionali.

Anche in uno studio di Auzanneau et al. (2018) è stata effettuata la caratterizzazione dei composti bioattivi e della capacità antiossidante delle bacche di sette cultivar di caprifoglio turchino (*Lonicera caerulea*) in tre anni di raccolta. I valori di TPC misurati ricadevano in un range di 12,6–42,3 mg GAE/g DM, dalle tre alle 10 volte più elevato rispetto a quello del goji. Inoltre, sono state osservate differenze significative nel contenuto di bioattivi tra i diversi anni di raccolta, dovute alle diverse condizioni meteorologiche.

Tuttavia, il meccanismo alla base degli effetti della temperatura e della disponibilità di acqua sul contenuto fenolico e altri metaboliti secondari nelle piante non è completamente compreso. Ad esempio nel lavoro di de Abreu & Mazzafera (2005), gli effetti dello stress idrico e della temperatura sull'erba medicinale *Hypericum brasiliense* includevano l'aumento dei livelli di alcuni composti fenolici (quercetina, rutina, 1,5-diidrossixantone e isouliginosina B), anche se le variazioni del contenuto fenolico sembravano dipendere prevalentemente dal tipo di stress e dal composto analizzato ed erano probabilmente una risposta alla generazione di ROS.

La valutazione delle variazioni stagionali a carico dei composti nutraceutici è stata effettuata nei mesi che vanno da luglio a novembre utilizzando dei pool di frutti prelevati dalle piante contrassegnate. L'analisi dei saggi colorimetrici (Figura 17) ha evidenziato che esistono delle differenze statisticamente significative nelle concentrazioni dei composti: il contenuto di polifenoli totali misurati nel mese di settembre è più elevato ( $3,22 \pm 0,56$  mg GAE/g) rispetto a tutti gli altri mesi (luglio  $2,81 \pm 0,46$ ; ottobre  $2,81 \pm 0,48$  e novembre  $2,70 \pm 0,62$ ), che invece tra loro sono risultati essere molto simili e privi di differenze rilevate con metodi statistici. I flavonoidi totali invece sono risultati più elevati nel mese di luglio ( $0,19 \pm 0,04$  mg QE/g), che differisce dai mesi di settembre e ottobre (rispettivamente  $0,14 \pm 0,04$  e  $0,13 \pm 0,04$ ), ma non dal mese di novembre ( $0,17 \pm 0,06$ ). Il quantitativo di antiossidanti totali ha mostrato un andamento simile a quello dei flavonoidi totali e differenze statisticamente significative per gli stessi mesi: infatti il potere antiossidante misurato per il mese di luglio ( $0,03 \pm 0,01$  mmol Fe<sup>2+</sup> eq/g) si è mostrato più elevato e statisticamente diverso da quello dei mesi di settembre e ottobre (rispettivamente  $0,02 \pm 0,007$  e  $0,02 \pm 0,004$ ), ma non da quello di novembre ( $0,03 \pm 0,01$ ).

Un lavoro di Mocan et al. (2019) condotto su frutti provenienti da Italia (Lazio) e Romania, ha mostrato valori comparabili a questi (espressi per g DW e quindi circa 3 volte più concentrati), evidenziando però una differenza tra quelli italiani, che sono più ricchi di polifenoli totali e flavonoidi totali, e quelli rumeni, con valori di 3,31-23,49 mg GAE/g DW e 2,39-11,03 mg QE/g DW, facendo supporre che diversi fattori ambientali, come suolo e clima, possono influenzare la quantità di metaboliti secondari.



**Figura 17.** Valori medi ( $\pm$ ds) di A) TP; B) TF; C) FRAP, espressi rispettivamente in mg GAE/g, mg QE/g e mmol Fe<sup>2+</sup> eq/g. Le medie sono state calcolate per quattro mesi di campionamento (nelle stagioni di fruttificazione 2018, 2019 e 2020). I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p$ -value $\leq$ 0,01).

Come mostrano i risultati di questo lavoro di tesi, durante la stagione di fruttificazione il potenziale antiossidante è maggiore durante la prima parte della stagione, probabilmente in risposta alle condizioni ambientali. Come riportato in Polat et al. (2020) il periodo di raccolta influiva sul contenuto di attività antiossidante e sul contenuto di polifenoli totali negli estratti dei frutti di goji, sebbene avessero registrato un aumento costante di entrambe le caratteristiche durante la stagione di raccolta, con i tassi più bassi all'inizio e i più alti alla fine del periodo della raccolta. Queste differenze potrebbero essere spiegate con l'ambiente e le condizioni climatiche tra l'Italia centrale e la Turchia, poiché i flavonoidi sono prodotti dalla via fenilpropanoide-acetato principalmente per assorbire i dannosi raggi UV.

### 4.3.2. Analisi del profilo dei composti fenolici

La Tabella 22 riporta i risultati relativi alle analisi HPLC-DAD effettuate sui campioni di frutti maturi per l'individuazione di singoli composti fenolici.

I composti fenolici ritrovati in questo lavoro di tesi sono stati: la rutina, con valore medio di  $45,35 \pm 30,44$   $\mu\text{g/g}$  e massimo registrato di  $128,69$   $\mu\text{g/g}$ , che si è dimostrato il flavonoide più concentrato; la quercetina (media  $25,56 \pm 22,82$   $\mu\text{g/g}$ ), che ha raggiunto un picco massimo di  $96,95$   $\mu\text{g/g}$ ; e il kaempferolo, con un range di  $1,15$ - $13,15$   $\mu\text{g/g}$  (media  $7,62 \pm 5,13$   $\mu\text{g/g}$ ); tra gli acidi fenolici, sono stati ritrovati solo l'acido clorogenico (media  $85,69 \pm 118,94$   $\mu\text{g/g}$  e massimo  $298,12$   $\mu\text{g/g}$ ), che è stato anche il fenolo con le concentrazioni maggiori misurate, e l'acido caffeico ( $18,49 \pm 14,08$   $\mu\text{g/g}$ ).

**Tabella 22.** Valori medi totali ( $\pm$ ds), minimi e massimi relativi ai due carotenoidi rilevati (zeaxantina e  $\beta$ -carotene) e a flavonoidi e acidi fenolici (espressi in  $\mu\text{g/g}$ ).

	Media	ds	Min	Max	Range
<b>Flavonoidi</b>					
rutina	45,35	30,44	9,35	128,69	119,34
quercetina	25,56	22,82	3,59	96,95	93,36
kaempferolo	7,62	5,13	1,15	13,15	12,00
<b>Acidi fenolici</b>					
acido clorogenico	85,69	118,94	23,75	298,12	274,37
acido caffeico	18,49	14,08	0,56	48,04	47,48

Nel lavoro di Lu et al. (2019) già citato, ne sono stati identificati solo due dei fenoli qui ritrovati: la rutina, il cui contenuto variava da  $0,1812$  a  $0,4391$   $\text{mg/g DW}$  (cioè valori dieci volte più grandi rispetto al presente studio, ma con misurazioni fatte su materiale essiccato) e l'acido ferulico (non riscontrato in questo lavoro di tesi), con concentrazioni che andavano da  $0,0994$  a  $0,1726$   $\text{mg/g DW}$ .

Nello studio comparativo di Okatan (2020) sono state analizzate le proprietà antiossidanti e il profilo fenolico di alcune specie di bacche coltivate di importanza commerciale. Nel ribes rosso (*Ribes rubrum* L.) e nel ribes nero (*Ribes nigrum* L.), ad esempio, sono stati ritrovati rispettivamente valori di rutina di  $13,46$  e  $15,59$   $\text{mg}/100$   $\text{g FW}$ , di quercetina di  $2,17$  e  $2,47$ , e di acido clorogenico di  $2,24$  e  $56,77$ , tutti comparabili con quelli del presente lavoro, a conferma del fatto che il goji, come altri noti frutti normalmente consumati in tutto il mondo, siano ricchi di proprietà antiossidanti e possono quindi essere un'importante materia prima vegetale sia per l'industria farmaceutica che per quella alimentare.

Nella Tabella 23 sono invece mostrati i valori medi delle concentrazioni dei polifenoli misurate nei quattro morfotipi. Come si può notare, rutina, quercetina e acido caffeico sono i composti sempre

ritrovati, mentre kaempferolo e acido clorogenico sono presenti solo nei morfotipi B e C. I valori maggiori di rutina sono stati ritrovati nel morfotipo D ( $33,95 \pm 55,27 \mu\text{g/g}$ ), mentre i valori minori sono stati quelli del morfotipo B ( $9,21 \pm 20,02 \mu\text{g/g}$ ). La quercetina invece ha registrato i suoi valori massimi sempre in D ( $39,57 \pm 33,83 \mu\text{g/g}$ ) e i minimi in A ( $0,36 \pm 1,14 \mu\text{g/g}$ ), tra i quali è stata osservata una differenza statisticamente significativa. Le concentrazioni di kaempferolo, dove riscontrate, hanno valori molto bassi (B=  $1,22 \pm 3,39 \mu\text{g/g}$ ; C=  $1,64 \pm 4,01 \mu\text{g/g}$ ). Per quanto riguarda gli acidi fenolici, il clorogenico è stato ritrovato nel cluster B e nel C (rispettivamente  $20,80 \pm 74,46 \mu\text{g/g}$  e  $5,98 \pm 13,31 \mu\text{g/g}$ ) mentre il caffeico è stato misurato in tutti i cluster, con differenza statisticamente significativa tra l'A ( $1,20 \pm 2,80 \mu\text{g/g}$ ) e il D ( $20,34 \pm 23,27 \mu\text{g/g}$ ).

**Tabella 23.** Valori medi ( $\pm$ ds) di rutina, quercetina, kaempferolo, acido clorogenico e acido caffeico, espressi in  $\mu\text{g/g}$ . Le medie sono state calcolate per quattro morfotipi (A, B, C, D). I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p\text{-value} \leq 0,01$ ).

	A	B	C	D
<b>Rutina</b>	15,06 $\pm$ 19,02	9,21 $\pm$ 20,02	13,99 $\pm$ 23,93	33,95 $\pm$ 55,27
<b>Quercetina</b>	0,36 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	19,32 $\pm$ 24,64 <sup>ab</sup>	15,15 $\pm$ 11,56 <sup>ab</sup>	39,57 $\pm$ 33,83 <sup>b</sup>
<b>Kaempferolo</b>	0,00	1,22 $\pm$ 3,39	1,64 $\pm$ 4,01	0,000
<b>Acido clorogenico</b>	0,00	20,80 $\pm$ 74,46	5,98 $\pm$ 13,31	0,000
<b>Acido caffeico</b>	1,20 $\pm$ 2,79 <sup>a</sup>	9,25 $\pm$ 10,92 <sup>ab</sup>	7,80 $\pm$ 12,33 <sup>ab</sup>	20,34 $\pm$ 23,27 <sup>b</sup>
<b>Flavonoidi tot</b>	15,42 $\pm$ 19,22 <sup>a</sup>	29,75 $\pm$ 27,31 <sup>a</sup>	30,78 $\pm$ 24,37 <sup>a</sup>	73,52 $\pm$ 52,35 <sup>b</sup>
<b>Acidi fenolici tot</b>	1,20 $\pm$ 2,78	30,05 $\pm$ 75,63	13,78 $\pm$ 20,54	20,34 $\pm$ 23,27
<b>TOT</b>	16,62 $\pm$ 21,40	59,80 $\pm$ 88,66	44,56 $\pm$ 31,61	93,86 $\pm$ 65,76

I morfotipi B e C presentavano tutti i composti esaminati, per un totale rispettivamente di 59,80 e 44,56  $\mu\text{g/g}$ . Il morfotipo A è risultato essere quello in generale meno ricco di polifenoli, per un totale di 16,618  $\mu\text{g/g}$ . Infine, il morfotipo D si è mostrato il più ricco di polifenoli, per un totale di 93,86  $\mu\text{g/g}$ .

Infine, l'analisi effettuata sul totale dei flavonoidi (rutina, quercetina e kaempferolo) ha mostrato delle differenze significative: D è risultato essere il gruppo con il contenuto maggiore rispetto a tutti gli altri, che invece non differiscono tra loro.

Lo studio di Zhang et al. (2016) effettuato sugli otto genotipi di *L. barbarum* nativi della Cina, ha evidenziato la presenza di un totale di 11 composti fenolici, tra cui sei flavonoidi (quercetina, miricetina, kaempferolo, rutina, quercetin-ramno-di-esoside and quercetin-3-O-rutinoside) e cinque acidi fenolici (acido caffeico, acido p-cumarico, acido ferulico, acido vanillico e acido clorogenico). Tra questi composti sono state ritrovate sempre delle differenze significative tra i vari genotipi. Tra i composti comuni, la rutina presentava un range di valori medi molto simili (43,5-76,1  $\mu\text{g/g}$  FW), mentre più elevati erano i valori di quercetina e kaempferolo (rispettivamente 89,6-369,8  $\mu\text{g/g}$  FW 15,3-93,6  $\mu\text{g/g}$

FW); per quanto invece riguarda gli acidi fenolici, l'acido clorogenico è risultato essere anche per loro il più rappresentato, ma con valori molto superiori (112,5-525,5 µg/g FW), mentre per l'acido caffeico i valori sono più comparabili, ma comunque più elevati (56,8-155,3 µg/g FW).

Come si può notare i lavori che analizzano frutti provenienti Dalla Cina, cioè la reale di origine della specie, hanno solitamente valori molto maggiori rispetto a quelli che possiamo ritrovare nella letteratura europea. Questo probabilmente può essere spiegato non solo nella diversità del metodo di estrazione e di analisi utilizzato, ma anche nelle diverse caratteristiche pedoclimatiche di coltivazione che possono influire in maniera significativa sulla concentrazione di composti benefici.

Nella Tabella 24 sono esposti i risultati relativi alle concentrazioni dei vari polifenoli riscontrati nei tre anni di campionamento.

**Tabella 24.** Valori medi ( $\pm$ ds) di rutina, quercetina, kaempferolo, acido clorogenico e acido caffeico calcolati per i tre anni di campionamento (stagioni di fruttificazione 2018, 2019 e 2020). I risultati sono espressi in µg/g. I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p$ -value $\leq 0,01$ ).

	2018	2019	2020
<b>Rutina</b>	nd	23,64 $\pm$ 33,02 <sup>b</sup>	3,18 $\pm$ 8,93 <sup>a</sup>
<b>Quercetina</b>	nd	18,19 $\pm$ 24,29	14,16 $\pm$ 18,75
<b>Kaempferolo</b>	nd	0,00 <sup>a</sup>	2,29 $\pm$ 4,45 <sup>b</sup>
<b>Acido clorogenico</b>	nd	13,22 $\pm$ 56,65	2,92 $\pm$ 9,16
<b>Acido caffeico</b>	nd	10,9 $\pm$ 15,16	5,07 $\pm$ 9,28
<b>Flavonoidi tot</b>	nd	41,82 $\pm$ 36,10 <sup>b</sup>	19,63 $\pm$ 22,21 <sup>a</sup>
<b>Acidi fenolici tot</b>	nd	24,12 $\pm$ 59,25	8,00 $\pm$ 11,78
<b>TOT</b>	nd	65,95 $\pm$ 74,49 <sup>b</sup>	27,63 $\pm$ 29,39 <sup>a</sup>

Nell'anno 2018 non sono state misurate concentrazioni rilevabili di nessuno dei composti, mentre nell'anno 2019 sono stati ritrovati rutina (23,639 $\pm$ 33,020 µg/g), quercetina (18,186 $\pm$ 24,289 µg/g), acido clorogenico (13,216 $\pm$ 56,650 µg/g) e acido caffeico (10,905 $\pm$ 15,163 µg/g). Nell'anno 2020 sono stati ritrovati rutina (3,184 $\pm$ 8,927 µg/g), quercetina (14,164 $\pm$ 18,751 µg/g), kaempferolo (2,288 $\pm$ 4,446 µg/g), acido clorogenico (2,921 $\pm$ 9,164 µg/g) e acido caffeico (5,074 $\pm$ 9,276 µg/g). Tra questi, solo rutina e kaempferolo hanno dimostrato di avere una differenza statisticamente significativa tra l'anno 2019 e l'anno 2020.

Anche per quanto riguarda i flavonoidi totali è stata riscontrata una differenza significativa tra l'anno 2019 e l'anno 2020 così come per il contenuto totale di composti fenolici.

Anche per tutti questi composti, l'anno 2019 è stato quello che ha fatto registrare i valori medi più elevati sia dei singoli composti sia del computo totale di questi in accordo anche con i risultati dell'analisi

spettrofotometrica di TPC. Questo probabilmente a conferma del fatto che questa classe di metaboliti secondari è fortemente influenzata dalle condizioni climatiche annuali.

Nella mela e nella pera sono state osservate variazioni di anno in anno in alcuni composti fenolici. Ad esempio, van der Sluis et al. (2001) hanno esaminato quattro cultivar di mele (Jonagold, Golden Delicious, Cox's Orange ed Elstar), confrontando le concentrazioni di flavonolo, catechine, floridzina e acido clorogenico e l'attività antiossidante. Per studiare le differenze stagionali, sono state analizzate mele di tre diversi anni di raccolta, ma in tre cultivar non è stato osservato alcun effetto sulla concentrazione di flavonoidi e sull'attività antiossidante. Connor et al. (2002) hanno riportato che il contenuto fenolico di diverse cultivar di mirtili ibridi *highbush* e interspecifici coltivate in tre località variava considerevolmente in due stagioni di crescita. I coefficienti di correlazione determinati da Sun et al. (2011) hanno mostrato che l'altitudine e le precipitazioni annuali avevano un effetto significativo sul frutto della giuggiola (*Ziziphus jujuba* Mill.). Diversamente, Bolling et al. (2010) hanno scoperto che per le mandorle della California era la cultivar (e quindi un fattore genetico) ad avere maggiore importanza sulla sintesi individuale dei polifenoli.

I cambiamenti nella stagione di fruttificazione dei singoli composti fenolici possono essere ricondotti al tentativo delle piante di reagire a vari stress ambientali (come stress idrico e idrico) che possono influenzarle durante i mesi estivi alle nostre latitudini.

A questo proposito, i risultati dell'analisi dei composti fenolici nel corso della stagione di fruttificazione sono mostrati nella Tabella 25: da un punto di vista statistico non sono state rilevate delle differenze significative tra i vari mesi; i composti hanno mostrato delle concentrazioni pressoché stabili, sebbene rutina, kaempferolo e acido clorogenico non siano stati rilevati rispettivamente nei mesi di luglio, novembre e settembre.

Nel mese di luglio, il flavonolo kaempferolo è stato il composto ritrovato in concentrazioni minori ( $1,39 \pm 3,61$   $\mu\text{g/g}$ ), mentre la quercetina quello con concentrazioni maggiori ( $23,35 \pm 24,30$   $\mu\text{g/g}$ ). Nel mese di settembre la concentrazione maggiore è stata quella della rutina con  $21,07 \pm 37,87$   $\mu\text{g/g}$  e ad ottobre il composto più presente è stato l'acido clorogenico ( $21,29 \pm 79,68$   $\mu\text{g/g}$ ). Nel mese di novembre l'acido caffeico ( $13,77 \pm 15,52$   $\mu\text{g/g}$ ) e la quercetina ( $13,07 \pm 20,26$   $\mu\text{g/g}$ ) sono stati i composti con i livelli più elevati, mentre rutina e kaempferolo non sono stati rilevati e l'acido clorogenico è stato rilevato in concentrazione di  $4,95 \pm 12,13$   $\mu\text{g/g}$ .

In generale il mese di luglio è stato quello che ha fatto registrare le concentrazioni totali più elevate di polifenoli mentre il mese di novembre quello con le concentrazioni totali inferiori. I flavonoidi totali (dati da dalla somma di rutina, quercetina e kaempferolo) sono stati anch'essi più elevati nel mese di luglio e inferiori nel mese di novembre, mentre il contenuto totale di acidi fenolici dato dalla somma di

acido clorogenico e acido caffeico sono risultati essere più elevati nel mese di ottobre e inferiori nel mese di settembre. Non sono state riscontrate delle differenze significative.

**Tabella 25.** Valori medi ( $\pm$  ds) dei vari composti fenolici rilevati nei mesi di fruttificazione (luglio, settembre, ottobre e novembre). I valori sono espressi in  $\mu\text{g/g}$ .

	Luglio	Settembre	Ottobre	Novembre
<b>Rutina</b>	15,54 $\pm$ 24,20	21,07 $\pm$ 37,87	15,22 $\pm$ 24,35	0
<b>Quercetina</b>	23,35 $\pm$ 24,30	12,22 $\pm$ 11,65	15,43 $\pm$ 28,15	13,07 $\pm$ 20,26
<b>Kaempferolo</b>	1,39 $\pm$ 3,61	0,85 $\pm$ 2,76	1,02 $\pm$ 3,50	0
<b>Acido clorogenico</b>	7,19 $\pm$ 14,74	0	21,29 $\pm$ 79,68	4,95 $\pm$ 12,13
<b>Acido caffeico</b>	12,44 $\pm$ 17,55	7,05 $\pm$ 11,26	3,67 $\pm$ 7,03	13,77 $\pm$ 15,52
<b>Flavonoidi tot</b>	40,29 $\pm$ 28,65	34,14 $\pm$ 38,63	31,67 $\pm$ 34,01	13,07 $\pm$ 20,26
<b>Acidi fenolici tot</b>	19,63 $\pm$ 23,55	7,05 $\pm$ 11,26	24,96 $\pm$ 82,27	18,72 $\pm$ 14,98
<b>TOT</b>	59,92 $\pm$ 44,44	41,19 $\pm$ 45,72	56,63 $\pm$ 96,30	31,79 $\pm$ 31,19

Nelle piante soggette a stress abiotico, la produzione e l'accumulo di composti fenolici rappresenta un meccanismo difensivo. I fenolici vegetali svolgono un ruolo importante in diversi processi fisiologici per migliorare la tolleranza e l'adattabilità in condizioni non ottimali, come la trasduzione del segnale, la divisione cellulare, la regolazione ormonale, la regolazione dell'attività fotosintetica, la germinazione e il tasso di riproduzione (Sharma et al., 2019). Ad esempio, una lunga giornata di sole può aumentare il livello di metaboliti secondari in piante come il *Vaccinium myrtillus*, testato in un esperimento a fotoperiodo controllato, in cui i livelli di acido clorogenico risultavano significativamente aumentati dopo 24 ore di esposizione alla luce (Uleberg et al., 2012). Anche per il contenuto di kaempferolo e quercetina nelle piante di pomodoro con maggiore tolleranza alla siccità è stato rilevato un aumento nel lavoro di Sánchez-Rodríguez et al. (2011). Nella carota, fenoli come l'acido cumarico, l'acido caffeico e gli antociani sono stati valutati Commisso et al. (2016) ed è risultato che per prevenire il danno ossidativo indotto dal calore aumentassero il loro accumulo.

Nel nostro caso però i risultati ci fanno supporre che questa classe di metaboliti secondari vengano accumulati lentamente all'interno delle piante, poiché non subiscono delle significative fluttuazioni all'interno di una stessa stagione di fruttificazione (che si svolge nell'arco di circa quattro mesi).



### 4.3.3. Analisi del profilo dei carotenoidi

La presenza dei carotenoidi è stata valutata tramite HPLC-DAD e i risultati generali sono riassunti nella Tabella 26. Tra i vari carotenoidi, il metodo utilizzato ha permesso di rilevare i picchi solo di zeaxantina e  $\beta$ -carotene. La zeaxantina è stata ritrovata in concentrazioni medie di  $308,97 \pm 70,49$   $\mu\text{g/g}$  con un range che andava da valori minimi di 183,75 e massimi di 595,47, mentre il  $\beta$ -carotene ha concentrazioni medi di  $7,00 \pm 4,65$   $\mu\text{g/g}$ , con valori che vanno da 3,59 a 33,66.

**Tabella 26.** Valori medi totali ( $\pm$ ds), minimi e massimi, espressi in  $\mu\text{g/g}$ , relativi ai due carotenoidi rilevati (zeaxantina e  $\beta$ -carotene) principali ritrovati negli estratti di frutti campionati nel corso dei tre anni di monitoraggio.

	Media	ds	Min	Max	Range
<b>Zeaxantina</b>	308,97	70,49	183,75	595,47	411,72
<b><math>\beta</math>-carotene</b>	7,00	4,65	3,59	33,66	30,07

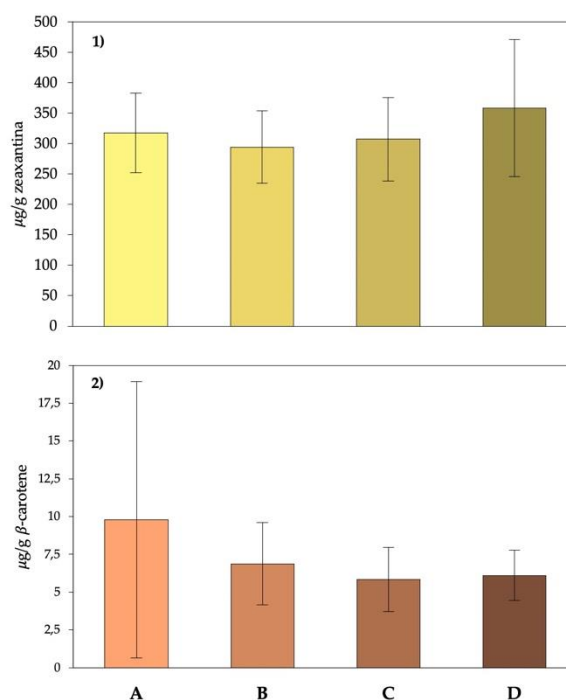
Come riportato in Peng et al. (2005), nei frutti di goji la zeaxantina rappresenta il 31–56% del contenuto di carotenoidi totale. In un lavoro di Niro et al. (2017) su goji coltivato in Calabria sono stati rilevati zeaxantina e  $\beta$ -carotene sia su estratti saponificati sia non saponificati: i valori medi di zeaxantina ottenuti da estratti non saponificati sono molto simili a quelli del presente studio ( $47,8 \pm 2,32$  mg/100 g) come pure quelli di  $\beta$ -carotene (saponificato:  $0,2 \pm 0,01$  mg/100 g; non saponificato:  $0,1 \pm 0,01$  mg/100 g). Anche nel lavoro di Lu et al. (2019) sono stati ritrovati dei valori molto elevati di questi carotenoidi: la zeaxantina variava da 0,0277 a 0,2857 mg/g DW, mentre il  $\beta$ -carotene da 0,0229 a 0,1301 mg/g DW. Insieme a questi, sono stati trovati anche altri carotenoidi, come la zeaxantina dipalmitato, di solito considerata la più rappresentata, in concentrazioni che andavano da 4,60 a 10,07 mg/g DW e la  $\beta$ -criptoxantina (0,0001-0,0031 mg/g DW).

Un lavoro di Elvira-Torales et al. (2019) riporta le concentrazioni relative ai frutti e ortaggi di uso comune: nella carota (*Daucus carota*) sono riportati valori di  $\beta$ -carotene di 4,35-8,84 mg/100 g e di zeaxantina di 0,25-0,51 mg/100 g; nella pesca (*Prunus persica*) sono state misurate concentrazioni rispettivamente di 1,4-2,6 e 0,02-0,04, mentre nel pomodoro (*Solanum lycopersicum*) di 0,32-1,50 e 0,05-0,21. In Saini et al. (2015) i valori ritrovati per questi carotenoidi sono stati rispettivamente 170,00  $\mu\text{g/g}$  ( $\beta$ -carotene) e 2,7  $\mu\text{g/g}$  (zeaxantina) per l'albicocca (*Prunus armeniaca*), 9,3 e 1,1  $\mu\text{g/g}$  per la pesca e 0,17-14,0 e 0,01-0,02 per la mela (*Malus domestica*).

Marinova & Ribarova (2007) hanno condotto uno studio su varie specie di bacche di interesse commerciale in Bulgaria: è emerso che i livelli più elevati di zeaxantina erano quelli trovati nella mora (29,0  $\mu\text{g}/100$  g), seguita dal mirtillo (14,0  $\mu\text{g}/100$  g). Inoltre, la mora aveva anche il più alto contenuto di  $\beta$ -carotene (101,4  $\mu\text{g}/100$  g), seguito dal ribes nero (61,6  $\mu\text{g}/100$  g).

I valori ritrovati in letteratura per molte specie di frutto di interesse commerciale note per essere una buona fonte di carotenoidi, ci indicano che le bacche di goji abbiano dei contenuti più limitati di  $\beta$ -carotene, rispetto ad esempio ad albicocca e carota, ma siano invece un'ottima fonte di zeaxantina.

L'analisi dei carotenoidi ha mostrato che i morfotipi non differiscono statisticamente né per il contenuto di zeaxantina né per quello di  $\beta$ -carotene (Figura 18).



**Figura 18.** Valori medi ( $\pm$ ds) di 1) zeaxantina; 2)  $\beta$ -carotene. Le medie sono state calcolate per quattro morfotipi (A, B, C, D) in tre anni di campionamento, espressi in  $\mu\text{g/g}$ .

Le concentrazioni di zeaxantina più elevate sono state quelle del morfotipo D, con  $358,35 \pm 112,78 \mu\text{g/g}$ , seguito dai  $317,62 \pm 65,20$  del morfotipo A,  $307,27 \pm 68,73$  di C e infine  $294,21 \pm 59,616$  in B. Per quanto riguarda il  $\beta$ -carotene invece, i valori hanno oscillato tra i  $9,78 \pm 9,14 \mu\text{g/g}$  di A, e i  $5,84 \pm 2,13$  di C, sebbene il morfotipo D sia stato quello che ha presentato i valori più costanti di tale composto  $6,10 \pm 1,67$ .

In Zhang et al. (2016) i valori di questi carotenoidi sono invece molto dissimili, con concentrazioni di zeaxantina che vanno da 17,01 a 9306  $\mu\text{g/g}$  e di  $\beta$ -carotene da 18,8 a 413,9  $\mu\text{g/g}$ , con enormi differenze tra i vari genotipi analizzati.

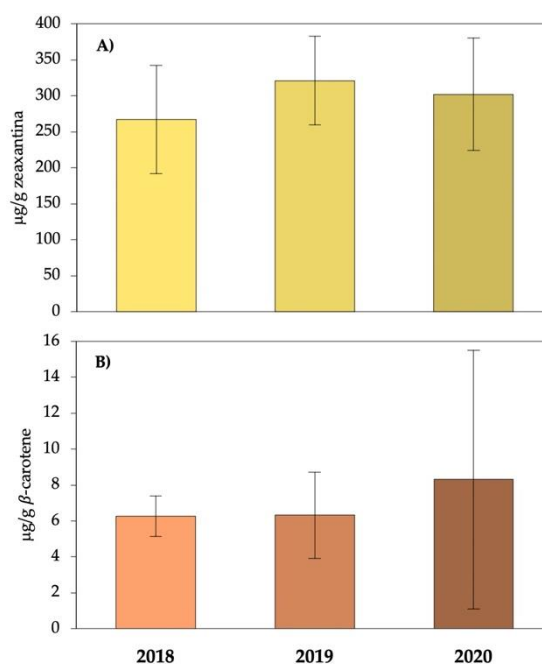
In un lavoro di Dragovic-Uzelac et al., (2007) sono state valutate le differenze quantitative e qualitative tra i carotenoidi nei frutti di tre cultivar di albicocca provenienti da diverse regioni croate, durante la maturazione. I risultati hanno evidenziato che la quantità di carotenoidi era maggiore nelle cultivar coltivate nella regione mediterranea rispetto a quelle coltivate nella regione continentale, specialmente

nei frutti allo stadio commerciale maturo. Le analisi hanno inoltre mostrato un aumento di tutti i carotenoidi durante la maturazione, in particolare il contenuto di  $\beta$ -carotene, che era circa 10 volte superiore nei frutti maturi commerciali rispetto ai frutti immaturi.

C. Zhou et al., (2011) hanno analizzato i contenuti di carotenoidi nei frutti di 46 cultivar di cachi. Sono stati identificati nove carotenoidi specifici (cioè, neoxantina, violaxantina, 9-cis-violaxantina, luteina, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene e licopene). Il contenuto dei carotenoidi totali, di  $\beta$ -criptoxantina e di zeaxantina hanno mostrato non solo i valori maggiori, ma anche delle differenze tra le cultivar.

I morfotipi analizzati in questo lavoro di tesi hanno mostrato di essere appartenenti ad una stessa popolazione e quindi di non differire da un punto di vista genetico. Probabilmente le piante oggetto di studio appartengono ad una stessa cultivar, e ciò potrebbe spiegare perché tra i vari gruppi non ci sono delle diversità nella concentrazione dei due principali carotenoidi ritrovati.

I valori di zeaxantina (A) e  $\beta$ -carotene (B) ottenuti dai frutti nei tre anni di campionamento non sono risultati essere statisticamente diversi da analisi ANOVA. Infatti, come mostrato nella Figura 19, le concentrazioni di zeaxantina sono molto simili nei tre anni di campionamento, con valori di  $267,34 \pm 75,17$   $\mu\text{g/g}$  nel 2018,  $321,24 \pm 61,90$  nel 2019 e  $302,01 \pm 78,25$  nel 2020. Anche in questo caso il 2019 è l'anno in cui sono stati rilevati i valori più elevati. Anche i valori di  $\beta$ -carotene sono molto simili nei tre anni consecutivi, però con andamento crescente:  $6,27 \pm 1,12$   $\mu\text{g/g}$  nel 2018;  $6,32 \pm 2,40$  nel 2019;  $8,30 \pm 7,20$  nel 2020.

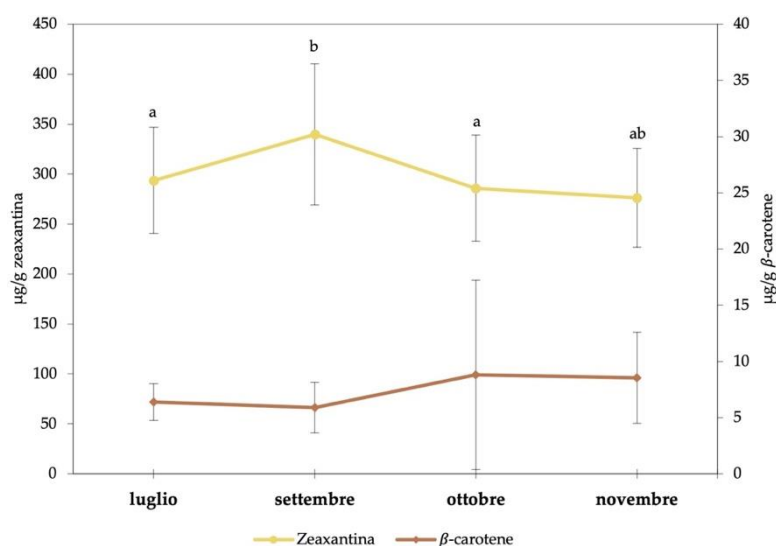


**Figura 19.** Valori medi ( $\pm$ ds) di A) zeaxantina e B)  $\beta$ -carotene. Le medie sono state calcolate per i tre anni di campionamento (stagioni di fruttificazione 2018, 2019 e 2020). I risultati sono espressi in  $\mu\text{g/g}$ .

Andersson et al. (2009) hanno analizzato quattro cultivar di bacche di olivello spinoso per il loro contenuto di carotenoidi e clorofilla durante la maturazione in tre anni consecutivi. Hanno scoperto che diversi carotenoidi generalmente aumentavano di concentrazione durante la maturazione a seconda della cultivar, del tempo di raccolta e dell'anno, ma le analisi GLM hanno rivelato che l'effetto della cultivar è considerevolmente maggiore rispetto a quello dell'anno e del periodo di raccolta.

Reddivari et al. (2007) hanno valutato l'influenza del genotipo, della posizione e dell'anno di raccolta sull'attività antiossidante, sui fenoli totali, sui carotenoidi totali e sulla composizione fenolica delle patate (*Solanum tuberosum* L.). Venticinque genotipi di patate sono stati coltivati in due località del Texas e in due anni consecutivi (2003 e 2004). Sebbene in questa specie non siano stati identificati zeaxantina e  $\beta$ -carotene, sono stati identificate la luteina e la violaxantina come principali carotenoidi, i quali non differivano nei due anni di analisi, ma differivano invece tra genotipi diversi.

Per quanto riguarda l'analisi effettuata sui vari *timepoint* di campionamento durante le stagioni di fruttificazione (Figura 20), il  $\beta$ -carotene non ha mostrato di avere differenze rilevabili statisticamente, sebbene i mesi finali della stagione (ottobre e novembre) presentassero valori leggermente più elevati (rispettivamente  $8,81 \pm 8,42 \mu\text{g/g}$  e  $8,56 \pm 4,05$ ) rispetto ai mesi più caldi (luglio= $6,41 \pm 1,63$ ; settembre= $5,90 \pm 2,26$ ). La zeaxantina invece ha mostrato differenze statisticamente significative delle concentrazioni misurate nel mese di settembre ( $339,79 \pm 70,59 \mu\text{g/g}$ ) con quelle dei mesi di luglio e ottobre (rispettivamente  $293,68 \pm 53,09$  e  $285,81 \pm 53,19$ ) ma non con novembre ( $276,19 \pm 49,41$ ).



**Figura 20.** Valori medi ( $\pm$ ds) dei carotenoidi zeaxantina (in giallo) e  $\beta$ -carotene (in arancio scuro) calcolati nei mesi di fruttificazione. I risultati sono espressi in  $\mu\text{g/g}$ . I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p\text{-value} < 0,01$ ).

Poiché la zeaxantina viene prodotta nel ciclo della xantofilla dalle piante in risposta a uno stress luminoso per trasferire l'energia della clorofilla eccitata, riportando la molecola al suo stato energetico basale, i tassi più elevati di questo carotenoide durante settembre potrebbero essere dovuti a un accumulo successivo ai periodi più caldi periodo estivo (luglio-agosto).

Sono stati condotti molti lavori per comprendere le condizioni migliori per ottenere piante ricche di zeaxantina, poiché questa molecola è particolarmente benefica per le malattie degli occhi legate alla degenerazione maculare (ad es. Esteban et al., 2014).

A supporto di queste considerazioni, un lavoro di NI et al. (2008) ha valutato i cambiamenti del contenuto dei carotenoidi nei frutti di *L. barbarum* raccolti in vari momenti del periodo di fruttificazione e poi sottoposti a processi di essiccazione. L'analisi del contenuto di zeaxantina e di carotenoidi totali ha mostrato che il frutto raccolto nei mesi più caldi del periodo estivo aveva un contenuto di carotenoidi maggiore rispetto al frutto raccolto nei primi mesi del periodo autunnale. La differenza anche in questo caso è stato supposto fosse correlata all'ambiente di crescita, in particolare all'intensità della temperatura e all'effetto della luce che era più intenso e portava ad un maggiore accumulo di questi composti nei frutti prodotto durante la parte più calda della stagione di fruttificazione. Infatti, in questo lavoro di tesi, se si confrontano le temperature medie dei primi mesi di fruttificazione (luglio, agosto e settembre) con quelle del periodo finale (ottobre e novembre) (vedi Tabella 2, paragrafo 3.2 dei Materiali e Metodi), si può vedere che esse differiscono di 8,9-11,3 °C.

Esteban et al. (2014) hanno cercato di comprendere le condizioni migliori per ottenere piante ricche di zeaxantina, poiché questa molecola è particolarmente benefica per le malattie degli occhi legate alla degenerazione maculare. Hanno sviluppato un protocollo per migliorare il contenuto di zeaxantina negli spinaci e nella rucola applicando vari tipi di stress (raffreddamento, luce intensa e siccità). I risultati hanno mostrato che proprio la luce intensa era lo stress più benefico, aumentando il peso fresco nella rucola e mostrando il più alto accumulo di carotenoidi in entrambe le specie.

Ciò ci fa supporre che anche nel caso della pianta di *L. barbarum* si possa pensare di adottare delle strategie simili per ottenere frutti più ricchi di zeaxantina, già prodotta in quantità superiori rispetto a molte altre specie ampiamente utilizzate come fonte di carotenoidi.

#### 4.3.4. Analisi del profilo degli zuccheri

La Tabella 27 riporta i risultati relativi alle analisi HPLC-IR effettuate sui campioni di frutti maturi per l'individuazione degli zuccheri (mono-, di-, poli-saccaridi e alcoli), espressi in mg/g.

**Tabella 27.** Valori medi totali ( $\pm$ ds), minimi, massimi e range relativi agli zuccheri rilevati, espressi in mg/g.

	Media	ds	Min	Max	Range
<b>Pectine</b>	46,30	16,09	16,69	105,97	89,28
<b>Saccarosio</b>	2,47	1,94	0,00	10,93	10,93
<b>Glucosio</b>	80,15	19,30	35,69	122,85	87,16
<b>Fruttosio</b>	75,49	18,09	36,38	120,95	84,57
<b>Melezitosio</b>	0,10	0,25	0,00	1,42	1,42
<b>Maltoesaoso</b>	0,05	0,36	0,00	3,04	3,04
<b>Mannitolo</b>	0,23	0,93	0,00	7,95	7,95
<b>Sorbitolo</b>	0,11	0,72	0,00	4,90	4,90
<b>Xilitolo</b>	0,21	0,83	0,00	4,67	4,67
<b>Etanolo</b>	2,88	2,98	0,00	15,93	15,93

Nel presente studio è stato realizzato il profilo completo degli zuccheri: sono stati trovati alti contenuti di pectine ( $46,30\pm 16,09$  mg/g), saccarosio ( $2,47\pm 1,94$  mg/g), glucosio ( $80,15\pm 19,30$  mg/g), fruttosio ( $75,49\pm 18,09$  mg/g) nei frutti completamente maturi (S4), insieme ad altri composti: l'etanolo ( $2,88\pm 2,98$  mg/g); il trisaccaride melezitosio ( $0,10\pm 0,25$  mg/g), che funge da attrattivo per gli insetti impollinatori; il maltoesaoso ( $0,05\pm 0,36$  mg/g), un polisaccaride con 6 unità di glucosio classificato come maltodestrina; e gli alcoli mannitolo ( $0,23\pm 0,93$  mg/g), sorbitolo ( $0,11\pm 0,72$  mg/g) e xilitolo ( $0,21\pm 0,83$  mg/g), che contribuiscono alla dolcezza e svolgono un ruolo importante negli effetti salutari di frutta e bacche. Anche l'etanolo è stato ritrovato in concentrazioni non trascurabili ( $0-15,93$  mg/g): esso è formato dall'enzima alcol deidrogenasi (ADH; EC 1.1.1.1) nel corso della maturazione, che avviene proprio grazie alla sintesi di metaboliti anaerobici, tra cui etanolo (Pesis, 2005).

In letteratura pochissimi studi si sono focalizzati sul profilo degli zuccheri nel frutto di *L. barbarum*, nonostante questi composti siano importanti fattori di qualità che influenzano direttamente il sapore e l'accettabilità dei frutti e delle bacche da parte dei consumatori (P. Liu et al., 2010).

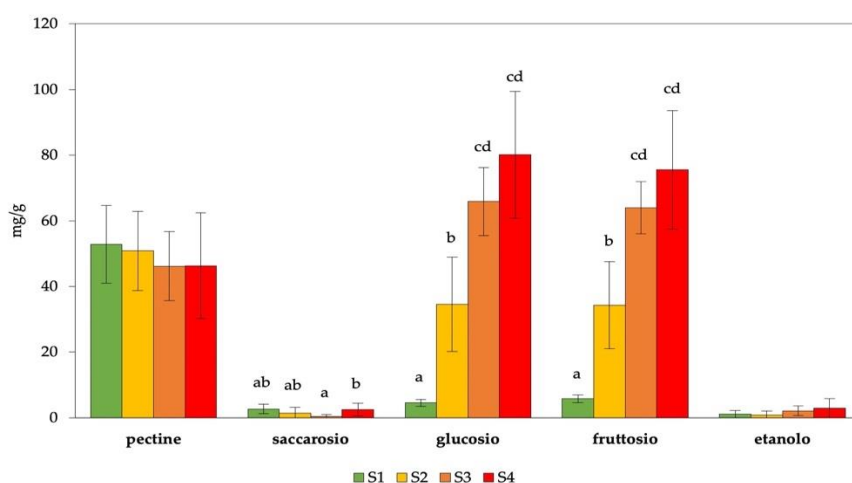
Nei frutti maturi glucosio e fruttosio hanno di solito concentrazioni simili, come mostrato anche nel presente studio, ma in letteratura si trovano dati discrepanti: ad esempio nel lavoro di Zhao et al. (2015) sono stati analizzati i contenuti zuccherini nei frutti in vari stadi di maturazione e nel frutto completamente maturo sono stati individuati valori di glucosio ( $2,335\pm 0,061$  mg/g) quasi venti volte inferiori rispetto a quelli del fruttosio ( $40,70\pm 3,760$  mg/g) e contenuti medi di saccarosio di  $0,68\pm 0,026$

mg/g. Insieme a questi sono stati individuati solo eritrosio, galattosio e arabinosio in quantitativi inferiori agli 0,1 mg/g.

In Montesano et al. (2016) sono stati analizzati frutti secchi di goji reperiti in vari negozi (erboristerie, negozi di cucina etnica, supermercati) e in tutti i campioni analizzati, sono stati registrati in grande quantità fruttosio e glucosio (154,20-259,13 mg/g e 152,92-284,60 mg/g, rispettivamente), mentre il contenuto di saccarosio era circa dieci volte inferiore (13,75-36,43 mg/g). In un lavoro di Mikulic-Petkovsek et al. (2012) su 25 specie di bacche selvatiche e coltivate, tra cui *L. barbarum*, riporta 23,1 g/kg sia per fruttosio sia per glucosio e 0,38 g/kg per saccarosio, in linea con quanto ritrovato in questo lavoro di tesi e conforme alle condizioni climatiche slovene, tipiche delle aree continentali e quindi più fresche rispetto a quelle della costa toscana.

Nello stesso lavoro, sono presenti anche i contenuti di glucosio, fruttosio, saccarosio e sorbitolo di altri frutti di interesse commerciale: ad esempio nel frutto maturo di mirtillo rosso americano (*Vaccinium macrocarpon*) sono stati ritrovati valori di glucosio e fruttosio rispettivamente di 55,0 ( $\pm 1,16$  SE) e 53,7 ( $\pm 1,32$ ) g/kg e di saccarosio di 6,49 ( $\pm 0,20$ ). Tra le altre specie, i quantitativi di glucosio, fruttosio e saccarosio sono stati rispettivamente: 26,7 $\pm$ 1,29, 26,9 $\pm$ 0,71 e 4,10 $\pm$ 0,45 g/kg per la mora (*Rubus fruticosus*), 27,3 $\pm$ 0,98, 30,2 $\pm$ 1,36 e 2,48 $\pm$ 0,77 g/kg per la fragola (*Fragaria x ananassa*) e 16,8 $\pm$ 0,37, 20,8 $\pm$ 0,56 e 0,50 $\pm$ 0,07 g/kg per il ribes rosso (*Ribes rubrum*). Anche per questi frutti si può notare che il contenuto di glucosio e fruttosio nel frutto maturo sono pressoché identici, e il contenuto di saccarosio è di circa 10 volte inferiore.

I frutti sono stati analizzati durante i vari stadi di maturazione per comprendere come il loro profilo si modificasse durante l'accrescimento del frutto (Figura 21).



**Figura 21.** Valori medi ( $\pm$ ds) di pectine, saccarosio, glucosio, fruttosio ed etanolo nei quattro stadi di maturazione. I risultati sono espressi in mg/g. I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p$ -value  $\leq 0,01$ ).

In S1 i livelli di saccarosio, glucosio e fruttosio sono risultati essere molto simili tra loro (rispettivamente  $2,68 \pm 1,44$ ;  $4,51 \pm 1,09$ ;  $5,79 \pm 1,14$  mg/g), mentre già in S2 avviene un cambiamento piuttosto marcato, con un forte aumento della concentrazione del glucosio ( $34,54 \pm 14,36$ ) e del fruttosio ( $34,32 \pm 13,23$ ).

Il contenuto di fruttosio e glucosio aumenta drasticamente tra S1 e S2, con differenze significative tra i due stadi per entrambi gli zuccheri, e poi gradualmente da S2 e S4, con differenze significative tra gli stadi iniziali (S1 e S2) e quelli finali (S3 e S4), i quali non differiscono però tra loro. I livelli più elevati vengono infatti raggiunti in S4 con  $80,15 \pm 19,30$  mg/g per il glucosio e  $75,50 \pm 18,09$  mg/g per il fruttosio.

Anche il contenuto di saccarosio presenta delle fluttuazioni minime (range= 4,16 mg/g) durante la maturazione, con differenze statisticamente significative solo tra lo stadio S3 e lo stadio S4.

Per quanto riguarda invece le pectine, esse presentano concentrazioni molto stabili durante tutti gli stadi di accrescimento del frutto, senza differenze tra questi, sebbene tendano a decrescere (da  $52,82 \pm 11,86$  in S1 a  $46,30 \pm 16,09$  in S4).

La tendenza è inversa invece per le concentrazioni di etanolo, che va da  $1,11 \pm 1,12$  mg/g di S1 a  $2,88 \pm 2,98$  mg/g di S4, senza differenze significative tra gli stadi.

Tra gli altri zuccheri riscontrati nei frutti maturi (S4, vedi Tabella 21), solo il melezzitosio è stato ritrovato in tutti i vari stadi di maturazione:  $0,46 \pm 0,33$  mg/g in S1,  $1,45 \pm 1,17$  mg/g in S2 e  $1,10 \pm 0,64$  mg/g in S3. Questo zucchero sembra che svolga un ruolo nel sistema di osmoregolazione e nell'attrazione di insetti come le formiche e in alcuni frutti, come l'ananas, tende ad aumentare nel corso della maturazione, probabilmente per favorire l'azione di tali insetti nella dispersione dei semi (Ikram et al., 2020).

Zheng et al., (2010) hanno dimostrato che il contenuto di fruttosio e glucosio nelle bacche di goji aumentava continuamente durante la maturazione dei frutti. Inoltre, è in accordo con una tendenza generale, poiché numerosi studi hanno riscontrato livelli crescenti di fruttosio e glucosio durante le fasi di maturazione ad esempio, della mela (Y. Zhang et al., 2010), della fragola (Basson et al., 2010), dell'albicocca, prugna e pesca (Bae et al., 2014). Ci sono però casi discordanti, come in uno studio di Song et al. (2019) sui frutti della giuggiola che ha mostrato che il glucosio e il fruttosio diminuivano durante le fasi di maturazione, così come il lavoro di Kafkas et al. (2007) sul genotipo di fragola 'Camarosa'.

Per l'etanolo, indagini sulle cultivar di pesche precoci "Rich May" e "Ruby Rich", sulla nettarina "Big Top" e sulla cultivar di pesche tardive "Flaminia" effettuate in un lavoro di Zerbini et al. (2001), hanno evidenziato la tendenza all'aumento durante gli stadi di maturazione e perciò è stato suggerito che i livelli di etanolo al momento della raccolta potrebbero essere un criterio utile per indicare il periodo di raccolta ottimale.



Nella Tabella 28 sono mostrati i risultati relativi al profilo degli zuccheri: per tutti i composti non sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative tra i morfotipi.

**Tabella 28.** Valori medi ( $\pm$  ds) dei principali zuccheri rilevati quattro morfotipi (A, B, C, D). I valori sono espressi in mg/g.

	A		B		C		D	
	Media	ds	Media	ds	Media	ds	Media	ds
<b>Pectine</b>	44,47	14,07	46,15	16,25	46,80	16,23	43,87	9,65
<b>Saccarosio</b>	2,39	2,01	2,44	1,98	2,47	1,98	2,07	1,54
<b>Glucosio</b>	79,09	19,27	80,09	19,63	80,20	19,52	71,74	15,48
<b>Fruttosio</b>	74,69	18,17	75,54	18,38	75,64	18,28	69,08	15,48
<b>Etanolo</b>	2,82	2,72	2,90	3,03	2,88	3,04	2,55	2,32
<b>Melezitosio</b>	0,11	0,26	0,10	0,25	0,09	0,23	0,06	0,27
<b>Maltoesaoso</b>	0,06	0,37	0,05	0,37	0,05	0,37	0,00	0,00
<b>Mannitolo</b>	0,23	0,95	0,22	0,93	0,22	0,93	0,04	0,15
<b>Sorbitolo</b>	0,12	0,75	0,12	0,74	0,12	0,74	0,00	0,00
<b>Xylitolo</b>	0,14	0,66	0,19	0,81	0,22	0,85	0,01	0,03
<b>TOT</b>	204,12	59,25	207,81	62,38	208,70	62,16	189,43	44,92

Per quanto riguarda le pectine, il morfotipo che ha mostrato i valori più elevati è stato C ( $46,80 \pm 16,23$  mg/g), mentre quello con i valori più bassi D ( $43,87 \pm 9,65$ ). Anche nel caso del saccarosio il morfotipo D ( $2,07 \pm 1,54$ ) è stato quello con i valori inferiori, mentre C quello con i valori più elevati ( $2,47 \pm 1,98$ ). Anche per quanto riguarda glucosio e fruttosio il morfotipo D è stato quello che ha mostrato i valori più bassi, mentre i morfotipi B e C sono stati quelli con i valori più elevati e in linea con quanto riportato in letteratura per la specie. Il morfotipo B è stato quello che ha evidenziato valori di etanolo più elevati mentre il morfotipo D quello con i valori più bassi. Per quanto riguarda gli zuccheri ritrovati in tracce, nel morfotipo D non è stata riscontrata la presenza di maltoesaoso e sorbitolo, presenti invece in tutti gli altri morfotipi. I valori più elevati di xilitolo sono stati invece rilevati nel morfotipo C.

Quindi il morfotipo D è risultato essere in generale il gruppo con il minor contenuto totale di zuccheri ( $189,43 \pm 44,93$  mg/g), mentre il morfotipo C quello con il contenuto totale più elevato ( $208,70 \pm 62,16$ ).

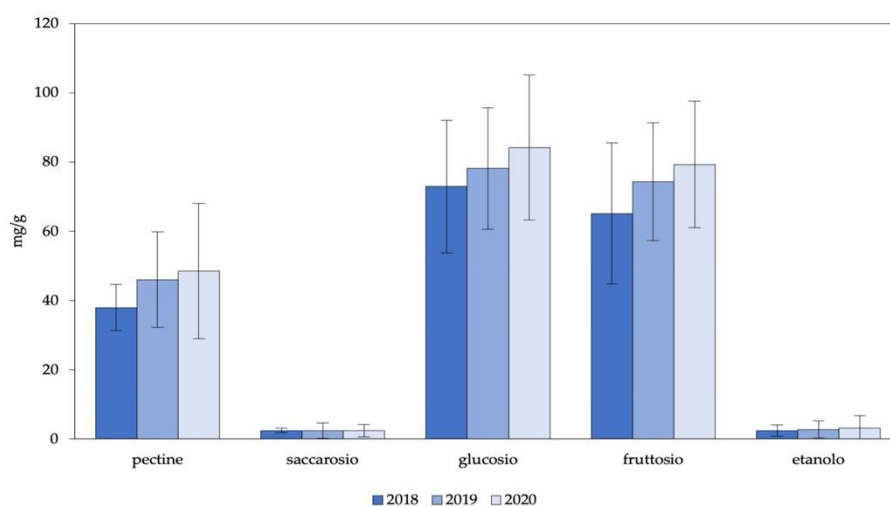
Kafkas et al. (2006) hanno effettuato l'analisi di zuccheri, acidi organici e contenuto di vitamina C di genotipi di more dalla Turchia. In questo studio, i frutti delle varie cultivar differivano sia per i singoli zuccheri che per il contenuto di acidi organici. Inoltre, le concentrazioni di fruttosio e glucosio sono state trovate rispettivamente notevolmente superiori al saccarosio.

Nel lavoro di Hwang et al. (2019) è stata valutata l'influenza dello stadio di maturazione e della cultivar sulle proprietà fisico-chimiche, sui profili di zuccheri e acidi organici e sulle composizioni antiossidanti

delle fragole. I risultati hanno mostrato che il contenuto totale di zuccheri variava significativamente da una cultivar all'altra, ma non il contenuto dei singoli zuccheri.

L'analisi del contenuto dei principali zuccheri nei tre anni di campionamento è mostrata nella Figura 22: sebbene l'analisi statistica non abbia evidenziato differenze significative tra le concentrazioni dei tre anni, si può notare che in tutti i casi si ha una tendenza all'aumento dei valori per ogni categoria, ad eccezione del saccarosio, che rimane pressoché costante ( $2,49 \pm 0,73$  mg/g nel 2018;  $2,46 \pm 2,24$  mg/g nel 2019;  $2,47 \pm 1,77$  mg/g nel 2020). Le pectine passano da un valore di  $37,97 \pm 6,66$  mg/g nel 2018 a uno di  $48,48 \pm 19,51$  mg/g nel 2020. Il glucosio e il fruttosio invece hanno valori di  $72,91 \pm 19,17$  e  $65,12 \pm 20,33$  mg/g nel 2018,  $78,13 \pm 17,57$  e  $74,28 \pm 17,01$  mg/g nel 2019 e  $84,22 \pm 20,96$  e  $79,28 \pm 18,28$  mg/g nel 2020. Il contenuto di etanolo varia in maniera crescente da  $2,47 \pm 1,65$  mg/g nel 2018 a  $3,10 \pm 3,71$  mg/g nel 2020.

Come si può vedere dalla Figura 22, i contenuti di tutti gli zuccheri presi in considerazione tendono a crescere nel corso dei tre anni consecutivi di campionamento. Analizzando il trend stagionale e annuale della piovosità nella zona, è emerso che l'anno 2018 è stato quello con la piovosità annua maggiore mentre l'anno 2020 quello con la piovosità inferiore, pari quasi alla metà appunto anche durante la stagione di fruttificazione la piovosità dell'anno 2020 è stata quella inferiore.



**Figura 22.** Valori medi ( $\pm ds$ ) di pectine, saccarosio, glucosio, fruttosio ed etanolo. Le medie sono state calcolate per i tre anni di campionamento (stagioni di fruttificazione 2018, 2019 e 2020). I valori sono espressi in mg/g.

In frutti come i mirtilli, le differenze stagionali di temperatura e precipitazioni e l'altitudine hanno un grande impatto sull'accumulo di zuccheri e altri composti, a differenza della *cultivar*, come riportato in Correia et al. (2016). Infatti, in questo studio sono state riscontrate differenze statisticamente significative in tutti gli zuccheri analizzati in tre anni consecutivi. Inoltre, nel goji come nei mirtilli, il basso contenuto di saccarosio è probabilmente dovuto all'idrolisi enzimatica o alla sua conversione in

altri zuccheri durante il processo di maturazione. Il fruttosio è più di 1,5 volte più dolce del saccarosio ed è il più dolce di tutti i carboidrati presenti in natura ed è il più solubile in acqua di tutti gli zuccheri. Sebbene non sia dolce come il fruttosio, il glucosio è la principale fonte di energia ed è il principale zucchero utilizzato come precursore nella biosintesi di diverse importanti sostanze come vitamine, proteine e lipidi (Hanover & White, 1993). Anche in uno studio di Cupic et al. (2018) su diverse cultivar di prugna è stato riscontrato un effetto significativo dell'anno di raccolta per il saccarosio, il sorbitolo, lo zucchero totale e la sostanza secca, mentre non è stato riscontrato alcun effetto per il contenuto di glucosio e fruttosio, sebbene la maggiore discriminazione fosse fornita dalla cultivar.

Nella Tabella 29 invece sono riportati i risultati dell'analisi sul contenuto degli zuccheri nei vari mesi di fruttificazione: le uniche differenze statisticamente significative sono state rilevate tra le pectine, in cui le concentrazioni del mese di novembre ( $64,27 \pm 21,93$  mg/g) sono risultate essere maggiori rispetto a quelle degli altri mesi (luglio=  $44,97 \pm 10,30$  mg/g; settembre=  $39,61 \pm 12,79$  mg/g; ottobre=  $48,13 \pm 18,22$  mg/g), che invece tra loro non differiscono.

**Tabella 29.** Valori medi ( $\pm$  ds) dei principali zuccheri rilevati nei mesi di fruttificazione (luglio, settembre, ottobre e novembre). I valori sono espressi in mg/g. I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p\text{-value} \leq 0,01$ ).

	Luglio	Settembre	Ottobre	Novembre
<b>Pectine</b>	$44,97 \pm 10,30^a$	$39,61 \pm 12,79^a$	$48,13 \pm 18,22^a$	$64,27 \pm 21,93^b$
<b>Saccarosio</b>	$1,99 \pm 1,33$	$2,01 \pm 1,55$	$3,20 \pm 2,40$	$3,74 \pm 2,68$
<b>Glucosio</b>	$73,06 \pm 15,03$	$84,33 \pm 21,27$	$86,91 \pm 12,08$	$78,42 \pm 22,37$
<b>Fruttosio</b>	$69,03 \pm 15,33$	$81,18 \pm 21,03$	$80,21 \pm 18,11$	$71,94 \pm 11,35$
<b>TOT</b>	$189,05 \pm 41,99$	$204,13 \pm 56,64$	$218,45 \pm 50,81$	$218,37 \pm 58,33$

Il contenuto di saccarosio, glucosio e fruttosio si è invece rivelato costante nel corso della stagione di fruttificazione. Se si osservano attentamente i risultati si può comunque vedere che il saccarosio tende ad aumentare nei mesi finali della stagione di fruttificazione (mesi di ottobre e novembre, rispettivamente  $3,20 \pm 2,40$  mg/g e  $3,74 \pm 2,68$ ), mentre glucosio e fruttosio raggiungono i loro livelli massimi nei mesi di settembre e ottobre (rispettivamente  $84,33 \pm 21,27$  mg/g e  $86,91 \pm 12,08$  per il glucosio e  $81,18 \pm 21,03$  mg/g e  $80,21 \pm 18,11$  per il fruttosio).

Zorenc et al. (2016) hanno confrontato la composizione dei frutti del mirtillo durante la stagione del raccolto. I risultati hanno messo in luce che i livelli di zuccheri totali subivano un incremento generale. Un'altra importante osservazione è stata quella che i mirtilli raccolti in periodi successivi sono più piccoli e contengono livelli comparabili o maggiori di metaboliti selezionati rispetto ai frutti più grandi raccolti all'inizio della stagione del raccolto.

#### 4.3.5. Analisi del profilo degli aminoacidi liberi

In questo lavoro di tesi è stata effettuata un'analisi verificare la presenza e la concentrazione degli aminoacidi liberi. Sono stati ritrovati un totale di 23 AA liberi: acido aspartico (ASP), serina (SER), acido glutammico (GLU), glicina (GLY), prolina (PRO), cisteina (CYS) e tirosina (TYR) per gli AA non essenziali (non-EAA); istidina (HYS), arginina (ARG), treonina (THR), valina (VAL), metionina (MET), isoleucina (ILE), leucina (LEU), lisina (LYS) e fenilalanina (PHE) per gli AA essenziali (EAA); infine, taurina (TAU),  $\beta$ -alanina (BALA), alanina (ALA), acido  $\gamma$ -amino butirrico (GABA), acido  $\beta$ -amino butirrico (BABA), acido  $\alpha$ -amino butirrico (AABA) e ornitina (ORN) per gli AA non proteogenici (non-PAA).

Il profilo completo è riassunto nella Tabella 30, dove sono mostrati i valori medi (e loro deviazione standard), i valori minimi, massimi e il range, espressi in  $\mu\text{g/g}$ , nonché la concentrazione totale di aminoacidi per campione, il contenuto di AA proteogenici (AAP), AA essenziali proteogenici (AAEP), AA non-essenziali proteogenici (AAAnEP) e AA non- proteogenici (AAAnP).

Tra gli AA non essenziali, solo ASP, SER, GLU e TYR sono stati ritrovati in tutti i campioni analizzati, mentre i valori medi più elevati sono stati registrati per PRO ( $1045,91 \pm 657,30 \mu\text{g/g}$ ), SER ( $398,20 \pm 373,89$ ), ARG ( $381,07 \pm 267,95$ ) e ALA ( $297,18 \pm 175,16$ ). CYS invece è stato il composto ritrovato con le concentrazioni minori ( $2,42 \pm 9,07$ ).

Tra gli AA essenziali, solo VAL è stato rilevato in tutti i campioni ( $34,29$ - $138,91 \mu\text{g/g}$ ), mentre ARG è stato il composto ritrovato con le concentrazioni medie più elevate. MET è stato invece il composto meno rappresentato del gruppo ( $1,37 \pm 1,12$ ).

Per quanto riguarda invece gli AA non-proteogenici, solo ORN è stata rilevata in tutti i campioni analizzati, con concentrazioni da  $1,19$  a  $45,87 \mu\text{g/g}$ , sebbene ALA sia stato quello ritrovato con concentrazione media più elevata. Il composto con i livelli più bassi è stato invece BABA, con valori medi di  $0,12 \pm 0,34 \mu\text{g/g}$ .

Il contenuto totale di AA è risultato essere  $3208,12 \mu\text{g/g}$ , di cui  $797,10 \mu\text{g/g}$  AA essenziali (24,8%) e  $1777,93 \mu\text{g/g}$  AA non essenziali (55,4%). Tra gli AA essenziali, i valori medi più elevati sono stati quelli di ARG, HYS ( $110,80 \pm 258,36$ ) e LEU ( $109,51 \pm 54,07$ ), mentre tra i non essenziali quelli di SER e PRO, la quale rappresenta da sola il 32,6% del contenuto totale di AA nel frutto di goji.

Gli aminoacidi svolgono una serie di ruoli vitali nel metabolismo centrale delle piante. Essi agiscono ad esempio come intermedi dei metaboliti finali in alcune vie metaboliche, oltre a partecipare alla regolazione di molteplici vie metaboliche e di altre vie fisiologiche e biochimiche, influenzando così numerosi processi fisiologici nelle piante (Q. Yang et al., 2020).

**Tabella 30.** Valori medi totali ( $\pm$ ds), minimi, massimi e range relativi ai 23 aminoacidi rilevati, espressi in  $\mu\text{g/g}$ .

	<b>Media</b>	<b>ds</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Range</b>
<b>AA non-essenziali</b>					
ASP	132,85	90,67	40,05	396,55	356,50
SER	398,20	373,89	72,62	1343,44	1270,82
GLU	144,17	69,28	70,39	288,65	218,27
GLY	33,91	25,86	0,00	100,70	100,70
PRO	1045,91	657,30	0,00	2330,05	2330,05
CYS	2,42	9,07	0,00	36,35	36,35
TYR	20,47	8,51	4,69	34,05	29,35
<b>AA essenziali</b>					
HYS	110,80	258,36	0,00	901,91	901,91
ARG	381,07	267,95	0,00	988,83	988,83
THR	69,35	124,63	0,00	433,92	433,92
VAL	79,32	28,26	34,29	138,91	104,62
MET	1,37	1,12	0,00	4,30	4,30
ILE	22,15	17,75	0,00	61,43	61,43
LEU	109,51	54,07	0,00	205,58	205,58
LYS	14,92	10,72	0,00	31,97	31,97
PHE	8,62	6,97	0,00	20,49	20,49
<b>AA non-proteogenici</b>					
TAU	78,20	64,47	0,00	268,06	268,06
BALA	59,49	118,96	0,00	351,70	351,70
ALA	297,18	175,16	0,00	615,73	615,73
GABA	161,53	351,31	0,00	1458,79	1458,79
BABA	0,12	0,34	0,00	1,03	1,03
AABA	16,65	28,33	0,00	95,37	95,37
ORN	19,92	12,47	1,19	45,87	44,68
<b>TOT</b>	3208,12	1239,77	-	-	-
<b>AA proteogenici</b>	2872,21	1105,86	-	-	-
<b>AA non- proteogenici</b>	335,92	394,45	-	-	-
<b>AA essenziali</b>	797,10	404,42	-	-	-
<b>AA non-essenziali</b>	1777,93	650,93	-	-	-

Inoltre, alcuni AA liberi sono responsabili di caratteristiche organolettiche degli alimenti, come ad esempio l'L-glutammato che suscita un gusto unico chiamato *umami*. Gli aminoacidi sono riconosciuti nel campo delle scienze alimentari e della nutrizione come composti che svolgono un ruolo centrale nel metabolismo, nel funzionamento del sistema nervoso, dell'apparato digerente, ecc. (Galili et al., 2016). Nonostante l'importanza ricoperta da questi composti sia nei processi biochimici delle piante sia

nell'alimentazione umana, esistono pochissimi lavori che riguardano la determinazione del profilo amminoacidico dei frutti di goji.

Tra gli ultimi e più completi quello di Lu et al. (2021), dove è stato rilevato un contenuto totale di AA che va da 1020 a 2584 mg/100g, cioè circa 10 volte maggiore rispetto a quello rilevato in questo lavoro di tesi, e 31,35-150,2 mg/100g per gli AA essenziali.

In un altro studio di (Y. Zhou et al., 2020) è stato invece analizzato come le concentrazioni dei vari aminoacidi riscontrati nelle bacche di goji variassero a seconda della temperatura di stoccaggio dei frutti: il contenuto totale dei 29 AA riscontrati è stato di  $24,57 \pm 1,08$  mg/g, anche questo caso circa 10 volte di più dei valori di questo lavoro di tesi.

Per quanto riguarda altre specie vegetali, nel pomodoro è stato trovato un contenuto totale di aminoacidi di 1682-3279 mg/100 g FW (S. H. Choi et al., 2014), di 129-4068 mg/100 g DW nella giuggiola (Choi et al., 2012), 340-470 mg/100 g nel succo di melone Hami (Pei et al., 2020) e 25,33-320,48 mg/100 g FW nelle mele (Di Maro et al., 2011).

Questi risultati indicano che le bacche di Goji potrebbero essere considerate una buona fonte di nutrienti essenziali, come gli AA liberi.

I dati ottenuti sono stati analizzati tramite ANOVA a due vie (Tabella 31) per comprendere come i fattori "anno di campionamento" e "mese di raccolta" influissero sulle concentrazioni totali delle varie classi di AA: non sono state trovate differenze significative all'interno delle classi, come si può vedere dai *p-value* di ogni analisi: le quantità di AA si mantengono costanti e non variano né da un anno di campionamento all'altro, né nel corso della stagione di fruttificazione, indicando che probabilmente questi composti, che svolgono ruoli fondamentali nella pianta, nel loro complesso sono influenzati solo marginalmente dai fattori ambientali.

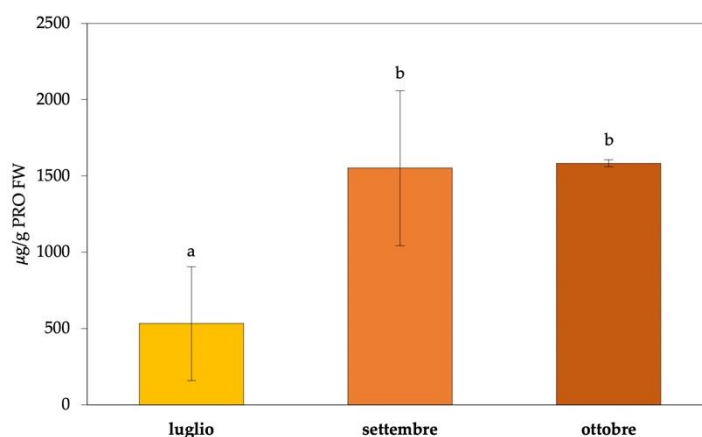
Per comprendere se qualcuno degli aminoacidi identificati fosse o meno influenzato singolarmente da fattori esterni, è stata effettuata un'analisi ANOVA a una via con variabile di gruppo (e test post-hoc di Bonferroni) sui singoli composti.

Per comprendere se qualcuno degli aminoacidi identificati fosse o meno influenzato singolarmente da fattori esterni, è stata effettuata un'analisi ANOVA a una via con variabile di gruppo (e test post-hoc di Bonferroni) sui singoli composti. Essa ha rivelato delle differenze significative solo per alcuni composti: le concentrazioni di VAL e ORN hanno mostrato una differenza tra l'anno 2019, in cui entrambi hanno valori più elevati, e 2020, con un livello di significatività elevato (*p-value*  $\leq 0,01$ ). PRO e BABA hanno invece presentato differenze significative nel corso della stagione di fruttificazione.

**Tabella 31.** Risultati dell'analisi ANOVA a due vie effettuata sul contenuto totale di AA (AA tot), AA proteici (PAA), AA essenziali proteici (EPAA), AA non essenziali proteici (non-EPAA) e AA non proteici (Non-PAA). I valori medi (e le relative deviazioni standard) sono espressi in  $\mu\text{g/g}$ .

	AA tot		PAA		EPAA		Non-EPAA		Non-PAA	
	Media	ds	Media	ds	Media	ds	Media	ds	Media	ds
<b>2019</b>	3525,27	1331,17	916,717	452,191	1893,02	688,191	427,231	479,415	3098,04	1189,65
<b>2020</b>	2679,55	940,771	597,752	215,208	1586,10	589,896	183,732	92,703	2495,82	921,557
$F_A$	1,843		2,578		0,824		1,474		1,121	2,578
<i>p-value</i>	0,196		0,131		0,379		0,245		0,308	0,131
<b>luglio</b>	2681,32	1.369,58	714,2	428,255	1336,63	495,494	435,16	544,113	2246,16	1023,66
<b>settembre</b>	3810,54	1.014,76	930,177	428,509	2246,96	545,934	248,605	136,5	3561,94	933,569
<b>ottobre</b>	3508,08	446,213	729,51	284,766	2136,01	111,419	200,895	85,397	3307,19	531,61
$F_M$	1,61		0,485		6,325		0,482		3,457	
<i>p-value</i>	0,237		0,626		0,012		0,628		0,063	
$F_{AxM}$	1063		0,347		2,699		3,83		1,565	
<i>p-value</i>	0,381		0,715		0,116		0,06		0,256	

In particolare, i valori di PRO (Figura 23) sono risultati diversi tra luglio, che è il mese con i valori più bassi ( $532,49 \pm 372,85 \mu\text{g/g}$ ) e settembre, dove i valori sono i più elevati ( $1551,40 \pm 507,52 \mu\text{g/g}$ ), mentre quelli di BABA sono risultati più elevati nel mese di ottobre ( $0,99 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$ ), diverso da luglio e settembre.



**Figura 23.** Valori medi ( $\pm$ ds) della prolina (PRO), espressi in  $\mu\text{g/g}$ , misurati negli estratti di bacche di goji nei mesi di fruttificazione delle stagioni 2019 e 2020. I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p\text{-value} \leq 0,01$ ).

Nel lavoro sopra citato di Lu et al. (2021), VAL presentava dei valori medi compresi tra 6,06 e 19,67 mg/100g, molto simili a quelli ritrovati in questo lavoro di tesi, mentre ORN non era stata valutata. Per quanto invece riguarda PRO e BABA, quest'ultimo non era stato valutato, mentre PRO aveva dei valori tra i 411,6 e i 675,8 mg/100 g, molto più elevati rispetto a quelli del presente lavoro.

È noto che l'ornitina, oltre ad essere un precursore della biosintesi dell'arginina, funge anche da precursore di altre vie metaboliche, tra cui la biosintesi delle poliammine tramite l'ornitina decarbossilasi (ODC) e il glutammato e della prolina tramite le attività dell'ornitina- $\delta$ -aminotransferasi ( $\delta$ -OAT). Una maggiore biosintesi delle poliammine è stata riscontrata ad esempio insieme a una maggiore resistenza delle piante alla salinità e agli stress idrici (Kalamaki et al., 2009), che possono insorgere durante il periodo estivo.

Un aumento della prolina è anche indotto dal glutammato dalla via della saccaropina e in risposta allo stress osmotico e salino (Q. Yang et al., 2020). È stato riscontrato che l'accumulo di prolina protegge i tessuti delle piante dallo stress iperosmotico. Inoltre, è stato suggerito il ruolo della prolina come molecola di segnalazione coinvolta nella regolazione dell'espressione genica sotto stress (Kalamaki et al., 2009). Oltre a questo, la prolina svolge molteplici funzioni in altri stress biotici e abiotici, trasduzione del segnale, espressione genica, regolazione ROS, regolazione redox e sviluppo delle piante (Trovato et al., 2019).

L'acido  $\beta$ -aminobutirrico (BABA) svolge un ruolo importante nell'induzione dell'aumento di flavonoidi, ioni calcio, tratti fotosintetici, composti antiossidanti, specie reattive dell'ossigeno e altri caratteri qualitativi e quantitativi nelle piante (Choudhary et al., 2021). Diversi lavori hanno mostrato il ruolo positivo del BABA nel migliorare il potenziale di tolleranza contro i principali stress abiotici come il calore (Zimmerli et al., 2008), lo stress osmotico (Jisha & Puthur, 2016), la siccità e la salinità (Jakab et al., 2005). È stato inoltre dimostrato come il trattamento con BABA tenda a migliorare le risposte adattative contro lo stress da calore (Choudhary et al., 2021).

#### 4.3.6. Correlazioni tra composti funzionali e parametri ambientali

Un'analisi effettuata su tutti i risultati dei vari saggi ha evidenziato correlazioni tra questi ed anche con i parametri ambientali rilevati. Le Tabelle 32a e 32b riassumono le correlazioni significative i composti analizzati e i parametri ambientali.

**Tabella 32a.** Coefficienti di correlazione di Pearson tra composti funzionali, attività antiossidanti degli estratti di bacche di goji e parametri climatici. Sono mostrate solo le correlazioni significative.

	FRAP	TPC	TFC	Kaempferolo	Pectine	Saccarosio
TPC	0,225**					
TFC	0,482**	0,436**				
Acido caffeico	0,412**					
P max	-0,203**	0,327**		-0,268		0,202*
T media	0,324**		0,363**		-0,309**	-0,320**

\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$



**Tabella 32b.** Coefficienti di correlazione di Pearson AA e parametri climatici. Sono mostrate solo le correlazioni significative.

	GLY	ALA	PRO	BABA	ORN	LEU	nEAA	pAA	AAtot
<b>P max</b>		0,551**	0,776**		0,426*		0,806**	0,744**	0,635**
<b>T media</b>	-0,545**	-0,536*	-0,652**	-0,862**		0,502*	-0,543*		

\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$

I flavonoidi totali sono significativamente e positivamente correlati con l'attività antiossidante totale ( $R=0,482$ ) e con i polifenoli totali ( $R=0,436$ ), come confermato in altri studi (Lu et al., 2021), suggerendo che i flavonoidi rappresentano un contributo molto importante all'attività antiossidante totale dell'estratto. Anche l'acido caffeico sembra contribuire in modo significativo all'attività antiossidante totale ( $R=0,412$ ), come riportato anche da Gülçin (2006), che ha dimostrato che l'acido caffeico era un antiossidante efficace in diversi saggi antiossidanti *in vitro*, tra cui l'attività antiossidante totale con vari metodi, tra cui il metodo del tiocianato ferrico, potere riducente, scavenging dei radicali ABTS, scavenging dei radicali DPPH, scavenging dei radicali anionici superossido e attività chelante dei metalli quando viene confrontato con composti antiossidanti standard come BHA, BHT,  $\alpha$ -tocoferolo e Trolox (un analogo solubile in acqua del tocoferolo).

Un altro aspetto interessante è rappresentato dalla correlazione tra temperatura media del periodo di fruttificazione con attività antiossidante e flavonoidi totali ( $R=0,324$  e  $R=0,363$ ): temperature più elevate aumentano queste due caratteristiche benefiche, come riportato in Yang et al. (2018): la composizione dei composti fenolici (delphinidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-rutinoside e myricetin-3-O-glucoside) in tre cultivar di *Ribes nigrum* ha dimostrato le correlazioni positive con la temperatura, fornendo importanti linee guida per la coltivazione di questo frutto per lo sfruttamento commerciale.

La correlazione negativa tra kaempferolo e precipitazioni totali durante la stagione di fruttificazione I suggerisce che i livelli di kaempferolo tendano a diminuire quando la pianta di goji ha un buon approvvigionamento idrico. Questo potrebbe essere spiegato da uno studio di (Nakabayashi et al., 2014), dove è stata studiata l'alternanza di alcuni flavonoidi in serie temporali nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* sotto stress idrico. È stata trovata un'alternanza molto accentuata di 5 flavonoli (incluso il kaempferolo e suoi glicosidi) e 5 antociani, indicando che questi potrebbero agire per mitigare lo stress idrico.

In un lavoro di Yoon et al. (2017) è stato visto che l'aumento del contenuto di saccarosio negli spinaci dopo lo stress da freddo sembrava dipendere dalla sovraregolazione della via biosintetica del saccarosio che generalmente si verifica nelle piante durante lo sviluppo della tolleranza al congelamento. Infatti, essendo crioprotettivo, il saccarosio è la fonte di energia per la sintesi di proteine e lipidi specifici per la tolleranza allo stress da freddo nelle piante (Strand et al., 2003). Similmente, Hagen et al. (2009) hanno osservato un aumento dei livelli di saccarosio nelle foglie degli ortaggi che sono state sottoposte a

raccolta ritardata dopo lo stress da freddo. Nello studio di Steindal et al. (2015), il contenuto di saccarosio seguito dal fruttosio ha avuto l'aumento più alto, mentre l'aumento del contenuto di glucosio è stato solo minore prima e dopo l'acclimatazione al freddo. È quindi probabile che livelli più elevati di saccarosio e fruttosio siano legati alla tolleranza al gelo nelle verdure.

Anche l'analisi di correlazione tra AA e fattori ambientali ha dato dei risultati significativi. Nello specifico, come già evidenziato nel paragrafo 3.3.5 Fig. 20, PRO varia le sue concentrazioni in risposta a stress abiotici: ha infatti mostrato delle correlazioni altamente significative e negative con le temperature medie, facendo supporre che l'abbassamento di temperatura provoca un'induzione nella sintesi di tale composto, e positiva con le precipitazioni, indicando che una maggiore disponibilità d'acqua agisce sulla produzione del composto da parte della pianta, come suggerito nel già citato lavoro di Q. Yang et al. del 2020. Anche BABA sembra essere correlato allo stress termico, mostrando una correlazione inversa con la temperatura: all'abbassarsi delle temperature i suoi livelli crescono, come dimostrato anche dall'analisi ANOVA nel paragrafo 3.3.5. ORN ha mostrato una correlazione con positiva con le precipitazioni ( $R=0,426$ ), conforme con l'analisi ANOVA del paragrafo 3.3.5, che riporta una differenza significativa tra l'anno 2019 e l'anno 2020, durante il quale le precipitazioni sono state sempre molto scarse, soprattutto nei mesi di fruttificazione (Kalamaki et al., 2009).

## 5. Conclusioni

### 5.1. Analisi morfologica

La specie *Lycium barbarum* presenta caratteristiche molto variabili, anche all'interno di una stessa popolazione.

Le analisi effettuate hanno permesso di ottenere delle informazioni molto importanti:

- Le piante presentano principalmente tre tipi di portamento (eretto, espanso e pendulo) uniformemente distribuite all'interno della popolazione;
- La maggior parte delle piante ha vigoria da media a molto elevata, denotando un buon adattamento all'ambiente in cui vivono;
- La maggior parte delle piante presenta la capacità di riprodursi tramite polloni;
- La dimensione delle foglie era molto variabile e la forma poteva essere ricondotta a tre forme principali, cioè lanceolata, ovato-lanceolata e ovata. La forma ovata è risultata essere quella più rara;
- I fiori derivano da gemma mista e sono quasi sempre raggruppati, con corolla viola a cinque petali. Talvolta si possono ritrovare dei fiori anomali con sei petali. Al numero dei petali corrisponde sempre il numero degli stami;
- I frutti maturano nell'arco di circa 11,5 giorni, in cui si susseguono 4 principali stadi di maturazione;
- Il numero dei semi nei frutti è molto variabile e sembra essere un carattere dipendente da fattori esterni;
- La forma del frutto si mantiene invece costante di anno in anno e aiuta in modo più immediato a discriminare le piante; le forme di frutto rilevate sono state quattro (ovale, fondo piatto, rotondo, a peperoncino). Le piante in forte stress sono però difficili da caratterizzare poiché la forma del frutto è individuabile solo allo stadio S4 (maturazione completa).
- Con la forma del frutto sono stati creati quattro cluster di piante, che sono stati campionati in stagioni di fruttificazione successive per la caratterizzazione nutraceutica.

### 5.2. Analisi molecolare

L'analisi molecolare con marcatori SSR non ha individuato differenze tra le piante coltivate nella piantagione oggetto di studio, le quali però sono geneticamente diverse sia dalle accessioni della specie *L. barbarum* sia di quella *L. chinense*, provenienti da vari Orti Botanici europei.

Le informazioni ottenute più importanti sono state:

- Le accessioni delle due specie note non sono risultate diverse tra loro, facendo supporre che derivino da una stessa popolazione ancestrale; infatti, il loro genoma deriva per la maggior parte da un unico cluster;
- Le piante oggetto di studio costituiscono una popolazione a sé stante, derivante da due popolazioni ancestrali diverse. Una delle accessioni (quella proveniente dall'Orto Botanico di Mainz) appartiene probabilmente alla stessa cultivar o landrace, poiché condivide con la popolazione del campo quasi l'80 del genoma;
- I morfotipi individuati tramite analisi morfologica non si differenziano da un punto di vista genetico, e quindi non possono essere riconducibili a varietà diverse.

### 5.3. Analisi nutraceutica

I valori riscontrati in questo lavoro di tesi in generale sono in linea con quelli di altri lavori effettuati su questa specie in campo europeo. Questo vale sia per i risultati colorimetrici sia per quelli di specifici composti analizzati con HPLC.

I vari morfotipi non hanno evidenziato sostanziali differenze tra loro, facendo supporre che essi siano appartenenti ad una stessa *cultivar* e che la differenza di forma del frutto non influenzi le caratteristiche nutraceutiche.

Anni diversi hanno invece portato a differenze significative, facendo supporre che i fattori climatici siano determinanti per queste caratteristiche. In particolare, sono state registrate differenze significative per i valori di TPC, TFC e FRAP, rutina, kaempferolo, valina e ornitina: l'anno 2019 è sempre quello in cui sono stati registrati i valori più elevati e tendenzialmente è stato l'anno più caldo, ma anche il più piovoso.

Anche la stagione di fruttificazione e il suo andamento climatico sembra che influenzi in maniera determinante la presenza e la concentrazione di alcuni metaboliti. Ciò è risultato importante per capire quando i frutti raggiungono le migliori proprietà nutraceutiche. Le differenze sono state riscontrate per: TPC, TFC e FRAP, zeaxantina, pectine, prolina e BABA. In particolare:

- TFC e FRAP sono risultati più elevati in luglio, nel pieno della stagione di fruttificazione, facendo supporre che le temperature più elevate tendano ad aumentare il potenziale antiossidante totale e il contenuto di flavonoidi totali;
- TPC è più elevato nel mese di settembre, quando le temperature si abbassano e la piovosità aumenta;
- La zeaxantina è più elevata nel mese di settembre, subito dopo la parte più calda della stagione di fruttificazione e con un fotoperiodo progressivamente inferiore. Essa aiuta la pianta a

rispondere allo stress luminoso proteggendo il sistema fotosintetico. I risultati ci confermano che i frutti di goji sono una buona fonte di questo carotenoide, essenziale per la protezione della macula della retina dalla degenerazione e ci fa supporre anche che, sottoponendo la pianta a stress luminoso in ambiente controllato, si possano ottenere dei frutti adatti all'utilizzo in preparati farmaceutici a base di questo carotenoide.

- La prolina è l'aminoacido più concentrato in questi frutti, come confermato anche in letteratura. Essa viene sovrapprodotta quando la pianta è ben irrigata e quindi i suoi valori massimi vengono raggiunti nei mesi finali della stagione di fruttificazione, che è anche quella più fresca, soprattutto nelle ore notturne.

#### **5.4. Conclusioni generali**

Le analisi morfologiche e genetiche hanno evidenziato che le accessioni oggetto di studio presentavano una grande variabilità intraspecifica. Ciò non ha reso possibile un'attribuzione a specifiche cultivar o landrace, di cui non si hanno delle informazioni specifiche e dettagliate in letteratura.

Le analisi biochimiche hanno evidenziato non solo che anche il goji prodotto in Italia è ricco di sostanze benefiche, ma anche che è possibile ottenere frutti con un potenziale nutraceutico maggiore sia utilizzando coltivazioni sperimentali che permettano stress controllati, sia anche migliorando le tecniche di coltivazione nelle aziende agricole private.

In conclusione, tutte queste informazioni potrebbero essere utilizzate in futuro insieme alla lista dei descrittori e al set di marcatori SSR per caratterizzare le accessioni coltivate in Italia e ottenere indicazioni sulla loro origine. Grazie a questo potrebbero essere progettati programmi di breeding e conservazione e avviare filiere per la tracciabilità e l'utilizzo sostenibile delle risorse derivanti da queste piante.

## Bibliografia

- Ahn, M., Park, J. S., Chae, S., Kim, S., Moon, C., Hyun, J. W., & Shin, T. (2014). Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* Miller fruit and its constituent betaine in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in rats. *Acta Histochemica*, 116(6), 1104–1112.
- Alfaro, S., Mutis, A., Palma, R., Quiroz, A., Seguel, I., & Scheuermann, E. (2013). Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) fruit. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 67–78.
- Amagase, H., & Farnsworth, N. R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44(7), 1702–1717.
- An, W., Li, Y., Jiao, S., & Wang, J. (1998). Selection of a seedless triploid gojiberry cultivar. *Journal of Ningxia Agricultural College*, 19, 41–44.
- Andersson, S. C., Olsson, M. E., Johansson, E., & Rumpunen, K. (2009). Carotenoids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries during ripening and use of pheophytin a as a maturity marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 250–258.
- Asins, M. (2002). Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding*, 121(4), 281–291.
- Bae, H., Yun, S. K., Yoon, I. K., Nam, E. Y., Kwon, J. H., & Jun, J. H. (2014). Assessment of organic acid and sugar composition in apricot, plumcot, plum, and peach during fruit development. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87.
- Barba, A. O., Hurtado, M. C., Mata, M. S., Ruiz, V. F., & De Tejada, M. L. S. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2), 328–336.
- Basson, C. E., Groenewald, J.-H., Kossmann, J., Cronjé, C., & Bauer, R. (2010). Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chemistry*, 121(4), 1156–1162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.064>
- Belkhir, K. (1999). GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. [Http://Www.Univmontp2.Fr/~Genetix](http://Www.Univmontp2.Fr/~Genetix).
- Bellini, E., Giordani, E., Giannelli, G., & Picardi, E. (2007). *Le specie legnose. Liste dei caratteri descrittivi* (ARSIA, Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione del settore Agricolo-forestale).

- Benchenouf, A., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Kokkalou, E. (2017). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (Goji) cultivated in Greece. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 596–602.
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 15–27). Elsevier.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bertoldi, D., Cossignani, L., Blasi, F., Perini, M., Barbero, A., Pianezze, S., & Montesano, D. (2019). Characterisation and geographical traceability of Italian goji berries. *Food Chemistry*, 275, 585–593.
- Bolling, B. W., Dolnikowski, G., Blumberg, J. B., & Chen, C.-Y. O. (2010). Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry*, 122(3), 819–825.
- Breseghele, F., & Coelho, A. S. G. (2013). Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8277–8286.
- Bucheli, P., Vidal, K., Shen, L., Gu, Z., Zhang, C., Miller, L. E., & Wang, J. (2011). Goji berry effects on macular characteristics and plasma antioxidant levels. *Optometry and Vision Science*, 88(2), 257–262.
- Carvalho, A., Lima-Brito, J., Maçãs, B., & Guedes-Pinto, H. (2009). Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. *Biochemical Genetics*, 47(3), 276–294.
- Ceccarini, M., Vannini, S., Cataldi, S., Moretti, M., Villarini, M., Fioretti, B., Albi, E., Beccari, T., & Codini, M. (2016). In vitro protective effects of *Lycium barbarum* berries cultivated in Umbria (Italy) on human hepatocellular carcinoma cells. *BioMed Research International*, 2016.
- Chang, R. C.-C., & So, K.-F. (2015). *Lycium barbarum and human health*. Springer.
- Chauhan, B., Kumar, G., Kalam, N., & Ansari, S. H. (2013). Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(1), 4.
- Chen, C., Xu, M., Wang, C., Qiao, G., Wang, W., Tan, Z., Wu, T., & Zhang, Z. (2017). Characterization of the *Lycium barbarum* fruit transcriptome and development of EST-SSR markers. *PloS One*, 12(11), e0187738.

- Chen, J., Chao, C. T., & Wei, X. (2018). Gojiberry breeding: Current status and future prospects. In *Breeding and Health Benefits of Fruit and Nut Crops*. IntechOpen.
- Chen, J.-R., Li, E.-Q., Dai, C.-Q., Yu, B., Wu, X.-L., Huang, C.-R., & Chen, X.-Y. (2012). The inducible effect of LBP on maturation of dendritic cells and the related immune signaling pathways in hepatocellular carcinoma (HCC). *Current Drug Delivery*, 9(4), 414–420.
- Cheng, C. Y., Chung, W. Y., Szeto, Y. T., & Benzie, I. F. (2005). Fasting plasma zeaxanthin response to *Fructus barbarum* L.(wolfberry; Kei Tze) in a food-based human supplementation trial. *British Journal of Nutrition*, 93(1), 123–130.
- Cheng, J., Zhou, Z.-W., Sheng, H.-P., He, L.-J., Fan, X.-W., He, Z.-X., Sun, T., Zhang, X., Zhao, R. J., & Gu, L. (2015). An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 33.
- Choi, S. H., Kim, D.-S., Kozukue, N., Kim, H.-J., Nishitani, Y., Mizuno, M., Levin, C. E., & Friedman, M. (2014). Protein, free amino acid, phenolic,  $\beta$ -carotene, and lycopene content, and antioxidative and cancer cell inhibitory effects of 12 greenhouse-grown commercial cherry tomato varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(2), 115–127.
- Choi, S.-H., Ahn, J.-B., Kim, H.-J., Im, N.-K., Kozukue, N., Levin, C. E., & Friedman, M. (2012). Changes in free amino acid, protein, and flavonoid content in jujube (*Ziziphus jujube*) fruit during eight stages of growth and antioxidative and cancer cell inhibitory effects by extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), 10245–10255.
- Choudhary, A., Kumar, A., Kaur, H., Balamurugan, A., Padhy, A. K., & Mehta, S. (2021). Plant Performance and Defensive Role of  $\beta$ -Amino Butyric Acid Under Environmental Stress. In *Plant Performance Under Environmental Stress* (pp. 249–275). Springer.
- Chu, P. H., Li, H.-Y., Chin, M.-P., So, K., & Chan, H. H. (2013). Effect of *lycium barbarum* (wolfberry) polysaccharides on preserving retinal function after partial optic nerve transection. *PLoS One*, 8(12), e81339.
- Chung, J.-W., Lee, G.-A., Lee, S.-S., Bang, K.-H., Park, C.-B., & Park, Y.-J. (2009). Cultivar discrimination of Korean and Chinese Boxthorn (*Lycium chinense* Mill. And *Lycium barbarum* L.) using SSR markers. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 17(6), 445–451.
- Commisso, M., Toffali, K., Strazzer, P., Stocchero, M., Ceoldo, S., Baldan, B., Levi, M., & Guzzo, F. (2016). Impact of phenylpropanoid compounds on heat stress tolerance in carrot cell cultures. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1439.



- Connor, A. M., Luby, J. J., Tong, C. B., Finn, C. E., & Hancock, J. F. (2002). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(1), 89–97.
- Correia, S., Gonçalves, B., Aires, A., Silva, A., Ferreira, L., Carvalho, R., Fernandes, H., Freitas, C., Carnide, V., & Paula Silva, A. (2016). Effect of harvest year and altitude on nutritional and biometric characteristics of blueberry cultivars. *Journal of Chemistry*, 2016.
- Csepregi, K., Neugart, S., Schreiner, M., & Hideg, É. (2016). Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules*, 21(2), 208.
- Cui, B., Chen, Y., Liu, S., Wang, J., Li, S., Wang, Q., Li, S., Chen, M., & Lin, X. (2012). Antitumour activity of *Lycium chinensis* polysaccharides in liver cancer rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(3), 314–318.
- Cupic, T., Josipovic, M., Viljevac, M., Sudar, R., & Dugalic, K. (2018). *Sorbitol and sugar composition in plum fruits influenced by climatic conditions*.
- de Abreu, I. N., & Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 241–248.
- de Oliveira, E. J., Dias, N. L. P., & Dantas, J. L. L. (2012). Selection of morpho-agronomic descriptors for characterization of papaya cultivars. *Euphytica*, 185(2), 253–265.
- Dhar, P., Tayade, A., Ballabh, B., Chaurasia, O., Bhatt, R., & Srivastava, R. (2011). *Lycium ruthenicum* Murray: A less-explored but high-value medicinal plant from Trans-Himalayan cold deserts of Ladakh, India. *Plant Archives*, 11(2), 583–586.
- Di Maro, A., Dosi, R., Ferrara, L., Rocco, M., Sepe, J., Ferrari, G., & Parente, A. (2011). Free amino acid profile of *Malus domestica* Borkh cv. Annurca from the Campania Region and other Italian vegetables. *Australian Journal of Crop Science*, 5(2), 154–161.
- Donno, D., Beccaro, G. L., Mellano, M. G., Cerutti, A., & Bounous, G. (2015). Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of Functional Foods*, 18, 1070–1085.
- Doyle, J., & Doyle, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull*, 19(11), 11–15.
- Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., & Boras, M. (2007). The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry*, 102(3), 966–975.

- Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Elvira-Torales, L. I., García-Alonso, J., & Periago-Castón, M. J. (2019). Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review. *Antioxidants*, 8(7), 229.
- Endes, Z., Uslu, N., Özcan, M. M., & Er, F. (2015). Physico-chemical properties, fatty acid composition and mineral contents of goji berry (*Lycium barbarum* L.) fruit. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 21(1), 36–40.
- Esteban, R., Fleta-Soriano, E., Buezo, J., Míguez, F., Becerril, J. M., & García-Plazaola, J. I. (2014). Enhancement of zeaxanthin in two-steps by environmental stress induction in rocket and spinach. *Food Research International*, 65, 207–214.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.
- Fратиanni, A., Niro, S., Alam, M., Cinquanta, L., Di Matteo, M., Adiletta, G., & Panfili, G. (2018). Effect of a physical pre-treatment and drying on carotenoids of goji berries (*Lycium barbarum* L.). *LWT*, 92, 318–323.
- Fukuda, T., Yokoyama, J., & Ohashi, H. (2001). Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(2), 246–258.
- Galili, G., Amir, R., & Fernie, A. R. (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 153–178.
- Gong, H., Rehman, F., Yang, T., Li, Z., Zeng, S., Pan, L., Li, Y., & Wang, Y. (2019). Construction of the first high-density genetic map and QTL mapping for photosynthetic traits in *Lycium barbarum* L. *Molecular Breeding*, 39(7), 1–13.
- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2–3), 213–220.
- Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Solhaug, K. A., & Bengtsson, G. B. (2009). Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala*). *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 36–42.

- Hanover, L. M., & White, J. S. (1993). Manufacturing, composition, and applications of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(5), 724S-732S.
- He, M., Pan, H., Chang, R. C.-C., So, K.-F., Brecha, N. C., & Pu, M. (2014). Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage. *PloS One*, 9(1), e84800.
- Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., & Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73(4), R48-R65.
- Hwang, H., Kim, Y.-J., & Shin, Y. (2019). Influence of ripening stage and cultivar on physicochemical properties, sugar and organic acid profiles, and antioxidant compositions of strawberries. *Food Science and Biotechnology*, 28(6), 1659-1667.
- Ikram, M. M. M., Ridwani, S., Putri, S. P., & Fukusaki, E. (2020). GC-MS based metabolite profiling to monitor ripening-specific metabolites in pineapple (*Ananas comosus*). *Metabolites*, 10(4), 134.
- Ilić, T., Dodevska, M., Marčetić, M., Božić, D., Kodranov, I., & Vidović, B. (2020). Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial properties of goji berries cultivated in Serbia. *Foods*, 9(11), 1614.
- Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Métraux, J.-P., & Mauch-Mani, B. (2005). Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology*, 139(1), 267-274.
- Jiang, Y., Cao, J., Dong, Q., & Wang, S. (2007). Anti-atherosclerosis potency by Lycium seed oil and its possible mechanism of PKC and MMPs. *WEST CHINA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 22(1), 9.
- Jisha, K. C., & Puthur, J. T. (2016). Seed priming with beta-amino butyric acid improves abiotic stress tolerance in rice seedlings. *Rice Science*, 23(5), 242-254.
- Kafkaletou, M., Christopoulos, M., Tsaniklidis, G., Papadakis, I., Ioannou, D., Tzoutzoukou, C., & Tsantili, E. (2018). Nutritional value and consumer-perceived quality of fresh goji berries (*Lycium barbarum* L. and *L. chinense* L.) from plants cultivated in Southern Europe. *Fruits*, 73(1).
- Kafkas, E., Koşar, M., Paydaş, S., Kafkas, S., & Başer, K. (2007). Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. *Food Chemistry*, 100(3), 1229-1236.
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 732-736.

- Kalamaki, M. S., Merkouropoulos, G., & Kanellis, A. K. (2009). Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? *Plant Signaling & Behavior*, 4(11), 1099–1101.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309–334.
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical—Definition and introduction. *AAPS Journal PharmSci*, 5(3), 1–2.
- Kevers, C., Pincemail, J., Tabart, J., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2011). Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6165–6171.
- Kim, D.-H., Song, M.-J., Bae, E.-A., & Han, M. J. (2000). Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(3), 356–358.
- Kim, N.-H., & Baek, S.-H. (2014). Effects of *Lycium chinense* Miller fruit and its constituent betaine on immunomodulation in Balb/c mice. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 33(3), 189–193.
- Kulczyński, B., & Gramza-Michałowska, A. (2016). Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(2), 67–76.
- Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B., Gupta, A. P., & Kaul, V. K. (2008). Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers of rose species. *Journal of Separation Science*, 31(2), 262–267.
- Kusolwa, P., Makwinja, F., Jackson, N., Marianna, M., & Kibola, A. (2019). Morphological diversity of wild coffee (*Coffea kihansiensis*) a potential coffee species for genetic improvement. *Tanzania Journal of Science*, 45(4), 629–649.
- Kwon, S.-J., Lee, G.-A., Lee, S.-Y., Park, Y.-J., Gwag, J.-G., Kim, T.-S., & Ma, K.-H. (2009). Isolation and characterization of 21 microsatellite loci in *Lycium chinense* and cross-amplification in *Lycium barbarum*. *Conservation Genetics*, 10(5), 1557.
- Landhäusser, S. M., & Lieffers, V. J. (2001). Photosynthesis and carbon allocation of six boreal tree species grown in understory and open conditions. *Tree Physiology*, 21(4), 243–250.
- Le, K., Chiu, F., & Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105(1), 353–363.
- Lee, D. G., Jung, H. J., & Woo, E.-R. (2005). Antimicrobial property of (+)-lyoniresinol-3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-Glucopyranoside isolated from the root bark of *Lycium chinense* Miller against human pathogenic microorganisms. *Archives of Pharmacal Research*, 28(9), 1031–1036.
- Lee, S.-R., Choi, J.-E., Lee, B.-Y., Yu, J.-N., & Lim, C. E. (2018). Genetic diversity and structure of an endangered medicinal herb: Implications for conservation. *AoB Plants*, 10(2), ply021.

- Li, S., Liu, N., Lin, L., Sun, E.-D., Li, J.-D., & Li, P.-K. (2018). Macular pigment and serum zeaxanthin levels with Goji berry supplement in early age-related macular degeneration. *International Journal of Ophthalmology*, 11(6), 970.
- Li, X., Holt, R. R., Keen, C. L., Morse, L. S., Yiu, G., & Hackman, R. M. (2021). Goji Berry Intake Increases Macular Pigment Optical Density in Healthy Adults: A Randomized Pilot Trial. *Nutrients*, 13(12), 4409.
- Liang, G., & Zhang, C. (2007). Experimental research on the skin aging function of Lycium barbarum polysaccharides. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 6, 734–736.
- Liu, P., Kallio, H., Lu, D., Zhou, C., Ou, S., & Yang, B. (2010). Acids, sugars, and sugar alcohols in Chinese hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1012–1019.
- Liu, X., Du, J., Khan, M., Cheng, J., Wei, C., Mei, Z., Chen, H., He, T., & Fu, J. (2020). Analysis of genetic diversity and similarities between different Lycium varieties based on ISSR analysis and RAMP-PCR markers. *World Academy of Sciences Journal*, 2(2), 83–90.
- Llorent-Martínez, E., Fernández-de Córdova, M., Ortega-Barrales, P., & Ruiz-Medina, A. (2013). Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. *Microchemical Journal*, 110, 444–451.
- Lu, Y., Guo, S., Zhang, F., Yan, H., Qian, D., Shang, E., Wang, H., & Duan, J. (2021). Nutritional components characterization of Goji berries from different regions in China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 113859.
- Lu, Y., Guo, S., Zhang, F., Yan, H., Qian, D.-W., Wang, H.-Q., Jin, L., & Duan, J.-A. (2019). Comparison of functional components and antioxidant activity of Lycium barbarum L. fruits from different regions in China. *Molecules*, 24(12), 2228.
- Luo, Q., Cai, Y., Yan, J., Sun, M., & Corke, H. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from Lycium barbarum. *Life Sciences*, 76(2), 137–149.
- Luo, Q., Li, J., Cui, X., Yan, J., Zhao, Q., & Xiang, C. (2014). The effect of Lycium barbarum polysaccharides on the male rats' reproductive system and spermatogenic cell apoptosis exposed to low-dose ionizing irradiation. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(1), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.013>
- Ma, Z. F., Zhang, H., Teh, S. S., Wang, C. W., Zhang, Y., Hayford, F., Wang, L., Ma, T., Dong, Z., & Zhang, Y. (2019). Goji berries as a potential natural antioxidant medicine: An insight into their molecular mechanisms of action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

- Marinova, D., & Ribarova, F. (2007). HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 370–374.
- Mehrnia, M., Zarre, S., & Sokhan-Sanj, A. (2005). Intra-and inter-specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(2), 149–158.
- Mi, X., Zhong, J., Chang, R. C.-C., & So, K.-F. (2013). Research advances on the usage of traditional Chinese medicine for neuroprotection in glaucoma. *Journal of Integrative Medicine*, 11(4), 233–240.
- Mi, X.-S., Chiu, K., Van, G., Leung, J. W. C., Lo, A. C. Y., Chung, S. K., Chang, R. C.-C., & So, K.-F. (2012). Effect of *Lycium barbarum* Polysaccharides on the expression of endothelin-1 and its receptors in an ocular hypertension model of rat glaucoma. *Neural Regeneration Research*, 7(9), 645.
- Mi, X.-S., Feng, Q., Lo, A. C. Y., Chang, R. C.-C., Lin, B., Chung, S. K., & So, K.-F. (2012). Protection of retinal ganglion cells and retinal vasculature by *Lycium barbarum* polysaccharides in a mouse model of acute ocular hypertension.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77(10), C1064–C1070.
- Ming, M., Guanhua, L., Zhanhai, Y., Guang, C., & Xuan, Z. (2009). Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. *Food Chemistry*, 113(4), 872–877.
- Mocan, A., Cairone, F., Locatelli, M., Cacciagrano, F., Carradori, S., Vodnar, D. C., Crișan, G., Simonetti, G., & Cesa, S. (2019a). Polyphenols from *Lycium barbarum* (Goji) fruit European cultivars at different maturation steps: Extraction, HPLC-DAD analyses, and biological evaluation. *Antioxidants*, 8(11), 562.
- Mocan, A., Cairone, F., Locatelli, M., Cacciagrano, F., Carradori, S., Vodnar, D. C., Crișan, G., Simonetti, G., & Cesa, S. (2019b). Polyphenols from *Lycium barbarum* (Goji) fruit European cultivars at different maturation steps: Extraction, HPLC-DAD analyses, and biological evaluation. *Antioxidants*, 8(11), 562.
- Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D. C., Bischin, C., Hanganu, D., Gheldiu, A.-M., Oprean, R., Silaghi-Dumitrescu, R., & Crișan, G. (2014). Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Leaves. *Molecules*, 19(7), 10056–10073.

- Mocan, A., Zengin, G., Simirgiotis, M., Schafberg, M., Mollica, A., Vodnar, D. C., Crişan, G., & Rohn, S. (2017). Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: Phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 153–168.
- Möllerová, J. (2005). Notes on invasive and expansive trees and shrubs. *Journal of Forest Science*, 51, 19–23.
- Montesano, D., Cossignani, L., Giua, L., Urbani, E., Simonetti, M., & Blasi, F. (2016). A simple HPLC-ELSD method for sugar analysis in goji berry. *Journal of Chemistry*, 2016.
- Mundell, T. L., Landhäusser, S. M., & Lieffers, V. J. (2007). Effects of *Corylus cornuta* stem density on root suckering and rooting depth of *Populus tremuloides*. *Botany*, 85(11), 1041–1045.
- Na, X., Ma, S., Ma, C., Liu, Z., Xu, P., Zhu, H., Liang, W., & Kardol, P. (2021). *Lycium barbarum* L. (goji berry) monocropping causes microbial diversity loss and induces *Fusarium* spp. Enrichment at distinct soil layers. *Applied Soil Ecology*, 168, 104107.
- Nakabayashi, R., Mori, T., & Saito, K. (2014). Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 9(8), e29518.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583–590.
- NI, Z., He, L., & Min, C. (2008). Changes of the main carotenoid pigment contents during the drying processes of the different harvest stage fruits of *Lycium barbarum* L. *Agricultural Sciences in China*, 7(3), 363–369.
- Niro, S., Fratianni, A., Panfili, G., Falasca, L., Cinquanta, L., & Alam, M. R. (2017). Nutritional evaluation of fresh and dried goji berries cultivated in Italy. *Italian Journal of Food Science*, 29(3).
- Okatan, V. (2020). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated berry species: A comparative study. *Folia Horticulturae*, 32(1), 79–85.
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., & Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, 57(4), 1159–1181.
- Pavan, B., Capuzzo, A., & Forlani, G. (2014). High glucose-induced barrier impairment of human retinal pigment epithelium is ameliorated by treatment with Goji berry extracts through modulation of cAMP levels. *Experimental Eye Research*, 120, 50–54.
- Pei, L., Li, J., Xu, Z., Chen, N., Wu, X., & Chen, J. (2020). Effect of high hydrostatic pressure on aroma components, amino acids, and fatty acids of Hami melon (*Cucumis melo* L. var. *Reticulatus* naud.) juice. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1394–1405.

- Peng, Y., Ma, C., Li, Y., Leung, K. S.-Y., Jiang, Z.-H., & Zhao, Z. (2005). Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in Lycium fruits (Fructus Lycii). *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(4), 161–164.
- Pesis, E. (2005). The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 1–19.
- Polat, M., Mertoglu, K., Eskimez, I., & Okatan, V. (2020). Effects of the fruiting period and growing seasons on market quality in goji berry (*Lycium barbarum* L.). *Folia Horticulturae*, 32(2), 1–11.
- Potterat, O. (2010). Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Medica*, 76(01), 7–19.
- Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215–222.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Protti, M., Gualandi, I., Mandrioli, R., Zappoli, S., Tonelli, D., & Mercolini, L. (2017). Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of goji (*Lycium* spp.) berries. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 252–260.
- Qian, D., Zhao, Y., Yang, G., & Huang, L. (2017). Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules*, 22(6), 911.
- Qian, L., & Yu, S. (2016). Protective effect of polysaccharides from *Lycium barbarum* on spermatogenesis of mice with impaired reproduction system induced by cyclophosphamide. *American Journal of Reproductive Immunology*, 76(5), 383–385.
- Raven, P. H., & Axelrod, D. I. (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61(3), 539–673.
- Reddivari, L., Hale, A. L., & Miller Jr, J. C. (2007). Genotype, location, and year influence antioxidant activity, carotenoid content, phenolic content, and composition in specialty potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8073–8079.
- Reeve, V. E., Allanson, M., Arun, S. J., Domanski, D., & Painter, N. (2010). Mice drinking goji berry juice (*Lycium barbarum*) are protected from UV radiation-induced skin damage via antioxidant pathways. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(4), 601–607.



- Rodríguez-Medina, N., Fermin, G., Valdés-Infante, J., Velásquez, B., Rivero, D., Martínez, F., Rodríguez, J., & Rohde, W. (2010). Illustrated descriptors for guava (*Psidium guajava*). *Acta Horticulturae*, 849, 103–110.
- Ruffo, M., Parisi, O. I., Amone, F., Malivindi, R., Gorgoglione, D., De Biasio, F., Scrivano, L., Pezzi, V., & Puoci, F. (2017). Calabrian goji vs. Chinese goji: A comparative study on biological properties. *Foods*, 6(4), 30.
- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, 76, 735–750.
- Sánchez-Rodríguez, E., Moreno, D. A., Ferreres, F., del Mar Rubio-Wilhelmi, M., & Ruiz, J. M. (2011). Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry*, 72(8), 723–729.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233–234.
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452.
- Shi, G.-J., Zheng, J., Han, X.-X., Jiang, Y.-P., Li, Z.-M., Wu, J., Chang, Q., Niu, Y., Sun, T., & Li, Y.-X. (2018). *Lycium barbarum* polysaccharide attenuates diabetic testicular dysfunction via inhibition of the PI3K/Akt pathway-mediated abnormal autophagy in male mice. *Cell and Tissue Research*, 374(3), 653–666.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Skenderidis, P., Kerasioti, E., Karkanta, E., Stagos, D., Kouretas, D., Petrotos, K., Hadjichristodoulou, C., & Tsakalof, A. (2018). Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation. *Toxicology Reports*, 5, 251–257.

- Skenderidis, P., Lampakis, D., Giavasis, I., Leontopoulos, S., Petrotos, K., Hadjichristodoulou, C., & Tsakalof, A. (2019). Chemical properties, fatty-acid composition, and antioxidant activity of goji berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) fruits. *Antioxidants*, 8(3), 60.
- Smirnova, L., & Pervykh, L. (1999). Quantitative determination of the total content of flavonoids in a cholagogic species. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(3), 151–154.
- Song, J., Bi, J., Chen, Q., Wu, X., Lyu, Y., & Meng, X. (2019). Assessment of sugar content, fatty acids, free amino acids, and volatile profiles in jujube fruits at different ripening stages. *Food Chemistry*, 270, 344–352.
- Song, M., Roufogalis, B. D., & Huang, T. H.-W. (2012). Reversal of the caspase-dependent apoptotic cytotoxicity pathway by taurine from *Lycium barbarum* (Goji Berry) in human retinal pigment epithelial cells: Potential benefit in diabetic retinopathy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Spano, M., Maccelli, A., Di Matteo, G., Ingallina, C., Biava, M., Crestoni, M. E., Bardaud, J.-X., Giusti, A. M., Mariano, A., & Scotto D'Abusco, A. (2021). Metabolomic Profiling of Fresh Goji (*Lycium barbarum* L.) Berries from Two Cultivars Grown in Central Italy: A Multi-Methodological Approach. *Molecules*, 26(17), 5412.
- Steindal, A. L. H., Rødven, R., Hansen, E., & Mølmann, J. (2015). Effects of photoperiod, growth temperature and cold acclimatisation on glucosinolates, sugars and fatty acids in kale. *Food Chemistry*, 174, 44–51.
- Strand, Å., Foyer, C., Gustafsson, P., Gardeström, P., & Hurry, V. (2003). Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 26(4), 523–535.
- Sun, Y.-F., Liang, Z.-S., Shan, C.-J., Viernstein, H., & Unger, F. (2011). Comprehensive evaluation of natural antioxidants and antioxidant potentials in *Ziziphus jujuba* Mill. Var. *Spinosa* (Bunge) Hu ex HF Chou fruits based on geographical origin by TOPSIS method. *Food Chemistry*, 124(4), 1612–1619.
- Tang, W.-M., Chan, E., Kwok, C.-Y., Lee, Y.-K., Wu, J.-H., Wan, C.-W., Chan, R. Y.-K., Yu, P. H.-F., & Chan, S.-W. (2012). A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. *Inflammopharmacology*, 20(6), 307–314.
- Tharachand, C., Selvaraj, C. I., & Mythili, M. (2012). Molecular markers in characterization of medicinal plants: An overview. *Research in Plant Biology*, 2(2), 1–12.

- Tokuşoğlu, Ö., Ünal, M., & Yıldırım, Z. (2003). HPLC-UV and GC-MS characterization of the flavonol aglycons quercetin, kaempferol, and myricetin in tomato pastes and other tomato-based products. *Acta Chromatogr*, *13*, 196–207.
- Tripodo, G., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Gilbert-López, B., & Fanali, C. (2018). Optimization of pressurized liquid extraction by response surface methodology of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) phenolic bioactive compounds. *Electrophoresis*, *39*(13), 1673–1682.
- Trovato, M., Forlani, G., Signorelli, S., & Funck, D. (2019). Proline metabolism and its functions in development and stress tolerance. In *Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants* (pp. 41–72). Springer.
- Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Tröst, K., Junttila, O., Häggman, H., & Martinussen, I. (2012). Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(42), 10406–10414.
- van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., & Jongen, W. M. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(8), 3606–3613.
- Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, *23*(1), 48–55.
- Wagner, H., Bauer, R., Melchart, D., Xiao, P.-G., & Staudinger, A. (2011). Cortex *Lycii radices* Digupi. In *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines* (pp. 509–519). Springer.
- Wakeling, J., & Bond, W. (2007). Disturbance and the frequency of root suckering in an invasive savanna shrub, *Dichrostachys cinerea*. *African Journal of Range and Forage Science*, *24*(2), 73–76.
- Wang, C., Chang, S., Inbaraj, B. S., & Chen, B. (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, *120*(1), 184–192.
- Wang, J., Chao, J., & Huang, Z. (2005). Preliminary study of interspecific crosses between gojiberry and tomato. *Journal of Ningxia Agriculture and Technology*, *3*, 8–9.
- Wang, T., Li, Y., Wang, Y., Zhou, R., Ma, L., Hao, Y., Jin, S., Du, J., Zhao, C., & Sun, T. (2014). *Lycium barbarum* polysaccharide prevents focal cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice. *PLoS One*, *9*(3), e90780.

- Wang, Y., Ma, Q., Li, Y., Sun, T., Jin, H., Zhao, C., Milne, E., Easter, M., Paustian, K., & Yong, H. W. A. (2019). Energy consumption, carbon emissions and global warming potential of wolfberry production in Jingtai Oasis, Gansu Province, China. *Environmental Management*, 64(6), 772–782.
- Weir, B. (n.d.). Et Cockerham, CC,(1984). *Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. Evolution*, 38, 1358–1370.
- Wu, M., & Guo, L. (2015). *Anti-fatigue and anti-hypoxic effects of Lycium barbarum polysaccharides*. 686–689.
- Xiao, J., Liong, E. C., Ching, Y. P., Chang, R. C. C., So, K. F., Fung, M. L., & Tipoe, G. L. (2012). Lycium barbarum polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 462–470.
- Xin, T., Yao, H., Gao, H., Zhou, X., Ma, X., Xu, C., Chen, J., Han, J., Pang, X., & Xu, R. (2013). Super food Lycium barbarum (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode. *Food Research International*, 54(2), 1699–1704.
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yang, Q., Zhao, D., & Liu, Q. (2020). Connections between amino acid metabolisms in plants: Lysine as an example. *Frontiers in Plant Science*, 11, 928.
- Yang, T., Huang, J., Li, Z., Wu, D., & Wang, Y. (2022). *Germplasm Resources and Strategy for Genetic Breeding of Lycium Species: A Review*.
- Yao, R., Heinrich, M., & Weckerle, C. S. (2018). The genus Lycium as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 50–66.
- Ye, Z., Huang, Q., Ni, H. X., & Wang, D. (2008). Cortex Lycii Radicis extracts improve insulin resistance and lipid metabolism in obese-diabetic rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(12), 1665–1670.
- Yoon, Y.-E., Kuppasamy, S., Cho, K. M., Kim, P. J., Kwack, Y.-B., & Lee, Y. B. (2017). Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry*, 215, 185–192.
- Zerbini, P., Giudetti, G., Rizzolo, A., & Grassi, M. (2001). Harvest and quality indexes of peach. *Informatore Agrario*, 57, 57–60.
- Zhang, D., Xia, T., Dang, S., Fan, G., & Wang, Z. (2018). Investigation of Chinese wolfberry (*Lycium* spp.) germplasm by restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq). *Biochemical Genetics*, 56(6), 575–585.

- Zhang, K. Y., Leung, H., Yeung, H., & Wong, R. N. (2001). Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA. *Planta Medica*, 67(04), 379–381.
- Zhang, Q., Chen, W., Zhao, J., & Xi, W. (2016). Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes. *Food Chemistry*, 200, 230–236.
- Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Kim, K. C., Kim, A. D., Chae, S., Park, J. S., Youn, U. J., & Hyun, J. W. (2010). Cytoprotective effect of the fruits of *Lycium chinense* Miller against oxidative stress-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 299–306.
- Zhang, X., Li, Y., Cheng, J., Liu, G., Qi, C., Zhou, W., & Zhang, Y. (2014). Immune activities comparison of polysaccharide and polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 441–445.
- Zhang, Y., Li, P., & Cheng, L. (2010). Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh. *Food Chemistry*, 123(4), 1013–1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.053>
- Zhao, J., Li, H., Xi, W., An, W., Niu, L., Cao, Y., Wang, H., Wang, Y., & Yin, Y. (2015). Changes in sugars and organic acids in wolfberry (*Lycium barbarum* L.) fruit during development and maturation. *Food Chemistry*, 173, 718–724.
- Zhao, J., Li, H., Xu, Y., Yin, Y., Huang, T., Zhang, B., Wang, Y., Li, Y., Cao, Y., & An, W. (2021). A consensus and saturated genetic map provides insight into genome anchoring, synteny of Solanaceae and leaf-and fruit-related QTLs in wolfberry (*Lycium* Linn.). *BMC Plant Biology*, 21(1), 1–13.
- Zhao, J., Xu, Y., Li, H., Yin, Y., An, W., Li, Y., Wang, Y., Fan, Y., Wan, R., & Guo, X. (2019). A SNP-based high-density genetic map of leaf and fruit related quantitative trait loci in wolfberry (*Lycium* Linn.). *Frontiers in Plant Science*, 977.
- Zhao, W.-G., Chung, J.-W., Cho, Y.-I., Rha, W.-H., Lee, G.-A., Ma, K.-H., Han, S.-H., Bang, K.-H., Park, C.-B., & Kim, S.-M. (2010). Molecular genetic diversity and population structure in *Lycium* accessions using SSR markers. *Comptes Rendus Biologies*, 333(11–12), 793–800.
- Zheng, G.-Q., Zheng, Z.-Y., Xu, X., & Hu, Z.-H. (2010). Variation in fruit sugar composition of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Of different regions and varieties. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(3), 275–284.
- Zhou, C., Zhao, D., Sheng, Y., Tao, J., & Yang, Y. (2011). Carotenoids in fruits of different persimmon cultivars. *Molecules*, 16(1), 624–636.

- Zhou, Y., Lai, Y., Chen, Z., Qu, H., Ma, S., Wang, Y., & Jiang, Y. (2020). Evolution of physiological characteristics and nutritional quality in fresh goji berry (*Lycium barbarum*) stored under different temperatures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14835.
- Zimmerli, L., Hou, B., Tsai, C., Jakab, G., Mauch-Mani, B., & Somerville, S. (2008). The xenobiotic  $\beta$ -aminobutyric acid enhances *Arabidopsis* thermotolerance. *The Plant Journal*, 53(1), 144–156.
- Zorenc, Z., Veberic, R., Stampar, F., Koron, D., & Mikulic-Petkovsek, M. (2016). Changes in berry quality of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during the harvest season. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(6), 855–864.