

# **RELAZIONE COORDINATA CONCLUSIVA**

## **Progetto misura 124 PSR 2007-2013 della Regione Toscana**

### **TITOLO DEL PIF**

VALORIZZAZIONE DELLA FILIERA CEREALICOLA TOSCANA FINALIZZATA ALLA PRODUZIONE DI SFARINATI PER PANIFICAZIONE E PASTA FRESCA TRADIZIONALE REGIONALE.

### **ACRONIMO DEL PROGETTO MISURA 124**

QUANTICA (QUALità ANTICA)

### **TITOLO DEL PROGETTO MISURA 124**

Pane da antiche varietà di frumento per la valorizzazione della filiera e il miglioramento della salute.

# INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Premessa</b> .....                         | <b>3</b>  |
| <b>Partnarnariato</b> .....                   | <b>3</b>  |
| <b>Durata, fasi ed azioni</b> .....           | <b>4</b>  |
| <b>Costi</b> .....                            | <b>6</b>  |
| <b>Innovazioni oggetto del progetto</b> ..... | <b>6</b>  |
| <b>Metodologia</b> .....                      | <b>8</b>  |
| <b>Risultati conseguiti</b> .....             | <b>13</b> |
| Verifica dati .....                           | 53        |

## Premessa

La presente Relazione Coordinata Conclusiva rappresenta una sintesi dei dati raccolti durante il processo di attuazione del Progetto QUANTICA “Pane da antiche varietà di frumento per la valorizzazione della filiera e il miglioramento della salute”

Le relazioni finali dei singoli Partner contengono informazioni in dettaglio e pertanto sono da considerarsi gli elementi primari di riferimento nella stesura della presente Relazione Conclusiva. Le relazioni conclusive di ogni Partner vengono inviate al Settore competente per opportuna condivisione.

## Partnernetario

Il Progetto è stato finalizzato nell’ambito del PSR 2007-2013 misura 124 “Cooperazione per lo sviluppo dei nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale” ed ha coinvolto i seguenti soggetti:

| <i>Denominazione del partner</i>  | <i>Codice PIF</i> | <i>Effettivo/ Associato</i> | <i>Ruolo nel progetto</i>   |
|---|-------------------|-----------------------------|---|
| <b>NEWCOPAN Srl</b>   | A1                | Effettivo                   | Soggetto capofila referente per: coordinamento, scelta delle aziende agricole e stipula dei contratti, realizzazione di prove di panificazione utilizzando le farine ottenute dalla coltivazione di frumento tenero da varietà antiche e messa a punto dell’impasto migliore.   |
| <b>Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento “Sant’Anna” di Pisa - SSSUP</b>                                | A.3               | Effettivo                   | Soggetto referente per il trasferimento di innovazione: introduzione di agrotecniche innovative e valutazione del trasferimento; valutazione delle caratteristiche tecnologiche delle farine e delle caratteristiche chimico-nutrizionali e di stabilità ossidativa dei pani; passaporto molecolare del pane; panel e consumer tests.   |
| <b>Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica – Università degli Studi di Firenze</b>                                     | A.4               | Effettivo                   | Soggetto referente per il trasferimento di innovazione: valutazione in vivo delle differenti varietà di cereali in relazione alla prevenzione delle malattie cardiovascolari e metaboliche.   |
| <b>Dipartimento di Scienze delle produzioni Agroalimentari e dell’ambiente Università degli Studi di Firenze – DISPAA (*)</b> | A.5               | Effettivo                   | Soggetto referente per il trasferimento di innovazione: Individuazione delle tecniche produttive e dei costi di produzione ad ettaro e a quintale di varietà moderne di frumento; elicitazione delle tecniche e dei costi di coltivazione delle varietà di frumento moderno e delle varietà antiche; analisi dei prezzi del frumento e dei prezzi dei principali fattori della produzione per la definizione del modello contrattuale di filiera. |

| <i>Denominazione del partner</i>   | <i>Codice PIF</i> | <i>Effettivo/ Associato</i> | <i>Ruolo nel progetto</i>  |
|--|-------------------|-----------------------------|--|
| <b>Centro Interdipartimentale di Ricerche Agro-Ambientali "E. Avanzi", Università di Pisa- CIRAA-UNIFI</b> | A.6               | Effettivo                   | Soggetto referente per il trasferimento di innovazione: allestimento di prove varietali parcellari con varietà antiche; caratterizzazione quanti-qualitativa; assistenza tecnica alle aziende agricole partecipanti al progetto. |
| <b>Azienda agricola Podere La Casetta di Rossi Stefania Montaione Fi</b>                                   | B.26              | Associato                   | Soggetto ospitante il trasferimento di innovazione: modello colturale biologico.   |
| <b>Azienda agricola Il Sapito srl soc. agricola Montaione Fi</b>   | A.27              | Associato                   | Soggetto ospitante il trasferimento di innovazione: modello colturale biologico.   |
| <b>Azienda agricola Crocetti Eligio Castelfiorentino Fi</b>  | A.8               | Effettivo                   | Soggetto ospitante il trasferimento di innovazione: modello colturale integrato.   |

(\*) DiPSA al momento della presentazione

## Durata, fasi ed azioni

Il Progetto Quantica è iniziato nel dicembre 2011 ed è terminato nell'ottobre 2014 usufruendo di varie proroghe concesse dalla Regione Toscana che hanno definito la scadenza ultima al 15.10.2014, per una durata complessiva di 34 mesi.

La durata delle singole azioni, con relative proroghe, è evincibile dai timesheet di riferimento presenti in singola DUA.

Nella tabella seguente sono sintetizzate le fasi/attività previste nel progetto (Tab. 1).

Tab. 1 Azioni e fasi progettuali previste

| <b>Fase progettuale</b> | <b>Azioni previste per le varie fasi progettuali</b>  | <b>Partner attuatore</b>         |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| <b>Fase 1</b>           | F1.1<br>Costituzione accordo di cooperazione.   | Newcopan                         |
|                         | F1.2<br>Programmazione di dettaglio delle attività di progetto e avvio delle attività di coordinamento  | Newcopan                         |
| <b>Fase 2</b>           | F2.1<br>Coordinamento Fase 2.   | Newcopan                         |
|                         | F2.2<br>Individuazione delle tecniche produttive e dei costi di produzione ad ettaro e a quintale di varietà moderne di frumento tenero in funzione delle differenti tipologie di produzione. | DISPAA– Università Firenze (*)   |
|                         | F2.3<br>Trasferimento di agrotecniche innovative nelle aziende agricole.  | SSSUP – Università Pisa          |
|                         | F2.4<br>Messa in opera delle agrotecniche innovative nell'azienda convenzionale Crocetti Eligio (due sistemi colturali).  | Azienda agricola Crocetti Eligio |
|                         | F2.5<br>Tests di collaudo volti a verificare il corretto trasferimento dell'innovazione di processo.  | SSSUP – Università Pisa          |
|                         | F2.6<br>Realizzazione di prove varietali e riproduzione di sementi di varietà antiche di frumento tenero  | CIRAA - Università Pisa          |

|               |   |                                |
|---------------|---|--------------------------------|
|               | F2.7<br>Assistenza tecnica all' azienda nell'attività F2.4  | CIRAA - Università Pisa        |
|               | F2.8<br>Arruolamento dei pazienti.  | DAC - Università Firenze       |
|               | F2.9<br>Ripetizione esami ematochimici e strumentali.   | DAC - Università Firenze       |
| <b>Fase 3</b> | F3.1<br>Coordinamento delle attività della fase 3.  | Newcopan                       |
|               | F3.2<br>Elicitazione delle tecniche e dei costi di coltivazione delle varietà di frumento tenero moderno e delle varietà antiche da effettuare presso testimoni privilegiati.   | DISPAA- Università Firenze (*) |
|               | F3.3<br>Analisi dei prezzi del frumento e dei prezzi dei principali fattori della produzione.   | DISPAA- Università Firenze (*) |
|               | F3.4<br>Test per la valutazione delle caratteristiche tecnologiche delle farine ottenute dalla coltivazione di frumento tenero da varietà antiche con il metodo di agricoltura integrata (AGRIQUALITA') e/o biologica; test per la valutazione delle caratteristiche chimico-nutrizionali e di stabilità ossidativa dei pani. | Newcopan                       |
|               | F3.5<br>Realizzazione di prove di panificazione utilizzando la farina e miscele di farina ottenute dalla granella delle varietà antiche selezionate, realizzazione di test sperimentali per la messa a punto dell'impasto migliore che riesce ad esaltare le caratteristiche tecnologiche delle farine.                       | Newcopan                       |
|               | F3.6<br>"Passaporto molecolare": caratterizzazione morfologica e molecolare della pasta acida e caratterizzazione molecolare delle farine.  | SSSUP - Università Pisa        |
|               | F3.7<br>Panel e consumer test per la valutazione della qualità organolettica del pane e delle preferenze dei consumatori  | SSSUP - Università Pisa        |
| <b>Fase 4</b> | F4.1<br>coordinamento delle attività della fase 4.  | Newcopan                       |
|               | F4.2<br>Raccolta dati anamnestici, clinico-strumentali, biochimici e stoccaggio materiali biologici per indagini successive .   | DAC - Università Firenze       |
|               | F4.3<br>Intervento terapeutico.   | DAC - Università Firenze       |
|               | F4.4<br>Profili di espressione genica e proteomica.   | DAC - Università Firenze       |
|               | F4.5.<br>Analisi statistica dei dati e sviluppo di modelli integrati di analisi da usare in prevenzione primaria e per percorsi terapeutico assistenziali in prevenzione secondaria.  | DAC - Università Firenze       |
|               | F4.6<br>Valutazione della trasferibilità nella pratica clinica.   | DAC - Università Firenze       |
|               | F4.7<br>Analisi dell'evoluzione dei prezzi e dei costi di frumento tenero come supporto alla definizione di un modello contrattuale di filiera.   | DISPAA- Università Firenze (*) |
| <b>Fase 5</b> | F5.1.<br>Predisposizione report finale.   | SSSUP - Università Pisa        |
|               | F5.2<br>Predisposizione e diffusione di materiale divulgativo/scientifico e organizzazione iniziative pubbliche.  | SSSUP - Università Pisa        |

(\*) DiPSA al momento della presentazione

Il progetto si è articolato in 5 fasi, con la realizzazione complessiva di 27 azioni specifiche.  
Di seguito sono riepilogate le 5 fasi progettuali:

**Fase 1:** costituzione dell'accordo di cooperazione e programmazione di dettaglio delle attività di progetto e avvio delle attività di coordinamento (2 azioni specifiche).

**Fase 2:** realizzazione dei test di collaudo per il trasferimento delle innovazioni di processo, messa in opera delle agrotecniche innovative, individuazione delle tecniche produttive e dei costi di produzione del frumento tenero e primo saggio sui pazienti alimentati con pane di frumento di varietà antiche (9 azioni specifiche)

**Fase 3:** realizzazione dei test di collaudo per il trasferimento delle innovazioni di prodotto, caratterizzazione tecnologica, molecolare e organolettica delle produzioni e analisi delle propensioni di acquisto dei consumatori e valutazione dei costi di coltivazione delle varietà di frumento tenero antiche (7 azioni specifiche).

**Fase 4:** acquisizione dei dati funzionali alle valutazioni cliniche successive a somministrazione dei pani prodotti, valutazioni preliminari sulla trasferibilità nella pratica clinica e definizione dei modelli contrattuali a supporto della filiera (7 azioni specifiche).

**Fase 5:** realizzazione dell'attività di divulgazione e la gestione della rete (2 azioni specifiche).

## Costi

I costi sostenuti hanno coperto sostanzialmente la cifra prevista, salvo una minor spesa, rispetto all'assegnato, di circa 22.200 € da parte del Capofila Newcopan.

Gli elementi di dettaglio sui costi sostenuti e la loro ripartizione sono presenti nelle singole DUA.

## Innovazioni oggetto del progetto

Le innovazioni che il progetto Quantica si pone sono in totale 7, suddivise in:

- **1 innovazione del Contesto Scientifico** in ambito nutraceutico/medico: *miglioramento dei parametri cardiovascolari su pazienti alimentati con pane prodotto da una varietà antica di frumento tenero;*
- **1 innovazione di Prodotto:** *pane ad elevato contenuto di acido folico;*
- **1 innovazione di Filiera:** *redazione di un contratto di filiera mediante trasferimento di conoscenze sui costi di produzione e sui possibili profili redditività/rischio di differenti ipotesi contrattuali;*
- **5 innovazioni di Processo**, di cui:
  - *coltivazione di 4 varietà antiche di frumento tenero ottimali da punto di vista nutraceutico*
  - *introduzione delle più moderne tecniche di coltivazione legate al metodo integrato e biologico*
  - *macinazione della granella con molini a pietra al fine di ottenere farine non raffinate, genuine e nutrienti grazie alla presenza del germe e della fibra grezza*
  - *fermentazione del pane utilizzando la lievitazione naturale con pasta madre in modo da ottenere un pane più nutriente e digeribile*
  - *caratterizzazione attraverso analisi molecolare sia della flora microbica contenuta nella pasta acida che delle varietà di frumento utilizzate per la produzione del pane*

**L'innovazione di prodotto** si è basata sui risultati di uno studio eseguito presso l'Università di Firenze e coordinato dal Dott. Sofi sul pane dell'antica varietà di grano Verna. Tali risultati hanno evidenziato un miglioramento significativo dei parametri cardiovascolari quali il colesterolo totale, il colesterolo LDL e l'acido folico intraeritrocitario dopo un periodo di intervento dietetico di 10 settimane con tale pane (Sofi *et al.*, 2010). Quanto ottenuto in tale ricerca, insieme al noto effetto riportato in letteratura dell'acido folico nei riguardi dell'incidenza di malattie cardiovascolari e/o tumorali, evidenzia l'opportunità di trasferire

l'utilizzo di varietà antiche di grano tenero ad alto contenuto di vitamine del gruppo B, tra cui l'acido folico, nella produzione di pane all'interno della filiera cerealicola toscana.

In linea con l'obiettivo generale di ottenere un pane con migliori proprietà nutraceutiche, determinate da un elevato contenuto di vitamine del gruppo B, vitamina B<sub>6</sub> e acido folico, attraverso le fasi progettuali 2, 3 e 4, si è inteso identificare e introdurre le innovazioni di processo e di prodotto atte a coniugare le esigenze nutrizionali con quelle agro-ambientali, paesaggistiche ed economiche.

Il **trasferimento di innovazione** ha presentato caratteristiche uniche in quanto non si è focalizzato esclusivamente sul prodotto finale, cioè il pane, ma sul potenziamento, standardizzazione e innovazione di diversi passaggi della filiera:

- 1. scelta di varietà idonee di frumento tenero:** coltivazione di almeno 4 varietà antiche ed almeno una "mixture" varietale di frumento tenero ottimali dal punto di vista nutraceutico;
- 2. tecnica colturale più adatta alle varietà scelte e maggiormente rispettosa dell'ambiente:** introduzione delle più moderne tecniche di coltivazione legate al metodo di agricoltura integrata (AGRIQUALITA') o biologica;
- 3. macinazione:** macinazione della granella con molini a pietra al fine di ottenere farine non raffinate, genuine e nutrienti grazie alla presenza del germe e della fibra grezza;
- 4. pasta madre:** fermentazione del pane utilizzando la lievitazione naturale con "pasta madre" (lievito naturale) in modo da ottenere un pane più nutriente e digeribile;
- 5. "passaporto molecolare":** caratterizzazione attraverso analisi molecolare sia della flora microbica contenuta nella pasta acida, che delle varietà di frumento utilizzate per la produzione del pane, in modo da poter certificare con quest'ultimo "tool" la presenza delle specifiche varietà di frumento nel prodotto finale.

### *Finalità del Progetto Quantica*

Il progetto si è posto come obiettivo generale l'organizzazione e la valutazione tecnico-economica di una filiera corta per la produzione di un pane ottenuto da farine da varietà antiche di frumento tenero e caratterizzato da un elevato contenuto di vitamine del gruppo B, B<sub>6</sub> ed acido folico, importanti nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.

A tale scopo il progetto sono stati individuati 3 obiettivi specifici:

**1 - tecnico-agronomico:** introdurre la coltivazione di alcune varietà antiche di frumento tenero che a livello sperimentale hanno mostrato ottime qualità produttive, salutistiche e tecnologiche; produrre farine ottenute da 4 varietà antiche di frumento tenero coltivate secondo due sistemi colturali sostenibili (basso impatto ambientale e alto reddito) in modo da ottenere un pane ad alto contenuto di acido folico e con caratteristiche organolettiche apprezzate dai consumatori intervenendo sia sulla macinazione che sulla lievitazione naturale da pasta acida.

**2 - socio-economico:** individuazione delle tecniche di produzione e dei costi medi (modali) ad ettaro ed a quintale del frumento tenero di varietà moderne e confronto con i costi di produzione di varietà antiche a secondo delle diverse tipologie di produzione. Definendo strumenti/procedure a copertura dei rischi di volatilità dei prezzi si è voluto ottenere un secondo obiettivo ovvero il supporto della redazione di un contratto di filiera per l'acquisto di grano tenero coltivato in Toscana, mediante il trasferimento di conoscenze sui costi di produzione nelle diverse tipologie produttive, sull'analisi delle serie storiche sia dei prezzi del frumento tenero nei mercati nazionali ed internazionali sia dei prezzi dei principali fattori della produzione.

**3 -nutrizionale sulle farine e clinico su un campione di pazienti:** caratterizzazione del contenuto di vitamine del gruppo B (B<sub>6</sub> e acido folico), dell'acido alfa-linolenico e dei fito-estrogeni sulle farine oggetto del trasferimento dell'innovazione; caratterizzazione dei parametri biumorali correlati all'insorgenza di malattie cardiovascolari, del profilo metabolomico e di quello di espressione genica.

A garanzia della tracciabilità della filiera sono state condotte caratterizzazioni molecolari della popolazione microbica della pasta acida adoperata nella lievitazione e delle varietà antiche di frumento tenero utilizzate nella panificazione mediante l'uso di marcatori del DNA. Quest'ultima analisi effettuata

sia sulle farine sia sul pane ha permesso di ottenere un “passaporto molecolare” che possa certificare la presenza delle specifiche varietà di frumento nel prodotto finito.

## Metodologia

Le metodologie adottate per il raggiungimento degli obiettivi di progetto sono state le seguenti:  
**Azione F2.2 - Individuazione delle tecniche produttive e dei costi di produzione ad ettaro e a quintale di varietà moderne di frumento tenero in funzione delle differenti tipologie di produzione (A5).**

I principali parametri per la determinazione delle tipologie produttive sono costituiti dalle caratteristiche agronomico-ambientali, dalla dimensione aziendale, dalla forma di conduzione, dall'importanza relativa della coltura di frumento tenero nella realtà aziendale e dalle modalità tecniche di produzione. Ognuno di questi parametri rappresenta quindi un carattere importante per la determinazione e differenziazione dei costi. La principale fonte di informazione microeconomica ufficiale sui costi di produzione in agricoltura è la Rete di Informazione Contabile Agricola (RICA). Per utilizzare questa fonte di informazione ai fini della quantificazione e dei costi di produzione del frumento tenero è stato necessario utilizzare tecniche econometriche per l'attribuzione a tale processo di una appropriata quota di costi comuni che dipenderà non solo dall'importanza relativa della coltura all'interno dell'attività aziendale, ma anche dalla tecnologia di produzione impiegata. Il progetto europeo FACEPA ([www2.ekon.slu.se/facepa/](http://www2.ekon.slu.se/facepa/)) ha definito una metodologia standard per la suddivisione dei costi comuni basato sul concetto di domanda derivata. Il campione RICA è stratificato in base alla dimensione e all'orientamento tecnico economico delle aziende ed ha la natura di un panel parzialmente rotato. Il campione è costruito per essere rappresentativo a livello regionale; tuttavia, dovendo essere utilizzato ai fini di questa ricerca con riferimento ad una sola coltura, è stato necessario effettuare l'analisi dei dati microeconomici con riferimento almeno al complesso dell'Italia Centrale, per avere a disposizione una dimensione campionaria in grado di consentire un' accettabile affidabilità delle stime. Per l'allocazione dei costi comuni ai processi produttivi è stata trasferita al caso in questione la metodologia messa a punto nel progetto FACEPA. Questa consiste nella stima di un insieme di equazioni lineari dove la domanda derivata per ogni input dell'azienda agricola è rappresentata come una funzione di diversi output. Per ottenere la coerenza contabile dei dati, la somma dei valori degli output deve eguagliare la somma del valore degli input più il valore aggiunto netto. E' stato possibile stimare un modello che include anche i costi del lavoro. Il modello è stato stimato ricorrendo allo stimatore SUR grazie al quale è possibile introdurre vincoli attraverso le varie equazioni in modo da rispettare la coerenza contabile dei dati. Il modello ha premesso inoltre di considerare la correlazione nei residui delle diverse equazioni.

**Azione F2.3 - Trasferimento di agrotecniche innovative nelle aziende agricole (A3).**

Nelle tre aziende agricole selezionate, una a conduzione convenzionale e due a conduzione biologica, sono stati introdotti modelli gestionali differenziati in funzione del sistema di coltivazione. Le metodologie adottate in questa fase sono state:

1. coltivazione di 4 varietà antiche di frumento tenero nei sistemi innovativi e di almeno una “mixture” delle 4, in parcelle di dimensioni minime 250m<sup>2</sup>, separate le une dalle altre da passetti opportunamente gestiti in modo da scongiurare la crescita della flora spontanea. Le 4 varietà antiche sono state selezionate da una lista di varietà conosciute sul territorio, per avere quantitativi di semente sufficienti per attivare il processo innovativo proposto.

2. operazioni colturali introdotte nelle aziende:

### **Sistemi collaudati nell'azienda convenzionale**

**Sistema 1 - Convenzionale:** consiste nel sistema abitualmente seguito dall'agricoltore nella sua azienda e prevedeva: aratura o ripuntatura; due erpicature; densità di semina 500 semi mq; concimazione con fertilizzanti chimici di sintesi 1.5 qli ha<sup>-1</sup> di 18-46 e 3 qli ha<sup>-1</sup> di Nitrato Ammonico in 2 passaggi frazionati (50% al momento del viraggio da accostimento a levata e per il restante 50% in levata, 2 settimane dopo la distribuzione precedente); diserbo pre-emergenza e copertura se necessario; trattamento anticrittogamici alla levata/spigatura

**Sistema 2 – Ridotto:** minima lavorazione o semina diretta (in funzione del tipo di terreno e della precessione colturale); erpicatura; densità di semina 500 semi mq; concimazione sulla base delle dosi stabilite in funzione della “previsione di resa” e in rispetto dei limiti imposti dal marchio

AGRIQUALITA'; diserbo in post-emergenza solo se necessario; difesa dalle crittogame (a danno evidente come curativo); anticrittogamici e antiparassitari: è previsto il possibile ricorso a un trattamento anticrittogamico da effettuare nella fase di levata; gestione dei residui colturali: è prevista l'asportazione delle paglie.

**Sistema 3 - Biologico:** interrimento del prato; falsa semina; aratura 25 cm; erpicatura; concimazione in pre-semina 10 q ha<sup>-1</sup> con concime organico (3-3-3); densità di semina 500 semi per m<sup>2</sup>.

**Sistema proposto e applicato nelle aziende a conduzione biologica:**

**Sistema 3 - Biologico:** interrimento del prato; falsa semina; aratura 25 cm; erpicatura; concimazione in pre-semina 10 q ha<sup>-1</sup> con concime organico (3-3-3); densità di semina 500 semi per m<sup>2</sup>.

**Azione F2.5 - Test di collaudo volti a verificare il corretto trasferimento dell'innovazione di processo (A3).**

Test di collaudo destinati a testare le agrotecniche innovative introdotte. Il trasferimento d'innovazione proposto è stato testato nelle 4 aziende agricole individuate (due a conduzione biologica e due a conduzione convenzionale) attraverso le prove di campo, menzionate sopra, e relative analisi sulle granelle prodotte. I rilievi che sono stati effettuati per testare il trasferimento d'innovazione sono stati:

1. Investimento frumento e densità infestanti allo stadio di terza foglia vera su un'area di 30\*25 cm e su un numero di campioni di 5 per parcella;
2. Campionamento durante le fasi fenologiche principali;
3. Data di spigatura (data di completamento della fuoriuscita della spiga su almeno il 70% delle piante) ed eventuali malattie (metodo SIC: altezza raggiunta e livello di copertura della foglia);
4. Campionamento della biomassa delle infestanti prima della completa maturazione del frumento e composizione percentuale delle specie dominanti su un'area di 1 m<sup>2</sup> e su un numero di 3 campioni 3 per parcella;
5. Data di maturazione, percentuale di allettamento e di danni;
6. Campionamento delle componenti della produzione su un'area di 1 m<sup>2</sup> e su almeno 3 campioni per parcella: granella; paglia; pula; numero di spighe; 1 Kg di granella e 1 Kg di farina sono stati destinati alle analisi tecnologiche.

**Azione F2.6 - Realizzazione di prove varietali e riproduzione di sementi di varietà antiche di frumento tenero (A6).**

Realizzazione di prove parcellari presso il CIRAA, con lo scopo di confrontare almeno 4 varietà antiche diverse di frumento relativamente alle performances produttivo-qualitative. La prova ha avuto anche lo scopo di riprodurre e mantenere il materiale vegetale in modo da costituire un pool di materiale utilizzabile per le prove successive. In particolare le diverse varietà sono state caratterizzate dal punto di vista fenologico (compimento delle diverse fasi) e produttivo (peso della granella, umidità, peso dei mille semi, peso ettolitrico).

**Azione F2.9 - Ripetizione esami ematochimici e strumentali (A4).**

I soggetti studiati sono stati sottoposti a visita medica e ad una valutazione della funzione endoteliale attraverso la Tonometria Periferica Arteriosa (PAT), una nuova tecnologia non invasiva che misura i cambiamenti del tono arterioso nel letto vascolare periferico. La metodologia EndoPAT comprende un sistema di misurazione che supporta un paio di biosensori basati sulla pletismografia. La tipica caratteristica di questo sistema consiste nel fatto che essa applica una pressione uniforme a livello dei 2/3 distali delle dita e in modo simultaneo registra il segnale da entrambe le braccia.

**Azione F3.2 - Elicitazione delle tecniche e dei costi di coltivazione delle varietà di frumento tenero moderno e delle varietà antiche da effettuare presso testimoni privilegiati (A5).**

Per i coefficienti tecnici per la validazione dei costi di produzione, ricavati dalla banca dati RICA, si è ricorso a tecniche di elicitazione delle opinioni degli esperti consolidate in letteratura. Il processo è stato suddiviso in 5 fasi: 1) individuazione delle variabili per le quali è richiesta una valutazione da parte degli esperti (rese ad ettaro, impiego di input ad ettaro, etc.); 2) identificazione e reclutamento degli esperti (tecnici di consorzi, associazioni produttori, professionisti indipendenti, etc.); 3) motivazione e training degli esperti (spiegazione del concetto di probabilità e di distribuzione di probabilità, euristiche ed errori sistematici); 4) strutturazione e decomposizione (precisa definizione delle quantità da elicitare, revisione con gli esperti dell'evidenza disponibile su cui basano le proprie stime); 5) elicitazione (un processo

interattivo per cui da alcune statistiche sommarie della distribuzione elicitate dagli esperti si è fittato una distribuzione di probabilità che è stata riproposta agli esperti per un giudizio di adeguatezza, il ciclo si è ripetuto fino all'accettazione della stima della distribuzione di probabilità).

### **Azione F3.3 - Analisi dei prezzi del frumento e dei prezzi dei principali fattori della produzione (A5).**

Per quanto riguarda l'analisi delle serie storiche dei prezzi del frumento tenero e dei fattori della produzione ai fini della del trasferimento di innovazione è stato necessario acquisire le banche dati nazionali ed internazionali già esistenti. Le quotazioni settimanali del frumento tenero sui principali mercati nazionali sono disponibili nella banca dati pubblica DATIMA implementata dall' ISMEA ([datima.ismea.it](http://datima.ismea.it)) che raccoglie anche informazioni sui prezzi delle principali materie prime utilizzate nella coltivazione. Per quanto riguarda le quotazioni internazionali il mercato di riferimento è l' EURONEXT-LIFFE di Parigi dove vengono quotati quotidianamente i contratti standardizzati future per il frumento tenero europeo. L'analisi delle serie storiche dei prezzi del frumento tenero (piazze nazionali e internazionali) è stata articolata nei seguenti punti:

- 1) valutazione delle proprietà statistiche delle serie storiche dei prezzi: normalità, stagionalità, volatilità, persistenza degli shock (long memory), esplosività;
- 2) analisi della correlazione tra le serie dei prezzi;
- 3) analisi della trasmissione delle variazioni nei prezzi del frumento tenero tra differenti piazze. Questo ultimo punto è stato affrontato inizialmente effettuando test per la cointegrazione delle serie, in altre parole è stata verificata la presenza di relazioni, stabili di lungo periodo tra i prezzi, relazioni la cui presenza è prevista dalla legge del prezzo unico e dalle attività di arbitraggio spaziale tra le piazze. Successivamente, è stato stimato un modello del tipo vector error correction che deve permettere di stimare gli aggiustamenti dei prezzi nel breve periodo, la relazione strutturale di lungo periodo e la velocità di riassorbimento degli scostamenti dalla relazione di lungo periodo, fornendo quindi un quadro completo della trasmissione delle variazioni di prezzo tra due o più piazze e dei rapporti causa-effetto nelle variazioni dei prezzi. Le serie storiche dei fattori di produzione sono state invece semplicemente ponderate con i pesi specifici di ciascun fattore nel costo complessivo di produzione in modo da ottenere un indice aggiornabile del costo di produzione, sia per le varietà comuni sia per quelle antiche.

### **Azione F3.4 - Test per la valutazione delle caratteristiche tecnologiche delle farine ottenute dalla coltivazione di frumento tenero da varietà antiche con il metodo di agricoltura integrata (AGRIQUALITA') e/o biologica; test per la valutazione delle caratteristiche chimico-nutrizionali e di stabilità ossidativa dei pani (A1).**

Sui campioni di granella sono state effettuate analisi di laboratorio per la determinazione delle caratteristiche tecnologiche delle farine. Nel panificio identificato sono stati considerati campioni di farina ottenuta dalla molitura delle varietà antiche su cui sono state analizzate le seguenti proprietà:

1. forza (W): la capacità di resistere nell'arco del tempo alla lavorazione.
2. resistenza (P) e elasticità (L): in base alla quantità, ma anche alla qualità, del glutine contenuto in una data farina, l'impasto con l'acqua ha più o meno resistenza (P) ed elasticità (L) e varia anche il tempo necessario per la lievitazione.

Il fattore di panificabilità W, dato dalla resistenza P e dall'elasticità L, è stato calcolato con l'alveografo di Chopin.

Inoltre sui campioni di farina sono state effettuate le seguenti analisi chimiche: umidità, ceneri, proteine, amido totale, amido danneggiato, fibra solubile e insolubile.

### **Azione F3.5 - Realizzazione di prove di panificazione utilizzando la farina e miscele di farina ottenute dalla granella delle varietà antiche selezionate, realizzazione di test sperimentali per la messa a punto dell'impasto migliore che riesce ad esaltare le caratteristiche tecnologiche delle farine (A1).**

Prima di procedere alle prove di caratterizzazione tecnologica del pane, è stata impiegata una quantità comparabile di coltura microbica per ogni isolato da testare in modo da rendere possibile il confronto tra le attitudini dei diversi ceppi. Ogni prova di panificazione è stata quindi preceduta dalla standardizzazione dell'inoculo.

Sul prodotto finito, il pane, sono state eseguite le seguenti analisi: umidità, ceneri, proteine, lipidi, fibra totale, amido totale e amido resistente, attività dell'acqua, peso, volume, volume specifico, shelf-life (tramite test di compressione e determinazione dell'umidità).

**Azione F3.6 - “Passaporto molecolare”: caratterizzazione morfologica e molecolare della pasta acida e caratterizzazione molecolare delle farine (A3).**

**1. Acquisizione dei campioni.** Nel panificio identificato (NEWCOPAN) sono stati considerati i seguenti campioni: impasto acido maturo, impasto finale e pane cotto;

**2. Analisi.** Sui campioni sono stati misurati il pH e la temperatura. I campioni di madre acida e impasto finale sono stati usati per la conta vitale dei diversi gruppi di microrganismi che costituiscono la flora del pane. La conta (numero di microrganismi coltivabili presenti, UCF/L) è stata ottenuta con la tecnica delle diluizioni successive e della semina per spatolamento su piastre contenenti terreni selettivi, idonei per la conta e l'isolamento dei bacilli, cocchi e lieviti. Per isolare i batteri lattici e i lieviti, le piastre sono state messe a incubare in anaerobiosi;

**3. Isolamento dai campioni di madre acida e impasto finale.** Per la procedura di isolamento sono state scelte, per ogni campione, le piastre Petri con un numero limitato di colonie ben isolate. Da ciascuna piastra sono state isolate un certo numero di colonie. Tali colonie sono state purificate tramite striscio su substrati idonei;

**4. Indagine microscopica.** La morfologia dei batteri lattici e dei lieviti isolati dalle madri acide e dagli impasti finali è stata osservata al microscopio su colture di 48-72 ore, su vetrini fissati e colorati con una soluzione di blu metilene;

**5. Allestimento della collezione.** Gli isolati di lieviti e batteri lattici sono stati conservati in glicerolo, per essere successivamente sottoposti a identificazione genotipica. Come mezzi di coltura sono stati usati MRS modificati per gli isolati batterici e WL per quelli di lievito. Al termine dell'inoculazione, ciascuna piastra è stata lavata con una miscela di terreno e glicerolo e le colonie raccolte. Tale brodocoltura è stata poi messa in microprovette e congelata a -80 °C;

**6. Identificazione genotipica degli isolati di batteri lattici e dei lieviti.** Per identificare a livello di specie/ceppo, le colture di batteri lattici e di lieviti, ottenute nel corso della campagna di isolamento, è stato utilizzato il sequenziamento, dopo estrazione del DNA genomico e amplificazione tramite PCR di una porzione di 16S rDNA, 23S rDNA o ITS;

**7. Identificazione genotipica delle farine da varietà antiche.** E' stato utilizzato il sequenziamento, dopo estrazione del DNA genomico e amplificazione tramite PCR.

**Azione F3.7 - Panel e consumer test per la valutazione della qualità organolettica del pane e delle preferenze dei consumatori.**

E' stata condotta un'analisi sensoriale con il supporto di assaggiatori dotati di esperienza e sensibilità superiori e una di consumer test (Constes) in cui è stato caratterizzato il gradimento da parte del consumatore. Il “ConTes” è stato condotto attraverso un campione basato su sesso ed età, nell'intento di definire un profilo demografico conforme a quello statisticamente rilevato per i consumatori di prodotti con caratteristiche qualitative affini a quelle di progetto. Il test è stato condotto sulla base di un questionario. Tali domande sono state destinate a caratterizzare i fattori condizionanti le scelte di consumo per il prodotto in questione. Ad integrazione di queste domande è stato effettuato, da parte dei consumatori del campione, l'assaggio e la scelta dei pani in funzione delle caratteristiche sensoriali, con attribuzione di un ordine di gradimento per le tipologie proposte.

**Azione F4.2 – Raccolta dati anamnestici, clinico-strumentali, biochimici e stoccaggio materiali biologici per indagini successive (A4).**

In un campione di soggetti sani ma ad alto rischio (>15% a 5 anni secondo le carte del rischio cardiovascolare della Società Europea di Cardiologia) e in un campione di pazienti con malattia aterosclerotica nei diversi distretti è stato verificato l'effetto dell'assunzione a medio-lungo termine di alimenti contenenti graminacee, caratterizzati da una caratteristica composizione biochimica per quanto riguarda alcuni parametri responsabili di determinare un certo grado di protezione verso le malattie cardiovascolari (vitamine del gruppo B, antiossidanti, etc...). A ciascun soggetto è stato sottoposto una visita medica, ad un'indagine nutrizionale per la valutazione del profilo alimentare ed a varie indagini antropometriche.

**Azione F4.3 - Intervento terapeutico (A4).**

Su ciascun soggetto partecipante allo studio sono stati analizzati, nei diversi punti di interesse, i seguenti parametri:

1. parametri biumorali correlati all'insorgenza di malattie cardiovascolari (profilo lipidico, vitaminico, omocisteina, lipoproteina (a), glicemia, transaminasi, parametri infiammatori);
2. comparsa e progressione della patologia aterosclerotica attraverso valutazione clinica e strumentale in soggetti ad alto rischio e in pazienti con aterosclerosi documentata nei diversi distretti vascolari;
3. profilo di espressione genica da cellule circolanti per la comprensione del ruolo della variazione di espressione dei singoli geni, ma anche delle loro interazioni e delle regolazioni trascrizionali e post-trascrizionali. Lo studio dell'espressione genica e della localizzazione dei vari marker loco-indotti di attivazione dell'infiammazione e della coagulazione, è stato correlato agli aspetti clinici e biumorali sistemici;
4. profilo metabolomico.

#### **Azione F4.4 - Profili di espressione genica e proteomica (A4).**

Le nanotecnologie ad alta produttività in grado di valutare numerose variabili contemporaneamente rappresentano, al momento attuale, la metodologia da scegliere per lo studio di malattie complesse quali l'aterosclerosi. Tra le varie nanotecnologie sviluppate in questi ultimi 10 anni, la tecnologia microarray si è proposta di fornire, nei vari settori di applicazione, una spinta propulsiva nel raggiungimento di ulteriori conoscenze relative ai meccanismi molecolari alla base dello sviluppo, progressione e complicanze della malattia aterosclerotica nelle diverse manifestazioni cliniche. Analisi di polimorfismi tramite piattaforma GenomeLab SNPstream (Beckman Coulter INC., Fullerton, CA) e NanoChip Molecular Biology Workstation (Nanogen, San Diego, CA). Inoltre, il partner P4 ha avuto a disposizione e funzionanti le tecnologie per lo studio dei profili di espressione genica quali la tecnologia two color e la tecnologia Affymetrix. L'identificazione di polimorfismi con sostituzione di una singola base (SNP) mediante l'uso della tecnologia GenomeLab SNPstream permette di analizzare da un minimo di 4.600 ad un massimo di 800.000 genotipi al giorno. Grazie all'utilizzo di reazioni enzimatiche, la tecnologia GenomeLab SNPstream è una tecnologia eccellente caratterizzata da un'accuratezza maggiore del 99% e dalla necessità di soli 0.4 ng di DNA per singola genotipizzazione. Sulla piattaforma GenomeLab SNPStream per l'identificazione di mutazioni e polimorfismi è stata effettuata la messa a punto e la validazione dell'analisi di numerosi polimorfismi (single nucleotide polymorphism, SNP) a carico di geni coinvolti nel metabolismo della omocisteina, nel sistema renina-angiotensina, isoforme della nitrossido sintasi, metalloproteinase e loro inibitori, nel metabolismo lipidico.

#### **Azione F4.6 - Valutazione della trasferibilità nella pratica clinica (A4).**

Alla fine dello studio sperimentale di intervento nutrizionale è stata effettuata un'analisi di fattibilità per quanto riguarda la trasferibilità dei risultati ottenuti nella pratica clinica di ogni giorno. Quest'analisi è stata effettuata all'interno dell'attività ambulatoriale effettuata dal centro all'interno dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi.

## **Risultati conseguiti**

### **Azione F1.1. Costituzione accordo di cooperazione**

#### **Capofila Newcopan**

Tale prima fase ha visto Newcopan coordinare la costituzione dell'accordo di cooperazione per l'ATS tra i diversi partner partecipanti all'azione 124 (A1 Newcopan; A3 Scuola Superiore Sant'Anna; A4 Dipartimento di di Area Critica Medico-Chirurgica Università degli Studi di Firenze; A5 Dipartimento di Scienze delle produzioni vegetali, del suolo e dell'Ambiente Agroforestale Università degli Studi di Firenze DiPSA (ad oggi DISPAA); A6 Centro Interdipartimentale di Ricerche Agro-Ambientali "E. Avanzi" Università degli Studi di Pisa; B.26 Azienda Agricola Podere La Casetta di Rossi Stefania, Montaione Fi; B. 27 Azienda Agricola Il Sapito S.r.l. Società Agricola Montaione Firenze; A8 Azienda Crocetti Eligio-Castelfiorentino, Firenze). L'atto notarile è del 13/10/2011.

### **Azione F1.2 Programmazione di dettaglio delle attività di progetto e avvio delle attività di coordinamento**

#### **Capofila Newcopan**

Newcopan ha eseguito più riunioni con i partner per la programmazione delle attività del progetto ed ha avviato la sua attività di coordinamento. Inoltre la programmazione ha visto l'invio di email ai partner per mettere a conoscenza l'intero team delle decisioni prese nella riunione suddetta.

### **Azione F2.1 Coordinamento delle attività della fase 2**

### **Azione F3.1 Coordinamento delle attività della fase 3**

#### **Capofila Newcopan**

Newcopan ha eseguito le attività di coordinamento delle fasi suddette.

### **Azione F2.3 Trasferimento di agrotecniche innovative nelle aziende agricole**

#### **Partner SSSUP – Università Pisa in collaborazione con le aziende agricole**

In tre aziende agricole selezionate, una a conduzione convenzionale e due a conduzione biologica, sono stati introdotti tre modelli gestionali differenziati in funzione del sistema di coltivazione così come previsto dal progetto.

#### *a) Trasferimento di agrotecniche presso l'azienda agricola convenzionale - Eligio Crocetti*

La superficie interessata dai collaudi è stata di circa 3 ha (Figura 1) ed i sistemi collaudati sono stati 3 (annata agraria 2011-2012):

Sistema 1 – Convenzionale (su 2 ha). Tale sistema prevedeva: un'aratura o ripuntatura; due erpicature; una densità di semina di 500 semi/m<sup>2</sup>; una concimazione con fertilizzanti chimici di sintesi in pre-semina, come il 18-46 e il Nitrato Ammonico in 2 passaggi frazionati (50% al momento del viraggio da accestimento a levata e 50% in levata, 2 settimane dopo la distribuzione precedente); diserbo in pre-emergenza e in copertura se necessario e trattamento anticrittogamici alla levata/spigatura.

Sistema 2 – Ridotto (su 0,5 ha). Tale sistema prevedeva: la minima lavorazione; un'erpicatura; una densità di semina 500 semi/m<sup>2</sup>; la concimazione e un diserbo in post-emergenza; la difesa dalle crittogame e l'uso di anticrittogamici e antiparassitari.

Sistema 3 – Biologico (su 0,5 ha). Tale sistema prevedeva un interrimento del prato; la falsa semina; l'aratura 25 cm; una erpicatura; la concimazione in pre-semina con concime organico (3-3-3) ed una densità di semina di 500 semi/m<sup>2</sup>.

Le varietà di frumento tenero collaudate sono state:

Varietà antiche: Verna, Risciola, Autonomia B e Gentil Rosso;

Varietà moderna: Blasco;

Mix varietali: Verna/Blasco e Verna/AutonomiaB.

Per motivi legati ai quantitativi di seme disponibili le varietà appena elencate sono state collaudate nel sistema convenzionale in parcelle di circa 2000 m<sup>2</sup>, mentre nel sistema integrato e biologico sono state testate le varietà Verna, Blasco e i due mix varietali sempre in parcelle di circa 2000 m<sup>2</sup>.

Come riportato sopra la densità di semina è stata di 500 semi/m<sup>2</sup>. La dose necessaria per raggiungere tale densità è stata calcolata sulla base del peso dei 1000 semi tipico di ciascuna varietà. La seminatrice è stata regolata sulla base del peso dei 1000 semi di ciascuna varietà e svuotando la tramoggia con attenzione al cambio varietale.

#### *b) Trasferimento di agrotecniche presso le aziende agricole Il Sapito e La Casetta*

Presso le aziende Il Sapito e La Casetta sono state collaudate le varietà Verna, Blasco e la mix varietale Verna/Blasco seguendo il sistema biologico che prevedeva: l'interramento del prato; la falsa semina; l'aratura 25 cm; una erpicatura; la concimazione in pre-semina con concime organico e una densità di semina 500 semi/m<sup>2</sup>.

#### *c) Analisi del suolo presso le Aziende Agricole selezionate per il trasferimento di agrotecniche*

Nella fase F2.3 è stata prevista una campagna di campionamento dei suoli per la caratterizzazione iniziale del terreno dal punto di vista fisico-chimico. I campionamenti del terreno hanno interessato gli appezzamenti delle tre aziende selezionate per la messa in opera delle prove di collaudo per la coltivazione delle varietà antiche di frumento tenero. Nell'autunno del 2011, in ognuna delle tre aziende selezionate, è stata realizzata una campagna dettagliata di campionamento del terreno, al fine di caratterizzare i terreni destinati alle prove di collaudo. Ogni prelievo è stato effettuato cercando di minimizzare la disomogeneità e, al contempo, garantire la massima rappresentatività delle caratteristiche dell'appezzamento. Inoltre, per ridurre al minimo la variabilità spaziale dei dati, tutti i punti di campionamento sono stati opportunamente georeferenziati.

I ranges dei valori dei parametri fisico-chimici ottenuti dalle analisi di laboratorio per la caratterizzazione iniziale degli appezzamenti nelle tre aziende, selezionate per la messa in opera delle prove di collaudo, sono riportati di seguito:

Azienda Eligio Crocetti: Azienda a conduzione convenzionale.

#### Appezzamento selezionato per il trasferimento della tecnica convenzionale:

##### 1. Parametri fisici:

Tessitura:

- Sabbia: 51.3% - 68.5%
- Limo: 21.4% - 35.8%
- Argilla: 10.1% - 12.9%

##### 2. Parametri chimici

- pH: 7.7 – 7.9
- conducibilità elettrica: 0.229 – 0.389 mS/cm a 25°C
- sostanza organica: 14.0 g kg<sup>-1</sup> - 15.4 g kg<sup>-1</sup>
- azoto totale: 0.90 g kg<sup>-1</sup> – 1.05 g kg<sup>-1</sup>
- fosforo totale: 940 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 1132 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>
- fosforo assimilabile: 10 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 35 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>

Giudizio sintetico: Il suolo selezionato per la coltivazione del frumento secondo il sistema convenzionale, presenta una tessitura franco-sabbiosa che ne determina una buona aereazione e una facile lavorabilità, cosicché il substrato risultava ben adatto all'esercizio dell'agricoltura. Essendo un terreno di medio impasto a prevalente componente sabbiosa potrebbe trattenere poco l'acqua e gli elementi nutritivi, presentando un maggior rischio di rilascio dei nutrienti e dei fitofarmaci nelle acque di percolazione. Il suolo selezionato aveva una reazione che rientrava nel range sub-alcino – moderatamente-alcino. I valori di conducibilità elettrica essendo inferiori a 2 mS/cm a 25°C, non comportavano effetti negativi nella resa delle colture. Per quanto riguardava il contenuto di sostanza organica (o humus), il suolo è risultato mediamente dotato in humus e con una dotazione medio-bassa di N totale e medio-buona in fosforo totale e assimilabile.

Appezzamento selezionato per il trasferimento della tecnica low-input:

1. Parametri fisici:

- Tessitura:
  - Sabbia: 48.2% - 52.3%
  - Limo: 33.4% - 37.8%
  - Argilla: 13.8% - 18.1%

2. Parametri chimici

- pH: 8.0 – 8.1
- conducibilità elettrica: 0.220 – 0.375 mS/cm a 25°C
- sostanza organica: 13.3 g kg<sup>-1</sup> – 17.1 g kg<sup>-1</sup>
- azoto totale: 0.87 g kg<sup>-1</sup> – 1.07 g kg<sup>-1</sup>
- fosforo totale: 958 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 1094 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>
- fosforo assimilabile: 5 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 8 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>

Giudizio sintetico: Il suolo selezionato presentava una tessitura franco-sabbiosa che ne determina una buona aereazione e una facile lavorabilità. Il pH del suolo selezionato rientrava nel range moderatamente-alcino ed i valori di conducibilità elettrica essendo inferiori a 2 mS/cm a 25°C non comportavano effetti negativi nella resa delle colture. Il contenuto in sostanza organica (o humus) rientrava nel range mediamente dotato in humus e tenendo conto del contenuto in azoto totale presentava una dotazione medio-bassa di questo elemento poiché inferiore a 1.50 g kg<sup>-1</sup>. Dalle analisi risulta che il suolo selezionato presentava una scarsa dotazione in fosforo totale e assimilabile.

Appezzamento selezionato per il trasferimento della tecnica biologica:

1. Parametri fisici:

- Tessitura: Franco - medio impasto
  - Sabbia: 39.9% - 50.4%
  - Limo: 39.9% - 44.2%
  - Argilla: 12.8% - 15.9%

2. Parametri chimici

- pH: 7.9 – 8.1
- conducibilità elettrica: 0.241 – 0.259 mS/cm a 25°C
- sostanza organica: 14.4 g kg<sup>-1</sup> – 16.8 g kg<sup>-1</sup>
- azoto totale: 0.92 g kg<sup>-1</sup> – 1.01 g kg<sup>-1</sup>
- fosforo totale: 996 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 1459 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>
- fosforo assimilabile: 4 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 9 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>

Giudizio sintetico: Il suolo presentava una tessitura di tipo franco (o di medio impasto) che ne determina una facile lavorabilità. Il pH del suolo selezionato rientrava nel range moderatamente-alcalino ed i valori di conducibilità elettrica, essendo inferiori a 2 mS/cm a 25°C, non comportavano effetti negativi nella resa delle colture. Il contenuto in sostanza organica (o humus) rientrava nel range mediamente dotato in humus con una dotazione medio-bassa di elemento azoto totale, perché inferiore a 1.50 g kg<sup>-1</sup> e una scarsa dotazione in fosforo totale e assimilabile.

Azienda Il Sapito: Azienda a conduzione biologica.

Appezzamento selezionato per il trasferimento della tecnica biologica:

1. Parametri fisici:

- Abbondante presenza di scheletro
- Tessitura: Franco - argilloso
  - Sabbia: 30.7% - 41.9%
  - Limo: 33.6% - 39.7%
  - Argilla: 22.0% - 29.7%

2. Parametri chimici

- pH: 7.9
- conducibilità elettrica: 0.296 – 0.346 mS/cm a 25°C
- sostanza organica: 22.2 g kg<sup>-1</sup> – 33.5 g kg<sup>-1</sup>
- azoto totale: 1.33 g kg<sup>-1</sup> – 1.98 g kg<sup>-1</sup>
- fosforo totale: 965 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 1132 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>
- fosforo assimilabile: 4 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>

Giudizio sintetico: Dal punto di vista fisico il suolo selezionato è classificato a scheletro prevalente con tessitura franco-argillosa. Il pH del suolo selezionato rientrava nel range moderatamente-alcalino. I valori di conducibilità elettrica, ottenuti dall'analisi dell'estratto acquoso di suolo, essendo inferiori a 2 mS/cm a 25°C, non comportano effetti negativi nella resa delle colture. Il contenuto in sostanza organica (o humus) dell'azienda Il Sapito rientrava nel range mediamente-ben dotato in humus. In termini di contenuto in azoto totale, l'appezzamento selezionato presentava una dotazione medio-elevata in quanto i valori erano compresi nel range 1.50 – 5.00 g kg<sup>-1</sup>. Infine, dalle analisi risultava che il suolo selezionato presentava una scarsa dotazione in fosforo totale e assimilabile.

Azienda La Casetta: Azienda a conduzione biologica.

Appezzamento selezionato per il trasferimento della tecnica biologica:

1. Parametri fisici:

- Abbondante presenza di scheletro
- Tessitura: Franco - argilloso
  - Sabbia: 28.9% - 45.1%
  - Limo: 30.6% - 36.1%
  - Argilla: 24.3% - 35.0%

2. Parametri chimici

- pH: 7.7 – 7.9
- conducibilità elettrica: 0.151 – 0.203 mS/cm a 25°C
- sostanza organica: 23.3 g kg<sup>-1</sup> – 31.4 g kg<sup>-1</sup>

- azoto totale: 1.42 g kg<sup>-1</sup> – 1.71 g kg<sup>-1</sup>
- fosforo totale: 760 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 988 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>
- fosforo assimilabile: 4 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup> - 6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg Kg<sup>-1</sup>

Giudizio sintetico: Dal punto di vista fisico il suolo selezionato è classificato a scheletro prevalente con tessitura franco-argillosa. Il pH rientrava nel range sub-alcino - moderatamente-alcino e i valori di conducibilità elettrica, essendo inferiori a 2 mS/cm a 25°C, non comportavano effetti negativi nella resa delle colture. L'azienda La Casetta presentava un buon contenuto in sostanza organica ed in termini di contenuto in azoto totale l'appezzamento risultava mediamente dotato. Infine, dalle analisi risultava che il suolo selezionato presentava una scarsa dotazione in fosforo totale e assimilabile.

## **Azione F2.5 Test di collaudo volti a verificare il corretto trasferimento dell'innovazione di processo**

### **Partner SSSUP – Università Pisa**

Sono stati svolti i seguenti test di collaudo, finalizzati a testare le agrotecniche innovative introdotte (annata agraria 2011-2012).

#### *Investimento del frumento e della densità delle infestanti allo stadio di terza foglia vera*

Il test è stato realizzato su aree di 30 cm x 25 cm ed è stato ripetuto 5 volte per parcella.

Dai dati ottenuti è stato possibile osservare delle differenze tra le varietà in termini di investimento colturale imputabili probabilmente al diverso potere germinativo dato che la densità di semina era la stessa per tutte le varietà. In dettaglio, l'investimento variava da un minimo di 291 piante/m<sup>2</sup> nella varietà Gentil Rosso ad un massimo di 421 piante/m<sup>2</sup> per la varietà Blasco, con una media di 366 piante/m<sup>2</sup>.

Presso L'azienda agricola Il Sapito l'investimento minore è stato registrato per il mix varietale Verna/Blasco, con un valore di 339 piante/m<sup>2</sup>, mentre la varietà ad investimento maggiore è stata la varietà Blasco con 469 piante/m<sup>2</sup>.

Presso L'azienda agricola La Casetta l'investimento minore è stato registrato per la varietà Verna con un valore di 339 piante/m<sup>2</sup>, mentre la varietà ad investimento maggiore è stata ancora una volta la varietà Blasco con 493 piante/m<sup>2</sup>.

Allo stadio di 3° foglia vera del frumento non erano presenti in campo un numero di infestanti tali da giustificare il test sulla densità delle stesse, quindi tale valutazione è stata rimandata alla fase di accestimento.

#### *Campionamento densità delle infestanti in fase di accestimento della coltura*

In fase di pieno accestimento della coltura è stato eseguito il test sulla densità delle infestanti suddivise per specie. Il test è stato realizzato 5 volte per ciascuna parcella su un'area di 25 cm x 30 cm. La densità delle infestanti variava da un massimo di 360 piante/m<sup>2</sup> per la varietà Risciola nel sistema convenzionale seguita dalle varietà Blasco nel sistema convenzionale ed integrato e il mix Verna/Blasco nel sistema integrato con 325, 357 e 349 piante/m<sup>2</sup> rispettivamente.

La varietà che ha fatto registrare una densità di infestanti minore è stata la varietà Blasco nel sistema biologico con 64 piante/m<sup>2</sup> seguita dalla varietà Verna nel sistema integrato e biologico con rispettivamente 187 e 170 piante/m<sup>2</sup>. Le specie dominanti in questa fase di accrescimento del frumento sono state *Veronica agrestis* L., *Papaver rhoes* L., *Stellaria media* L., *Daucus carota* L.

In fase di fine spigatura inizio maturazione è stata osservata una forte infestazione di una specie infestante appartenente alla famiglia delle Boraginaceae e di *Artemisia vulgaris* L., soprattutto nelle parcelle della varietà moderna Blasco. Probabilmente la minor altezza di questa varietà

(circa 80 cm) rispetto alle varietà antiche (in media 130 cm), la hanno resa meno competitiva nei confronti dei tali infestanti.

#### *Campionamento malattie e altezza alla raccolta (metodo SIC: altezza raggiunta e livello di copertura della foglia)*

Non sono state rilevate malattie durante tutto il ciclo colturale del frumento. Sono state registrate le altezze registrate alla raccolta da parte delle diverse varietà (4 luglio 2012). La varietà che ha fatto registrare l'altezza maggiore è stata la varietà Gentil Rosso, con 160 cm, seguita dalle varietà Verna e Risciola, con 140 e 137 cm, rispettivamente. La varietà che ha registrato l'altezza minore è stata la varietà moderna Blasco, con 80 cm.

#### *Data di maturazione, percentuale di allettamento e danni.*

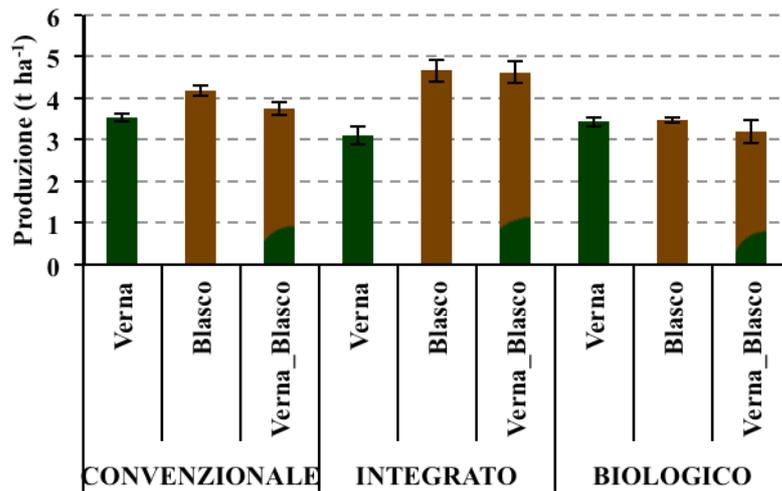
Ad inizio della maturazione lattea della coltura sono stati osservati fenomeni di allettamento da parte del frumento causati dalle abbondanti piogge, che hanno caratterizzato il periodo primaverile. Sono state riportate le percentuali di allettamento registrate per ciascuna varietà in fase di maturazione lattea presso l'azienda E. Crocetti. La maggiore percentuale di allettamento è stata registrata per la varietà antica Gentil Rosso con il 70% di allettamento, seguita dalle varietà antiche Verna, AutonomiaB e Risciola con il 40%, 35% e 30%, rispettivamente. Interessante è il comportamento dei mix varietali. Il mix Verna/AutonomiaB ha infatti registrato un allettamento del 10%. Tale allettamento risultava inferiore alla media di allettamento delle due varietà in purezza, mentre per il mix Blasco/Verna non sono stati registrati fenomeni di allettamento. Sono state riportate le percentuali di allettamento registrate per ciascuna varietà in fase di maturazione lattea presso le aziende agricole biologiche La Casetta e Il Sapito. In questo caso non sono stati registrati fenomeni di allettamento da parte del frumento tenero. Tale risultato può essere dovuto alle diverse caratteristiche chimico-fisiche del terreno e alle diverse condizioni ambientali.

Le varietà per cui è stata registrata la percentuale di allettamento più elevata sono state Verna, Risciola, AutonomiaB e Gentil Rosso.

#### *Campionamento frumento tenero*

In data 4 luglio 2012 è stato realizzato il test sulle componenti della produzione su un'area di 1 m<sup>2</sup> per un totale di 7 campioni per parcella. Il numero di test è stato incrementato rispetto a quanto indicato sul progetto (3 campioni per parcella di 1 m<sup>2</sup>) a causa della forte eterogeneità delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo riportate sopra.

Nelle figure da 7 a 12 sono riportate le produzioni in granella in tonnellate per ettaro e la qualità della granella raccolta espressa come percentuale di proteine e glutine nei tre diversi metodi di gestione (convenzionale, integrato e biologico) per la varietà Verna (antica), Basco (moderna) ed un loro mix (Verna-Blasco). L'Anova a due vie ha evidenziato differenze significative sia tra i metodi di gestione che tra le varietà. In dettaglio, il metodo biologico produceva quantità più basse (3.4 t ha<sup>-1</sup>) rispetto al metodo integrato e convenzionale, che producevano 4.1 t ha<sup>-1</sup> e 3.8 t ha<sup>-1</sup>, rispettivamente. Tali quantitativi corrispondono, ponendo come 100 la media dell'integrato e del convenzionale, ad una riduzione della produzione di frumento tenero di circa il 40%,



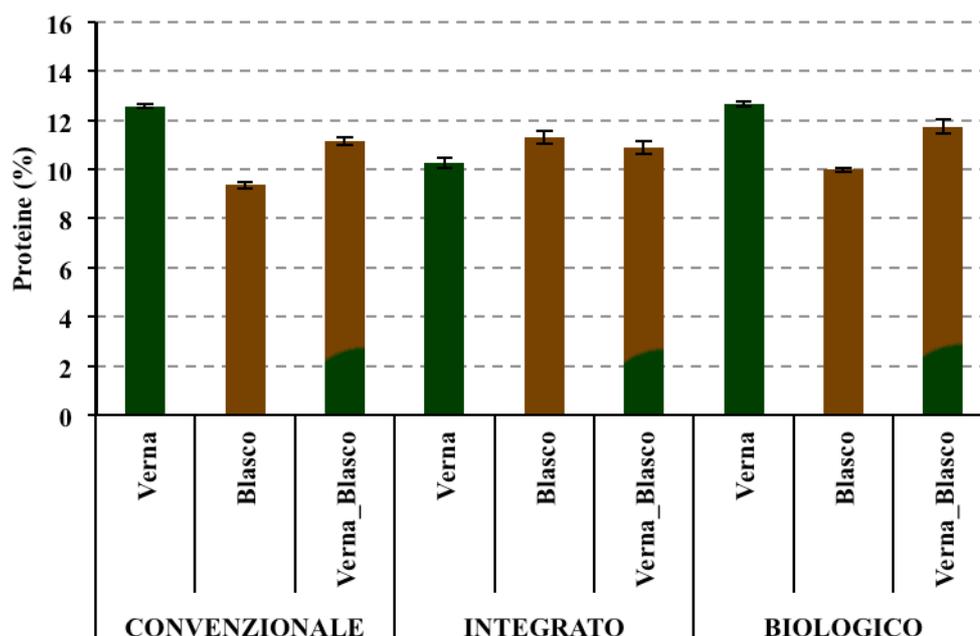
**Figura 7.** Produzioni del frumento tenero in t ha<sup>-1</sup> di granella.

La varietà antica Verna ha inoltre prodotto quantitativi di granella significativamente minori rispetto al Blasco ed al suo mix con Verna. Nel dettaglio, la varietà antica Verna ha prodotto 3.4 t ha<sup>-1</sup> rispetto alla varietà moderna Blasco (4.1 t ha<sup>-1</sup>) e il mix Verna-Blasco (3.9 t ha<sup>-1</sup>) (Figura 7 e 8).

| <b>Two-way ANOVA -<br/>PRODUZIONE</b> |  |
|---------------------------------------|--|
| Gestione (G)                          | <b><i>P</i> &lt; 0.001</b>                 |
| Varietà (V)                           | <b><i>P</i> &lt; 0.001</b>                 |
| GxV                                   | <b><i>P</i> &lt; 0.001</b>                 |
| <b>Convezionale</b>                   | <b>= 3.8 t ha<sup>-1</sup>    <i>b</i></b> |
| <b>Integrato</b>                      | <b>= 4.1 t ha<sup>-1</sup>    <i>b</i></b> |
| <b>Biologico</b>                      | <b>= 3.4 t ha<sup>-1</sup>    <i>a</i></b> |
| <b>Verna</b>                          | <b>= 3.4 t ha<sup>-1</sup>    <i>a</i></b> |
| <b>Blasco</b>                         | <b>= 4.1 t ha<sup>-1</sup>    <i>b</i></b> |
| <b>Verna_Blasco</b>                   | <b>= 3.9 t ha<sup>-1</sup>    <i>b</i></b> |

**Figura 8.** Risultati dell'Anova a due vie (gestione e varietà) e produzioni medie del frumento tenero in t ha<sup>-1</sup> di granella (lettere diverse indicano valori statisticamente diversi secondo il Tukey-B test).

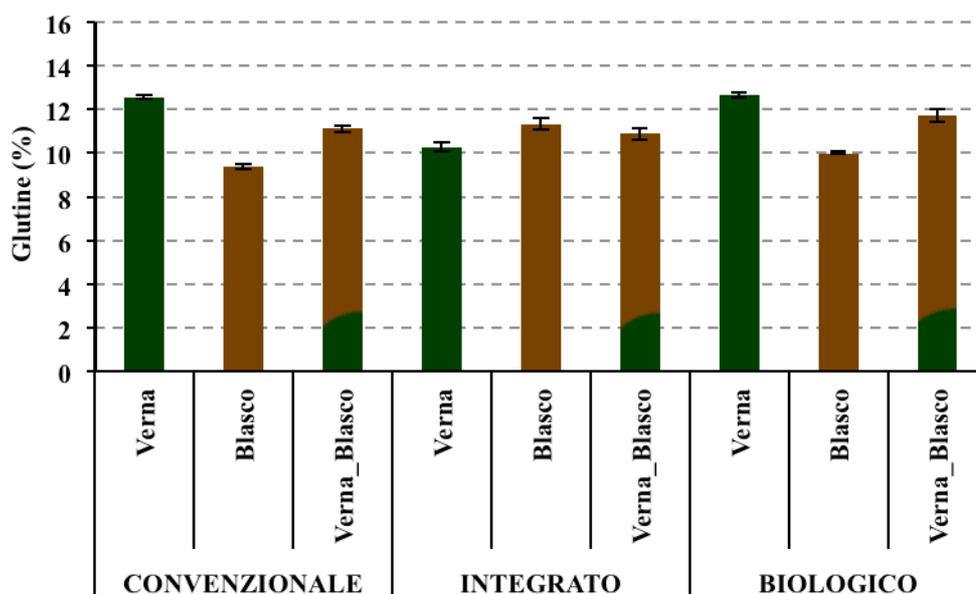
Per quanto invece riguarda la qualità in termini di percentuali in proteine, il metodo biologico ha registrato percentuali in proteine (11.5%) ed glutine (21.8%) significativamente maggiori rispetto al convenzionale (11.0% e 20.9%, rispettivamente) (Figure da 9 a 12). Il metodo integrato faceva registrare inoltre le minori percentuali in proteine e glutine nella granella (10.8% e 20.3%, rispettivamente). Per quanto riguarda la varietà Verna essa mostrava percentuali in proteine ed glutine decisamente superiori (11.8% e 23.4%, rispettivamente) alla varietà moderna Blasco (10.2% e 18.1%, rispettivamente), mentre il mix delle due varietà riportava qualità intermedie (proteine pari all'11.3% e glutine pari al 21.5%). Le percentuali di amido erano in media pari al 61%.



**Figura 9.** Qualità del frumento tenero espressa in percentuale di proteine della granella.

| <b><u>Two-way ANOVA - PROTEINE</u></b> |                 |
|--|-----------------|
| Gestione (G)                           | $P < 0.001$     |
| Varietà (V)                            | $P < 0.001$     |
| GxV                                    | $P < 0.001$     |
| <b>Convezionale</b>                    | <b>11.0 % b</b> |
| <b>Integrato</b>                       | <b>10.8 % a</b> |
| <b>Biologico</b>                       | <b>11.5 % c</b> |
| <b>Verna</b>                           | <b>11.8 % c</b> |
| <b>Blasco</b>                          | <b>10.2 % a</b> |
| <b>Verna_Blasco</b>                    | <b>11.3 % b</b> |

**Figura 10.** Risultati dell'Anova a due vie (gestione e varietà) e percentuali medie di proteine del frumento tenero (lettere diverse indicano valori statisticamente diversi secondo il Tukey-B test)



**Figura 11.** Qualit  del frumento tenero espressa in percentuale di glutine della granella.

### Two-way ANOVA - GLUTINE

Gestione (G)  $P < 0.001$

Variet  (V)  $P < 0.001$

GxV  $P < 0.001$

**Convezionale = 20.9 % b**

**Integrato = 20.3 % a**

**Biologico = 21.8 % c**

**Verna = 23.4 % c**

**Blasco = 18.1 % a**

**Verna\_Blasco = 21.5 % b**

**Figura 12.** Risultati dell'Anova a due vie (gestione e variet ) e percentuali medie di glutine del frumento tenero (lettere diverse indicano valori statisticamente diversi secondo il Tukey-B test).

Considerando esclusivamente il metodo convenzionale,   stato possibile evidenziare differenze in produzione e qualit  (proteine, glutine e amido) di variet  antiche (Verna, Risciola, Gentil Rosso, Autonomia B), rispetto a mix varietali (Verna-Blasco, una variet  antica ed una moderna moderna) e Autonomia B-Verna (due variet  antiche) ed alla variet  moderna Blasco. L'autonomia B produceva alte quantit  di granella ( $4.6 \text{ t ha}^{-1}$ ), quantit  statisticamente maggiori rispetto al Gentil Rosso e al mix Autonomia B-Verna (media di  $3.1 \text{ t ha}^{-1}$ ) (Figura 13 e 14), mentre Verna, Blasco, Verna-Blasco e Risciola avevano produzioni intermedie e paragonabili tra loro (media  $3.8 \text{ t ha}^{-1}$ ). Per quanto riguarda la percentuale in proteine il Verna presentava i valori massimi (12.6%), seguito da Risciola e Gentil Rosso (11.5% e 11.6%) e dalla variet  antica Autonomia B e i due mix (media 11%) (Figure 15 e 16). Il Blasco invece ha registrato percentuali in proteine basse (9.4%). Similmente, il Verna presentava le pi  alte percentuali in glutine (26.2%), differenziandosi dal Blasco (15.4%), mentre le altre variet  ed i mix avevano

valori intermedi e simili tra loro (Figura 17 e 18). L'amido in media nelle diverse farine era pari al 61%.

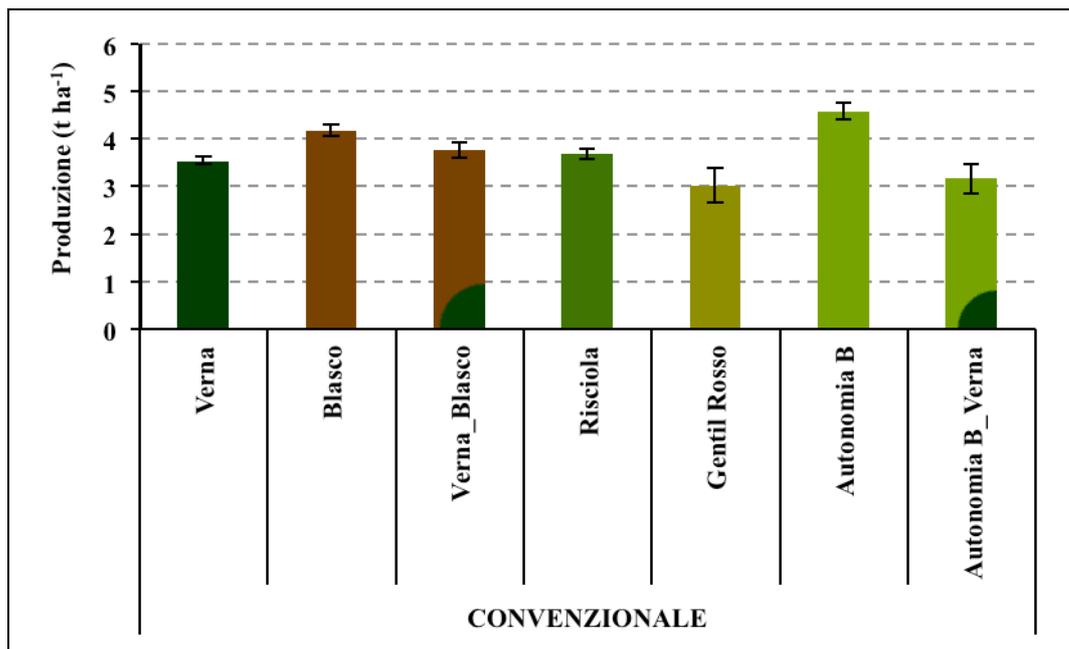


Figura 13. Produzioni del frumento tenero in t ha<sup>-1</sup> di granella.

### One-way ANOVA - PRODUZIONE

Varietà (V)  $P < 0.001$

**Verna** = 3.5 t ha<sup>-1</sup>

**Blasco** = 4.2 t ha<sup>-1</sup>

**Verna\_Blasco** = 3.8 t ha<sup>-1</sup>

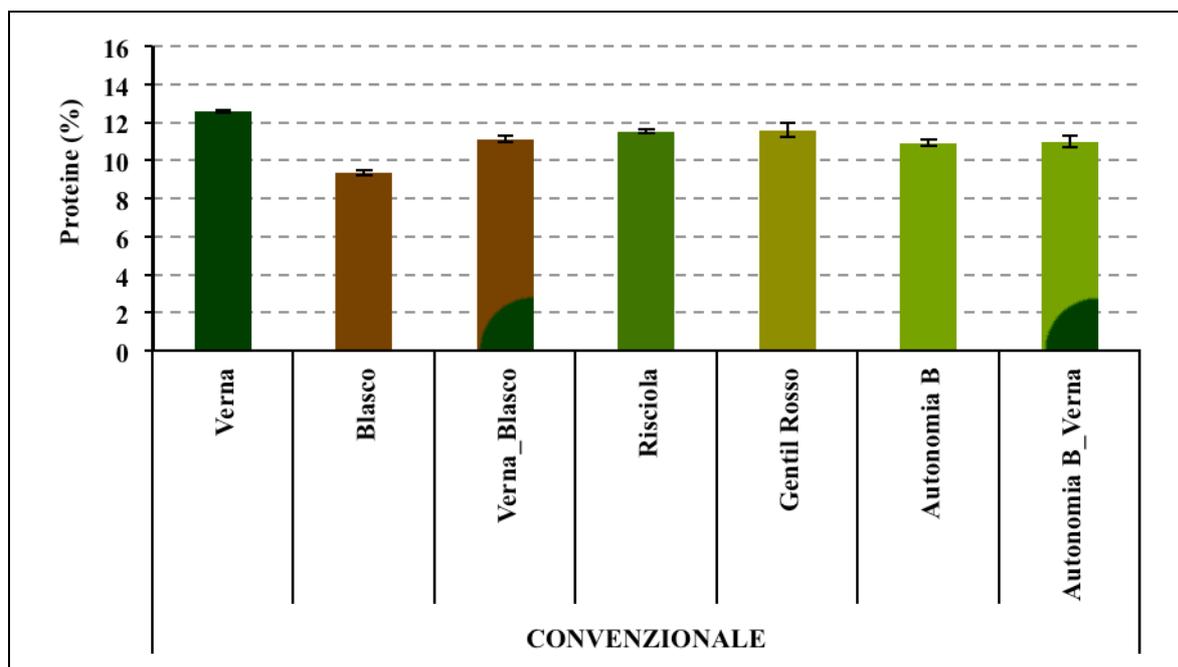
**Risciola** = 3.7 t ha<sup>-1</sup>

**Gentilrosso** = 3.0 t ha<sup>-1</sup>

**Autonomia B** = 4.6 t ha<sup>-1</sup>

**Autonomia B\_Verna** = 3.2 t ha<sup>-1</sup>

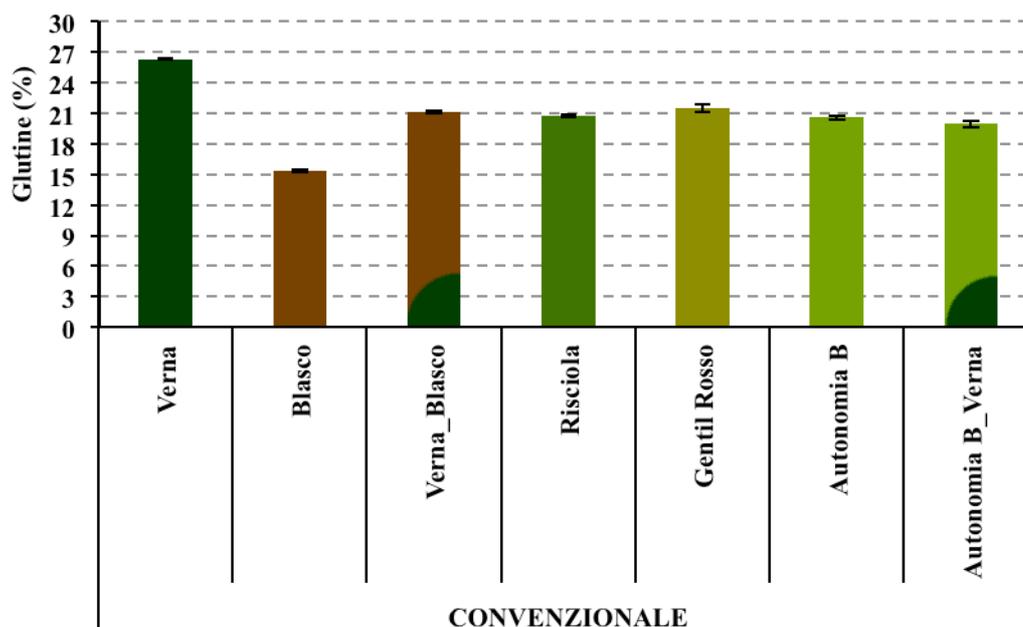
Figura 14. Risultati dell'Anova a due vie (gestione e varietà) e produzioni medie del frumento tenero in t ha<sup>-1</sup> di granella (lettere diverse indicano valori statisticamente diversi secondo il Tukey-B test).



**Figura 15.** Qualità del frumento tenero espressa in percentuale di proteine della granella.

| <b>One-way ANOVA - PROTEINE</b> |          |
|---------------------------------|----------|
| Varietà (V) $P < 0.001$         |          |
| <b>Verna</b>                    | = 12.6 % |
| <b>Blasco</b>                   | = 9.4 %  |
| <b>Verna_Blasco</b>             | = 11.1 % |
| <b>Risciola</b>                 | = 11.5 % |
| <b>Gentilrosso</b>              | = 11.6 % |
| <b>Autonomia B</b>              | = 10.9 % |
| <b>Autonomia B_Verna</b>        | = 11.0 % |

**Figura 16.** Risultati dell'Anova a due vie (gestione e varietà) e percentuali medie medie di proteine del frumento tenero (lettere diverse indicano valori statisticamente diversi secondo il Tukey-B test).



**Figura 17.** Qualità del frumento tenero espressa in percentuale di glutine della granella.

### One-way ANOVA - GLUTINE

Varietà (V)  $P < 0.001$

**Verna** = 26.2 %

**Blasco** = 15.4 %

**Verna\_Blasco** = 21.1 %

**Risciola** = 21.0 %

**Gentilrosso** = 21.5 %

**Autonomia B** = 21 %

**Autonomia B\_Verna** = 20.0 %

**Figura 18.** Risultati dell'Anova a due vie (gestione e varietà) e percentuali medie di glutine del frumento tenero (lettere diverse indicano valori statisticamente diversi secondo il Tukey-B test).

Inoltre, le diverse varietà moderne e la varietà Blasco moderna a confronto sono state valutate per la loro propensione ad ospitare i funghi micorrizici arbuscolari (AMF). Le radici campionate nelle prove varietali messe in opera dal CIRAA corrispondono ad un numero maggiore di varietà antiche rispetto a quelle messe a coltura nelle tre aziende di cui sopra. Le radici di grano sono state campionate, lavate e analizzate mediante il metodo della decolorazione e colorazione in trypan-blue (parcelle replicate tre volte per varietà,  $n=3$ ).

Esiste una grande variabilità tra le diverse varietà di grano, ma è importante evidenziare che le varietà Gentil Rosso, Risciola e Verna presentano ottime colonizzazioni radicali e perciò potrebbero rappresentare varietà potenzialmente inoculabili con funghi micorrizici come biofertilizzanti.

### *Valutazione caratteristiche qualitative e riproduttive delle sementi*

Le analisi delle sementi sono state eseguite secondo quanto previsto dai "Metodi ufficiali di analisi delle sementi" - Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste D.M. del 22/12/92 (riportati in Gazzetta Ufficiale n. 2 del 4 gennaio 1993), Sementi di otto varietà antiche, di cui 4 (Autonomia B, Gentilrosso, Risciola, Verna) provenienti dal collaudo realizzato presso l'Azienda Crocetti e 3 (Autonomia A, Frassineto, Torrenova, Terranova), provenienti dal campo catalogo del Centro

Interdipartimentale di Ricerche Agro-Ambientali E. Avanzi (CIRAA), sono state messe a confronto con le sementi della varietà moderna Blasco per la capacità di germinazione, la loro purezza specifica e la presenza di semi estranei. Le 3 varietà provenienti dal campo catalogo del CIRAA sono state inserite nell'analisi poiché verranno inserite nelle prove di collaudo dell'annata agraria 2012-2013.

L'analisi di germinabilità valuta la capacità dei semi puri di produrre germogli in grado di svilupparsi in piante complete. È un'analisi fisiologica effettuata su campioni di 400 semi per 4 repliche. Ogni replica è composta da 100 semi, disposti su carta sterile in piastre Petri numerate in modo da identificare il lotto di provenienza. Il tutto viene posto in germinatoi dove le condizioni di temperatura, umidità e luminosità simulano quelle in cui viene a trovarsi il seme nelle prime fasi di sviluppo. Come da protocollo, per il frumento tenero sono necessari 8 giorni. Al termine dell'ottavo giorno, viene effettuata la conta dei semi distinguendoli in semi normali (semi che hanno prodotto il germoglio in misura sufficiente, rispondendo al parametro di germinabilità), morti ed anormali. In tabella 7 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi.

**Tabella 7.** Percentuale di germinelli normali, anormali, morti, freschi non germinati e tempo medio di germinazione (espresso in giorni) dei semi delle 8 varietà antiche a confronto con la varietà moderna Blasco. I valori sono indicati come media  $\pm$  ES (errore standard). Lettere diverse indicano valori significativamente diversi per  $P < 0,05$ , secondo l'analisi ad una via della varianza.

| Varietà     | Germinelli (%)       |                 |                 |                       | Tempo medio germinazione (gg) |
|-------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------------------------|
|             | Normali              | Anormali        | Morti           | Freschi non germinati |                               |
| Autonomia A | 93,00 $\pm$ 1,00 d   |                 | 2,33 $\pm$ 0,88 | 4,33 $\pm$ 1,45 a     | 3,10 $\pm$ 0,02 d             |
| Autonomia B | 99,33 $\pm$ 0,67 a   |                 |                 |                       | 3,23 $\pm$ 0,02 cd            |
| Frassineto  | 94,33 $\pm$ 1,67 bcd |                 | 3,67 $\pm$ 1,20 | 2,00 $\pm$ 0,58 b     | 3,68 $\pm$ 0,06 a             |
| GentilRosso | 96,33 $\pm$ 1,20 abc |                 | 2,00 $\pm$ 0,58 | 2,00 $\pm$ 0,82 ab    | 3,31 $\pm$ 0,07 bc            |
| Risciola    | 94,00 $\pm$ 1,15 cd  |                 | 2,67 $\pm$ 1,20 | 3,33 $\pm$ 0,33 ab    | 3,28 $\pm$ 0,06 c             |
| Terranova   | 97,33 $\pm$ 0,88 ab  |                 | 2,67 $\pm$ 0,88 |                       | 3,45 $\pm$ 0,07 b             |
| Torrenova   | 94,67 $\pm$ 0,33 bcd |                 | 3,33 $\pm$ 0,33 | 1,67 $\pm$ 0,33 b     | 3,46 $\pm$ 0,06 b             |
| Verna       | 93,00 $\pm$ 1,15 a   |                 | 3,33 $\pm$ 0,67 | 1,67 $\pm$ 0,33 b     | 3,21 $\pm$ 0,02 cd            |
| Blasco      | 94,00 $\pm$ 1,00 cd  | 1,33 $\pm$ 0,33 | 2,67 $\pm$ 0,67 | 2,00 $\pm$ 0,58 b     | 3,10 $\pm$ 0,04 d             |

Per la commercializzazione del prodotto è richiesto che i semi normali costituiscano almeno l'85% del totale. In generale si può affermare che i grani teneri in collaudate e da collaudare presentano caratteristiche germinative ottimali. I tempi medi di germinazione si attestano su valori tali da considerare il prodotto come dotato di "alto" vigore.

La **purezza specifica** è determinata dalle percentuali (in peso) di seme puro, semi estranei e materiale inerte che compongono il campione. Noto il peso delle tre frazioni (seme puro, seme estraneo, materiale inerte) vengono determinate le percentuali per verificare se il campione risulta idoneo o non idoneo.

In tabella 8 sono riportati i risultati relativi all'analisi della purezza per le 9 varietà testate. La purezza specifica dovrebbe raggiungere il 98% per la prima e la seconda riproduzione e il 99% per la categoria base. Dai risultati dell'analisi si osserva che per le varietà Torrenova, Terranova, Blasco, Verna e Frassineto la percentuale di seme puro è inferiore al 98%, mentre nel caso delle varietà Terrenova e Blasco è risultata rispettivamente dell' 89% e del 97%. Ciò è attribuibile all'elevata percentuale di materiale inerte costituito prevalentemente da seme spezzato riscontrato nel campione, che ha raggiunto punte del circa l'11%, nel caso della varietà Terranova. La non trascurabile presenza di seme spezzato suggerisce che prima della semina i semi vengano sottoposti ad un'adeguata selezione meccanica. In Autonomia B è stato osservato un notevole inquinamento di *Hordeum vulgare* e nel caso del Gentil Rosso è stato ritrovato un seme di *Avena sterilis*. Nella varietà Verna è stata riscontrata una non omogeneità

morfologica e questo potrebbe essere attribuibile ad un inquinamento varietale, seppur un ulteriore approfondimento circa la percentuale di inquinamento è ancora da valutare. Infine, per ridurre la presenza di semi di specie infestanti nel terreno come ad es. *Lolium* spp. sarebbe opportuno effettuare una falsa semina.

**Tabella 8.** Purezza specifica dei semi, espressa in percentuale, delle varietà antiche a confronto con la varietà moderna Blasco.

| Varietà     | Purezza (%) |  |                              |
|-------------|-------------|--|------------------------------|
|             | Seme puro   | Altri semi   | Materiale inerte             |
| Autonomia A | 98,6        | 0,9 <i>Lolium</i> spp. (n,375)   | 0,5 (seme spezzato, detriti) |
| Autonomia B | 99,1        | 0,6 <i>Lolium</i> spp. (n,18); <i>Hordeum vulgare</i> (n,11)   | 0,3 (seme spezzato, detriti) |
| Frassineto  | 96,7        | 0,1 <i>Lolium</i> spp. (n,42)  | 3,2 (seme spezzato, detriti) |
| GentilRosso | 99,0        | 0,2 <i>Lolium</i> spp. (n,45); <i>Avena sterilis</i> (n,1); <i>Vicia villosa</i> (n,1); <i>Rumex crispus</i> (n,1) | 0,8 (seme spezzato, detriti) |
| Risciola    | 99,2        | 0,1 <i>Lolium</i> spp. (n,37)  | 0,7 (seme spezzato, detriti) |
| Terranova   | 89,1        | 0,3 <i>Lolium</i> spp. (n,134); <i>Polygonum lapathifolium</i> (n,1)   | 10,6 (seme spezzato)         |
| Torrenova   | 96,5        | 0,5 <i>Lolium</i> spp. (n,183); <i>Polygonum convolvulus</i> (n,1); <i>Echinochloacrus-galli</i> (n,10)            | 3,0 (seme spezzato, detriti) |
| Verna       | 92,0        | 0,0 <i>Rumex crispus</i> (n,5)   | 8,0 (seme spezzato, detriti) |
| Blasco      | 97,3        | 0,0 <i>Sinapis arvensis</i> (n,3)  | 2,7 (seme spezzato)          |

La **determinazione del numero dei semi estranei**, presenti nel campione analizzato, permette di identificare il numero di semi di tutte le specie diverse da quella del campione oggetto di analisi. Il risultato si esprime riportando il nome botanico del genere e, ove possibile, della specie trovata e il corrispondente numero di seme estraneo su peso del campione analizzato (n. specie/peso in grammi campione analizzato).

In tabella 9 sono riportati i risultati relativi all'analisi della ricerca dei semi estranei per le 9 varietà collaudate e da collaudare. Per effettuare un confronto omogeneo del numero dei semi estranei tra le varietà selezionate, il numero di semi estranei è stato espresso su 400 g di campione analizzato. In questo caso è possibile osservare come la varietà Torrenova riporti la presenza più elevata di semi di *Lolium* spp. (1424), seguita dalla varietà Autonomia A (1326) e Terranova (438), che sono infatti le varietà provenienti dal campo catalogo del CIRAA, seminate ad una densità più bassa rispetto alle altre varietà (300 semi m<sup>2</sup>) e ad una distanza tra le file doppia rispetto a quella adottata presso l'azienda Crocetti. Inoltre, la varietà che riporta la minore presenza di *Lolium* spp. è l'Autonomia B (75 semi) (riprodotta dall'Azienda Crocetti), Di contro, nelle varietà Blasco e Verna non si è riscontrata la presenza di *Lolium* spp. ed il campione è risultato scarsamente contaminato da semi estranei. Da segnalare anche la presenza di *Echinochloacrus-galli* (78 semi) nella varietà Torrenova, *Hordeum vulgare* (26) e *Rumex crispus* (25) in Autonomia B e in GentilRosso, rispettivamente.

### Azione F2.3 Trasferimento di agrotecniche innovative nelle aziende agricole

### Azione F2.5 Test di collaudo volti a verificare il corretto trasferimento dell'innovazione di processo

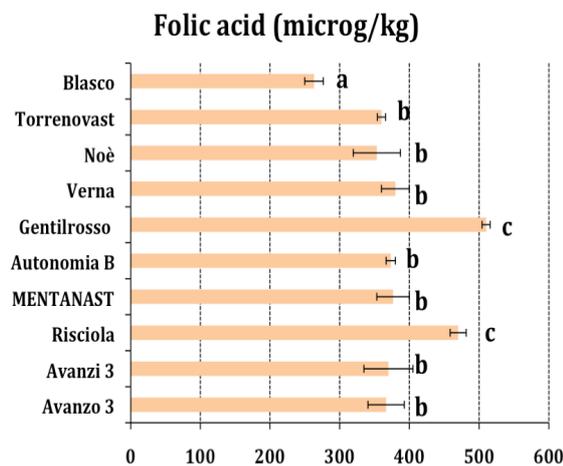
#### PARTNER SSSUP – UNIVERSITÀ PISA

Come da proroga richiesta con posta certificata in data 6 settembre 2013 e accettata con comunicazione del 25 settembre 2013 e variante in corso d'opera del 4 febbraio 2014 (Prot. 1171).

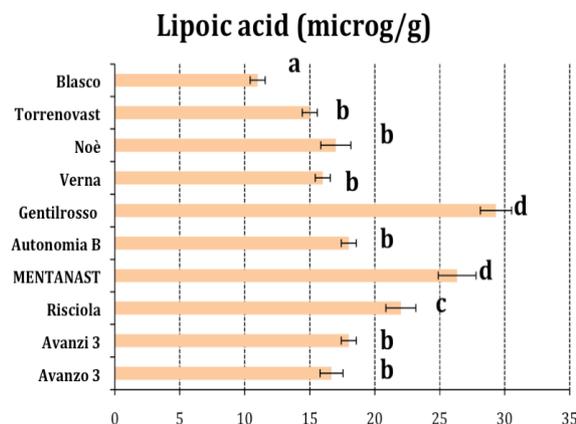
A causa della mancata semina nell'annata agraria 2012-13, e conseguente mancata verifica del corretto trasferimento dell'innovazione di processo nella secondo annata agraria abbiamo inserito nuove attività che non erano comprese nel progetto originario, ma che andavano a completare il collaudo su alcuni aspetti riguardanti la nutraceutica delle farine ottenute dalle

varietà di frumento antiche. Tali analisi hanno riguardato la determinazione dell'acido folico e lipoico (acidi legati alla prevenzione nel rischio di malattie cardiache) su tutte le varietà di grano antiche (più la varietà moderna "Blasco" di controllo) inserite e riprodotte nel campo varietale del Centro Interdipartimentale di Ricerche Agro- Ambientali "E. Avanzi", Università di Pisa- CIRAA- UNIFI. Tali varietà sono in numero di 10 (9 antiche) ed una moderna (Blasco). Le varietà coltivate nell'annata agraria 2011-12 sono state replicate almeno cinque volte più tre repliche tecniche per la determinazione delle sostanze in laboratorio.

Le concentrazioni di acido folico e lipoico in microg/g importanti nella prevenzione delle malattie cardiovascolari sono riportate nelle seguenti figure (Figura 20 e 21). Dalla figura è possibile evidenziare che tutte le varietà antiche hanno concentrazioni sia di acido folico che lipoico superiori alla varietà Blasco di controllo. Questo ci permette di ipotizzare un loro positivo effetto/impiego nella prevenzione delle malattie cardiovascolari mediante un loro consumo nella dieta giornaliera.



**Figura 20.** Concentrazione di acido lipoico nella farine ottenuta da varietà di frumento tenero antiche a confronto con Blasco (varietà moderna).



**Figura 21.** Concentrazione di acido folico nella farine ottenuta da varietà di frumento tenero antiche a confronto con la varietà Blasco (varietà moderna).

Inoltre è interessante osservare come la varietà Gentil Rosso presenti per entrambi gli acidi le più alte concentrazioni e come anche la varietà Risciola mostri caratteristiche nutraceutiche interessanti.

## **Azione F2.6 Realizzazione di prove varietali e riproduzione di sementi di varietà antiche di frumento tenero**

**Partner CiRAA UNIPI**

L'azione F2.6 sostenuta dal partner Centro Interdipartimentale di Ricerche Agro-Ambientali "E. Avanzi", Università di Pisa - CiRAA UNIPI in collaborazione con le 3 aziende agricole, si è realizzata in 2 anni. Di seguito i risultati raggiunti:

### **Attività anno 2011-2012**

#### **a) Prova varietale**

Presso il CiRAA è stata allestita una prova di confronto tra undici varietà antiche (Autonomia B, Avanzi 3, Avanzo 3, Mentana (due provenienze), Torrenova, Noè, Verna, Gentil Rosso (due provenienze) e Risciola) e una moderna (Blasco). Dopo l'opportuna preparazione dei terreni tramite aratura e diversi passaggi necessari per l'affinamento del terreno si è provveduto alla squadratura del campo.

È stata inoltre effettuata la concimazione con 1q/ha di Perfosfato triplo Il 28/11/2011 è avvenuta la semina con seminatrice parcellare, alla distanza interfilare di 12.5 cm. Il 28/12/2011, vista la presenza di numerose malerbe, è stata effettuata la strigliatura e il 3/02/2012 la concimazione con 2 q/ha di nitrato ammonico. Allo scopo di studiare il portamento delle diverse varietà in fase di accostamento il 2/02/2012 è stato eseguito un rilievo campionando 5 piante per parcella secondo la seguente scala :

1= erettofila stretta (angolo < 15)

2= erettofila larga (angolo < 30)

3= intermedia

4= planofila larga (angolo 30-60)

5= planofila piatta (angolo >60)

A partire dal 4/05/2012 e con cadenza settimanale si sono rilevate le fasi fenologiche secondo la scala BBCH. Il 27/06/12 sono stati prelevati due campioni a parcella costituiti da due file adiacenti da 1 metro lineare (totale 4 m lineari) per il conteggio delle spighe. Lo stesso giorno è stata rilevata l'altezza delle piante in ogni parcella. Dal 6/07 sono iniziate le operazioni di trebbiatura con mietitrebbia parcellare, tali operazioni hanno richiesto tempi abbastanza lunghi a causa delle numerose parcelle allettate. Sui campioni raccolti sono state effettuate le determinazioni produttive, biometriche e qualitative. Queste ultime sono state eseguite tramite il Grain Analyzer Infratec 1241.

#### ***Risultati ottenuti***

Alla fase dell'accostamento le diverse varietà avevano essenzialmente un portamento erettofilo largo (valore 2) oppure intermedio (valore 3), la sola varietà Verna ha mostrato un portamento mediamente planofilo largo (valore 4).

Per quanto riguarda le caratteristiche fenologiche si è osservato che la fase di spigatura si è compiuta tra il 24 aprile e il 18 maggio e quella di maturazione tra il 15 e il 25 giugno. Alcune varietà si sono dimostrate più precoci come il Mentana di provenienza Stuard che ha preceduto, portando a compimento questa fase il 24 aprile, la varietà commerciale (Blasco). Le varietà del gruppo più precoce (26 aprile - 1 maggio) erano rappresentate da Autonomia B, Risciola e Mentana provenienza Strampelli. Il gruppo di quelle medie era costituito da Torrenova e Gentil Rosso 3, mentre tra le tardive c'erano: Avanzo 3, Avanzi 3, Gentil Rosso 1, Noè e Verna. La

fase di maturazione non ha fatto osservare differenze così marcate, salvo una leggera maggiore precocità in Autonomia B.

Passando ad analizzare l'altezza delle piante, rispetto al testimone rappresentato dalla varietà Blasco, le altezze delle varietà antiche siano marcatamente maggiori. L'altezza media è risultata infatti di 138 cm con punte massime di 156 cm nel Gentil Rosso 1.

In termini di numero di spighe per metro quadro si è osservato un valore medio di circa 440, con valore minimo di 335 nel Mentana Strampelli e massimo, pari a 557, nell'Avanzi 3.

La produzione media di granella è risultata pari a 3.86 t/ha. Le produzioni più contenute (intorno alle 3 t/ha) sono state quelle di Avanzo 3 e Gentil Rosso 1. Risultati leggermente migliori, ma sempre inferiori alle 4 t/ha si sono osservati in Verna, Noè, Mentana Strampelli, Risciola e Avanzi 3. Tra le 4 e le 5 t/ha erano invece Autonomia B, Blasco, Gentil Rosso 3, e Mentana Stuard. *La varietà più produttiva è risultata Torrenova.*

Il peso ettolitrico è stato in media di 81.5 kg/hl ; Avanzo 3 la varietà con il valore più basso (77) e Blasco quella con il valore più elevato (86). Il peso dei mille semi ha avuto valori compresi tra 37 (Gentil Rosso 1 e Mentana Strampelli) e 46 grammi (Gentil Rosso 3 e Torrenova), con una media di 42 grammi.

Data la taglia elevata delle varietà antiche è stato valutata anche la percentuale di allettamento a maturazione. Come era prevedibile la varietà commerciale, grazie alla sua taglia più contenuta non ha avuto alcun allettamento, mentre molte varietà antiche hanno avuto valori superiori al 50 per cento (Risciola, Torrenova, Mentana Strampelli) e alcune anche tra l'80 e il 90 per cento (Avanzi 3, Avanzo 3, Gentil Rosso 1, Mentana Stuard, Noè).

Qualitativamente le granelle hanno avuto un contenuto medio di proteine sulla sostanza secca di circa 11.5. I valori più elevati si sono osservati in Avanzo 3 (13.0) e Verna (12.4) mentre quelli inferiori (10.5) in Avanzi 3, Autonomia B e Gentil Rosso 3. Per quanto riguarda il contenuto in glutine umido il valore medio era di circa 20.5 %, con valori tra 26 e 24 per Verna, Mentana Strampelli, Blasco e Risciola; tra 23 e 20 per Torrenova, Gentil Rosso 1 e 3, Autonomia B e tra 19 e 18 per Avanzo 3, Avanzi 3, Mentana Stuard e Noé. Il contenuto in amido medio è risultato pari a 58.1 %.

#### *b) Campo Catalogo e Riproduzione semi*

Allo scopo di moltiplicare il materiale di partenza, caratterizzato spesso da quantitativi di seme ridotto e di scarsa germinabilità, è stato allestito presso il CiRAA un campo catalogo comprendente 11 varietà antiche (Torrenova, Mentana, Terranova, Frassineto, Autonomia B, Autonomia A, Gentil Rosso (2 provenienze), Avanzo 3, Noè, Virgilio) .

#### *Risultati ottenuti*

L'epoca di spigatura delle diverse varietà si è situata tra il 28 aprile, per le varietà più precoci (Autonomia B e Mentana), e il 9 maggio per quelle più tardive (Autonomia A e Noè). L'altezza media è risultata di 140 cm; le varietà a taglia maggiore (oltre 150 cm) erano Virgilio e Noé, quelle con taglia più contenuta Autonomia A e Mentana Stuard.

Il numero medio di spighe per metro quadro è stato pari a 319.7.

Relativamente alle caratteristiche produttive si è osservata una produzione media di granella, in termini di sostanza secca, di 3.8 t/ha. Le varietà più produttive hanno raggiunto valori superiori alle 4 t/ha. La varietà con maggiore produzione è stata Virgilio Stuard (4.7), quella con valore inferiore Avanzo 3. Il peso dei mille semi ha avuto valori variabili tra 41 (Gentil rosso 2) e 54 (Terranova) grammi, con un valore medio di 44 grammi. Quello ettolitrico medio è stato di 77 kg/hl.

Alcune varietà sono state particolarmente soggette all'allettamento come Mentana Stuard e Virgilio Strampelli, altre hanno fatto osservare valori molto bassi (Autonomia A e Torrenova). La media è stata di circa il 40%.

Qualitativamente la granella aveva un tenore proteico medio (sulla sostanza secca) abbastanza elevato, pari a circa il 13%. Alcune varietà (Frassineto, Gentil rosso 1, Torrenova) hanno raggiunto valori anche superiori al 14 per cento. Il valore medio di glutine umido è risultato pari al 21.1 % e quello di amido al 58 %.

È stata determinata anche la produzione ottenuta sulle tre strisce utilizzate per la riproduzione dei semi, seminate a San Piero a Grado con le stesse varietà presenti nelle aziende di Montaione. I valori ottenuti sono stati di 35, 15 e 29 quintali per ettaro rispettivamente per Autonomia B, Gentil Rosso 3 e Risciola.

## **Attività anni 2012- 2013 e 2013-2014**

### *a) Prova varietale*

È stata allestita la prova varietale 2012/13 che è stata seminata il 24/10/2012. In tale prova sono state messe a confronto le stesse 11 varietà testate nell'annata precedente.

L'annata agraria è stata caratterizzata da un'importante piovosità durante tutto il ciclo della coltura (oltre 1300 mm da ottobre a giugno) e da temperature minime e massime spesso al di sotto delle medie stagionali, ciò ha avuto riflesso sia sul ciclo colturale di molte varietà che sullo sviluppo della flora infestante e sull'allettamento.

### *Risultati ottenuti*

L'investimento medio è stato di 365 piante/m<sup>2</sup> con valori variabili tra un massimo di 427 (Avanzi 3) e un minimo di 322 (Mentana Stuard). Il numero di infestanti medio era di 33 individui per m<sup>2</sup>. I generi più rappresentati sono stati per le dicotiledoni: *Anagallis*, *Cardamine*, *Cerastium*, *Geranium*, *Papaver*, *Potentilla*, *Poligonum*, *Rumex*, *Sonchus* e *Veronica*, per le graminacee: *Lolium* e *Poa*. Le varietà antiche avevano una altezza media di 126 cm (con il valore massimo di 151 cm per Gentil Rosso 1 e quello minimo di 100 cm per Mentana Stuard) contro i 76 cm della varietà testimone Blasco. Il numero medio di spighe/ m<sup>2</sup> è risultato pari a 326.

Per quanto riguarda le caratteristiche fenologiche si è osservato che la fase di spigatura si è compiuta tra il 15 aprile e il 13 maggio e quella di maturazione tra il 9 e il 21 giugno. Le varietà più precoci in termini di spigatura sono risultate Mentana di provenienza Stuard (la più precoce), Autonomia B, Blasco e Mentana provenienza Strampelli mentre la più tardiva è stata Risciola. La fase di maturazione non ha fatto osservare differenze così marcate, salvo una leggera maggiore precocità in Autonomia B e Mentana Stuard.

Le avverse condizioni meteoriche che si sono avute durante tutto il ciclo della coltura ed anche in fase di maturazione hanno inciso sull'allettamento che è risultato molto significativo in quasi tutte le varietà (a parte il testimone) raggiungendo, in alcune di esse (Avanzo 3, Noè), anche valori del 100 %. Da notare anche la presenza di una significativa infestazione di malerbe, favorita dalle ingenti piogge del periodo primaverile, che si è insediata sulla coltura allettata ricoprendo totalmente le piante. Ciò, in fase di raccolta, ha notevolmente rallentato le operazioni di trebbiatura.

Il numero medio di spighe per metro quadro è risultato pari a 357, la varietà Blasco ha riportato il valore maggiore (407) e il Gentil Rosso 3 quello minore (248). La produzione media è stata di 1.2 t/ha; in generale si sono osservati due gruppi produttivi, quello con produzioni inferiori o uguali a 1 t/ha rappresentato dalle varietà Autonomia B, Avanzi 3, Avanzo 3, Mentana Stuard, Noè e Verna e l'altro con produzioni leggermente superiori rappresentato dalle varietà Blasco, Gentil rosso 1 e 3, Mentana Strampelli, Risciola e Torrenova. Il peso ettolitrico medio è stato di 76, con il valore minimo di 70 in Avanzo 3 e massimo di 83 in Blasco. Il peso dei mille semi ha avuto variazioni tra un minimo di 26.5 grammi (Gentil Rosso 3) e un massimo di 40.2 (Mentana Stuard), con una media di 31.4 grammi. Il contenuto proteico è risultato piuttosto elevato, con

una media pari al 15.4 %, le varietà con il valore più alto sono state Verna, Torrenova e Gentil Rosso 1, quella con il valore più basso è stata Blasco.  
Il contenuto medio in glutine e in amido sono stati del 33,3% e 56,3%, rispettivamente.

## **Azione F2.7 Assistenza tecnica nelle azioni F2.3, F2.4 e F2.5**

### **Partner CiRAA**

Tale azione effettuata a cura del CiRAA si è realizzata nei 3 anni in cui sono state realizzate le coltivazioni.

### **Anno 2011-2012**

Le attività in cui è stato coinvolto il CiRAA relativamente alle aziende partner di Montaione sono state le seguenti:

- supporto nelle operazioni di impianto della coltura, cure colturali, trebbiatura
- monitoraggio della flora infestante (9/03 e il 23/03/2012) tramite un'area saggio di 30\*25 cm e con un numero di lanci di 5 per parcella;
- monitoraggio delle fasi fenologiche secondo la scala BCDH (dal 30/04/2012 fino a compimento delle fasi);
- raccolta delle aree saggio necessarie per il monitoraggio delle caratteristiche produttive (4/07/2011). La raccolta è stata effettuata su 4 aree saggio di 1 m<sup>2</sup> per varietà. Sui campioni raccolti sono state determinate presso i laboratori del CiRAA le caratteristiche produttive. In particolare le determinazioni hanno riguardato: numero spighe, peso fresco paglia, peso secco paglia, spighe e granella, peso ettolitrico, peso 1000 semi. Il numero totale di campioni su cui sono state effettuate le determinazioni è stato pari a 115 per le caratteristiche produttive e 345 per il peso dei 1000 semi;
- determinazioni qualitative sugli stessi campioni (previa pulizia e setacciatura) tramite Infratec 1241. Il totale dei campioni trattati è stato di 115.

### **Anni 2012- 2013 e 2013-2014**

In previsione della semina delle prove nelle aziende partner è stata effettuata, presso il CiRAA, una fase di preparazione del materiale necessario (pulitura seme, preparazione delle dosi di seme, ecc.). *Le avverse condizioni meteoriche che hanno colpito la zona oggetto delle sperimentazioni, in cui si è osservata tra ottobre 2012 e giugno 2013 una piovosità complessiva di circa 1080 mm (dati [www.sir.toscana.it](http://www.sir.toscana.it) per la stazione Gambassi Terme - Poggio Aglione), hanno impedito la semina delle prove di pieno campo in azienda. Per garantire comunque il raggiungimento delle innovazioni e degli obiettivi previsti dal progetto (tra i quali l'introduzione della coltivazione di alcune varietà antiche di frumento tenero che a livello sperimentale avevano mostrato ottime qualità produttive, salutistiche e tecnologiche; la scelta tra queste delle varietà più idonee e l'adozione della tecnica colturale più adatta alle varietà scelte) il CiRAA ha realizzato una prova in cui sono state messe a confronto alcune varietà antiche a densità di semina ridotta (circa il 50% di quella normale). Questa scelta è stata effettuata proprio per saggiare la possibilità di garantire, ad alcune delle varietà antiche più promettenti, la possibilità di portare a compimento il loro ciclo limitando il fenomeno dell'allettamento. In caso di risposta positiva delle varietà alla riduzione della densità, l'informazione potrebbe essere oggetto di immediato trasferimento alle aziende. La coltura inoltre, sempre per rispettare un altro degli obiettivi del progetto (quello di produrre in sistemi colturali a basso impatto ambientale) è stata realizzata somministrando ridotte quantità di azoto.*

#### **c) Prova varietale a bassa densità**

La varietale a bassa densità di semina ha messo a confronto tre fra le varietà che sono risultate le più promettenti tra quelle della prova varietale 2011 (Mentana provenienza Stuard, Autonomia B e Torrenova) e tre fra le migliori del campo catalogo (Frassineto, Terranova e Autonomia A).

Nei mesi dopo la raccolta si sono completate, sulla granella, le determinazioni delle caratteristiche produttive e quelle analitiche.

### *Risultati*

L'investimento medio è risultato di 187 piante/m<sup>2</sup> con valori variabili tra un massimo di 202 (Autonomia A) e un minimo di 173 (Autonomia B). Il numero di infestanti medio era di 30 individui per m<sup>2</sup>. Le varietà avevano una altezza media di 115 cm (con il valore massimo di 138 cm per Terranova e quello minimo di 92 cm per Mentana Stuard).

Per quanto riguarda le caratteristiche fenologiche si è osservato che la fase di spigatura si è compiuta tra il 19 aprile e il 19 maggio e quella di maturazione tra l'8 e il 23 giugno. La varietà in assoluto più precoce in termini di spigatura è risultata Mentana di provenienza Stuard mentre la più tardiva è stata Autonomia A.

Anche in questo caso si è osservato l'allettamento, anche se in maniera inferiore rispetto alla prova precedente; in particolare le varietà più colpite sono state Torrenova e Frassineto, mentre Autonomia A e B sono apparse le più resistenti. Anche qui è risultata importante la presenza delle malerbe soprattutto dove le piante erano allettate.

Il numero medio di spighe/ m<sup>2</sup> è risultato pari a 231. La produzione di granella media è stata piuttosto contenuta ed è risultata pari a 1.1 t/ha; alcune varietà come Autonomia B, Mentana Stuard e Torrenova hanno avuto produzioni al di sotto della media, mentre le altre sono state mediamente più produttive. Autonomia A ha conseguito il risultato migliore con 1.6 t/ha. I valori medi del peso ettolitrico e di quello dei 1000 semi sono stati, rispettivamente, pari a 77 kg/hl e 34.2 grammi.

Il contenuto proteico variava tra il 13.2 e il 15.8 %, con una media del 15.1 per cento. Il valore medio del contenuto in glutine è risultato pari al 33 % e quello in amido al 57 %.

### **Azione F3.4 Test per la valutazione delle caratteristiche tecnologiche delle farine ottenute dalla coltivazione di frumento da varietà antiche con il metodo di agricoltura integrata (AGRIQUALITA') e/o biologica; test per la valutazione delle caratteristiche chimico-nutrizionali e di stabilità ossidativa dei pani**

#### **Capofila Newcopan**

Newcopan ha eseguito la collezione e la macinazione delle granelle delle diverse varietà antiche di frumento e della varietà Blasco moderna a confronto. Nel dettaglio le farine delle varietà (tre repliche per ogni varietà) Autonomia B, Avanzi 3, Avanzo 3, Gentil Rosso 1, Gentil Rosso 3, Mentana S, Mentana ST, Noè, Risciola, Torrenova ST, Verna (varietà antiche) e Blasco (varietà moderna) ottenute dalla prova varietale realizzata presso il CIRAA (A6) e le varietà (Verna, Gentil Rosso, Risciola, Autonomia B, Verna-Blasco e Blasco) coltivate in pieno campo presso l'azienda Crocetti (A8) sono state analizzate per i seguenti parametri tecnologici: umidità, alveogramma di Chopin (Fattore W, coefficiente P, coefficiente G, Coefficiente L, rapporto P/L ed umidità), farinogramma di Brabender (assorbimento dell'acqua, tempo di sviluppo, grado di rammollimento a 12 minuti, numero di qualità farinografica, stabilità b). La concentrazione dell'acido folico è inoltre stata determinata sui campioni di farina ottenuti dai collaudi in pieno campo realizzati presso l'azienda Crocetti A8 (tutte le varietà sopra elencate eccetto i mix).

Per l'esecuzione della suddetta azione Newcopan si è avvalsa della gentile collaborazione a titolo non oneroso, di Cerealìa Srl ed Unicoop Firenze scarl.

**Azione F3.5 Realizzazione di prove di panificazione utilizzando la farina e miscele di farina ottenute dalla granella delle varietà antiche selezionate, realizzazione di test sperimentali per la messa a punto dell'impasto migliore che riesce ad esaltare le caratteristiche tecnologiche delle farine**

**Capofila Newcopan**

Newcopan ha eseguito prove di panificazione con le farine delle seguenti varietà antiche Autonomia B, Gentil Rosso, Risciola, Verna (varietà antiche) e Blasco (varietà moderna a confronto). Il pane ottenuto è stato sia distribuito per il panel test e il consumer test eseguiti dal partner A3 Scuola Superiore Sant'Anna, sia distribuito al partner A4 per i test sui pazienti. Per l'esecuzione della suddetta azione Newcopan si è avvalsa della gentile collaborazione a titolo non oneroso, di Cerealia Srl ed Unicoop Firenze scarl.

**Azione F3.6 Passaporto molecolare: caratterizzazione morfologica e molecolare della pasta acida e caratterizzazione molecolare delle farine**

**Partener SSSUP – Università Pisa**

Per l'esecuzione della suddetta azione Newcopan si è avvalsa della gentile collaborazione, a titolo non oneroso, di Cerealia Srl.

Il Panificio Cerealia Srl utilizza l'impasto acido come agente lievitante abbinato al panetto industriale. Contemporaneamente al campionamento, sono state raccolte informazioni dettagliate sulla tecnica di panificazione seguita dallo stesso panificatore. Di seguito si riporta la scheda tecnica di panificazione del panificio oggetto del presente collaudo.

La tecnologia di panificazione è quella **indiretta**.

Il panificio utilizza farina con le seguenti caratteristiche:

1. Tipo "00" (200W P/L 0,55)

La lavorazione procede preparando prima il LIEVITINO, un impasto composto solo da farina e pasta acida (fermento vecchio + ultimo impasto del pane) che riposa 24h.

A questo punto si prepara il FERMENTO, un impasto composto da una parte di LIEVITINO, farina tipo 00, acqua e lievito per panificazione (lievito di birra liquido); il fermento riposa circa 6 ore a temperatura ambiente.

La lavorazione dell'impasto del pane comincia quindi con un impasto costituito da:

- farina tipo 00: 150kg
- acqua: 96l
- fermento toscano: 53.7kg
- lievito di birra (lievito liquido) 1.5l pari a 0.5% sul totale della farina

1. Gli ingredienti vengono impastati per 5 min. con una impastatrice a spirale, alla prima velocità e per 10 minuti con in seconda velocità

2. L'impasto viene quindi spezzato e formato con macchine spezzatrici automatiche;

3. L'impasto poi lievita per 1h1/2, a 30-35°C e U.R.=55-60%

4. La cottura è in forno a tunnel, alimentato a gas metano, a 200-220°C, per un tempo di 60 minuti.

Ogni lavorazione, esclusa la sosta di 24h del primo impasto, dura quindi 3h circa e porta alla produzione di 11.5q di pane, in forme da 1kg.

Per tale panificio sono stati presi in considerazione i seguenti campioni: impasto acido maturo (ossia subito prima di essere utilizzato per la lavorazione della giornata), impasto finale (cioè pasta del pane pronta per la cottura), farina e lievito industriale (3 repliche per ogni matrice). I

campioni di impasto acido maturo (d'ora in poi indicato come madre acida), impasto finale e panetto sono stati sottoposti ad analisi nella stessa giornata del campionamento, mentre le farine sono state conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$ , per analizzarle in seguito. Sui campioni di madre acida ed impasto finale è stato misurato innanzitutto il pH, ed inoltre sia sulle precedenti matrici che sul panetto è stata eseguita la conta vitale dei diversi gruppi di microrganismi. La conta è stata ottenuta con la tecnica delle diluizioni successive e della semina per spatolamento su piastre contenenti terreni selettivi, idonei per la conta e l'isolamento di bacilli, cocchi e lieviti. Sono stati pesati 10 g rispettivamente di madre acida, impasto finale e panetto. I quantitativi così ottenuti sono stati messi in buste prepesate per omogeneizzatore e in ogni busta sono stati aggiunti 90 ml di soluzione triptonata sterile. Il tutto è stato poi omogeneizzato con omogeneizzatore peristaltico Stomacher per 2' a 260 rpm. A partire dall'omogenato così ottenuto sono state allestite le opportune diluizioni decimali scalari, utilizzando lo stesso diluente. Nello specifico, per ognuno dei campioni analizzati viene preparata una serie di provette da 15 ml, ciascuna contenente 9 ml di soluzione triptonata sterile. L'omogenato ottenuto dallo Stomacher è una diluizione pari a  $10^{-1}$ . Un ml di tale diluizione viene trasferito nella prima provetta e si ha così una diluizione di  $10^{-2}$ . Questa nuova soluzione è vortexata per assicurare un'omogenea distribuzione dei microrganismi presenti. Ne viene quindi prelevato 1 ml che sarà aggiunto ad una seconda provetta per avere la diluizione  $10^{-3}$ . Si procede così per diluizioni successive fino ad arrivare alla diluizione  $10^{-9}$ . Da ciascuna delle diluizioni ottenute sono stati prelevati 100  $\mu\text{l}$  e sono stati trasferiti in piastre Petri sterili già contenenti i terreni selettivi per la conta e l'isolamento. L'aliquota è stata quindi distribuita su tutta la superficie della piastra con spatole monouso sterili, fino al completo assorbimento. Le piastre Petri così inoculate sono state messe ad incubare nelle seguenti condizioni: quelle utilizzate per l'isolamento dei batteri lattici, in anaerobiosi, ottenuta attraverso l'utilizzo di buste per l'anaerobiosi AnaeroGen<sup>TM</sup>, OXOID, a  $30^{\circ}\text{C}$  per 3 giorni; quelle utilizzate per l'isolamento dei lieviti, in aerobiosi, a  $30^{\circ}\text{C}$  per 2-3 giorni. Trascorso il periodo di incubazione, è stata eseguita la conta vitale, che serve ad avere una valutazione quantitativa della microflora presente nei campioni. La conta viene effettuata sulle piastre alle diluizioni più alte ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$ ), ossia su quelle che hanno un numero di colonie compreso tra 30 e 300. I terreni utilizzati per le conte vitali sono stati:

1. per l'isolamento dei batteri lattici: MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, 1960) agar modificato (Gobbetti et al., 1996), acidificato a pH 5.6, per l'isolamento dei lattobacilli; GM17 agar (Horn et al., 1999; van der Heide e Poolman, 2000), per l'isolamento dei lattococchi, e SETTEBELLO (sintesi tra il terreno SDB di Sughiara e il terreno di Vogel), acidificato a pH 5.6, per l'isolamento di *Lactobacillus sanfranciscensis*, terreno così chiamato perché nella sua formulazione sono previsti 7 g/L di ciascuno degli zuccheri utilizzati;

2. per l'isolamento dei lieviti: WL (Green e Gray, 1950; Hall, 1971).

A ciascuno dei terreni utilizzati per l'isolamento di batteri lattici sono stati aggiunti, dopo sterilizzazione a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15 min. e pressione di 1 atm, 300  $\mu\text{g/ml}$  di actidione, per inibire lo sviluppo dei lieviti (Coppola, 1996; Gobbetti et al., 2001). E' stata utilizzata una soluzione di actidione preparata sciogliendo 0.6 g di polvere in 20 ml di etanolo e sterilizzando il tutto per filtrazione con filtri da 0.2  $\mu$ . Al terreno WL invece sono stati aggiunti, prima della sterilizzazione, 250  $\mu\text{g/ml}$  di cloramfenicolo, per inibire la crescita dei batteri (Gobbetti et al., 2001; Meignen et al., 2001). La soluzione di cloramfenicolo aggiunta al terreno è stata ottenuta sciogliendo 0.2 g di polvere in 3 ml di etanolo.  $7 = 10$

In tabella 10 sono riportati i dati relativi ai valori di pH della pasta acida e impasto finale. Tali valori sono in linea con ciò che si trova in letteratura, dove si osservano valori di pH della madre acida e dell'impasto finale, che variano tra 3.1 e 5.2 e tra 3.2 e 5.5, rispettivamente. In tabella 11 e 12 sono riportati i dati relativi alle conte vitali su madre acida, impasto finale e panetto commerciale utilizzati da Newcopan.

**Tabella 10.** Valori di pH della madre acida e dell'impasto finale.

| Matrice        | pH  |
|----------------|-----|
| Madre acida    | 3.8 |
| Impasto finale | 3.3 |

**Tabella 11.** Conte vitali delle madre acida e dell'impasto finale.

| Matrice        | GM17<br>UFC/g     | mMRS<br>UFC/g     | SETTEBELLO<br>UFC/g | WL<br>UFC/g       |
|----------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Madre acida    | $2.8 \times 10^4$ | $6 \times 10^8$   | $2.8 \times 10^8$   | $1.1 \times 10^7$ |
| Impasto finale | $5 \times 10^5$   | $1.4 \times 10^8$ | $4.1 \times 10^7$   | $4.9 \times 10^7$ |

**Tabella 12.** Conta vitale del panetto commerciale.

| Matrice             | WL<br>UFC/g     |
|---------------------|-----------------|
| Panetto commerciale | $2 \times 10^9$ |

L'identificazione dei batteri lattici è stata eseguita mediante sequenziamento di una frazione del 16S rDNA (amplificazione di un frammento di 340-360 bp; primer universali per gli eubatteri: Y1 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCCCG-3' e Y2 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', disegnati su regioni altamente conservate dell'operone ribosomiale) secondo quanto descritto da Ward et al. (1998) e da Young et al. (1991). I criteri fisiologici e biochimici comunemente utilizzati per l'identificazione fenotipica di isolati di batteri lattici sono spesso ambigui, in quanto molto simili fra le diverse specie e variabili a livello di ceppi (Vandamme et al., 1996).

Recentemente la disponibilità di metodi genotipici di indagine, basati sullo studio di marcatori molecolari, ha permesso una più efficace e rapida identificazione delle diverse specie di lattobacilli e lattococchi. Il 16S rDNA si è rivelato uno dei marcatori filogenetici più conosciuti ed affidabili, poiché è una molecola costante dal punto di vista funzionale, presente in tutti i batteri e composto sia da regioni altamente conservate, che da regioni variabili (Vandamme et al., 1996). Le regioni più conservate permettono di risalire ai primi livelli evolutivi, mentre quelle più variabili portano informazioni sugli ultimi stadi delle relazioni filogenetiche (Ehrmann, Ludwig e Schleifer, 1994). Fra le regioni codificanti le tre unità ribosomiali, le più affidabili come marcatori molecolari per studi filogenetici sono quelle di dimensioni maggiori, come il 16S rDNA e il 23S rDNA, mentre il valore informativo di sequenze brevi (5S rDNA) è, in confronto, scarso. Ogni singola sequenza, infatti, porta informazioni relative ad un piccolo intervallo di tempo evolutivo ed un numero elevato di posizioni o regioni che mutano in maniera indipendente accresce il numero di livelli filogenetici che si possono individuare. Per tali ragioni il sequenziamento di una porzione del 16S rDNA è stato utilizzato per identificare in modo rapido ed efficace gli isolati ottenuti nel corso della sperimentazione. Tuttavia è stata necessaria un'ulteriore indagine molecolare, basata sull'amplificazione via PCR specie-specifica di una porzione del gene *recA*, per poter distinguere tra le specie *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* e *Lb. pentosus*, isolate in maniera non discriminante dal sequenziamento del 16S rDNA, a causa di un'alta omologia a livello dell'operone ribosomiale.

Sono stati usati i seguenti primer: *paraF* (5'-GTCACAGGCATTACGAAAAC-3'), *pentF* (5'-CAGTGGCGCGGTTGATATC-3'), *planF* (5'-CCCTTTATGCGGAACACCTA-3') in combinazione con il primer *pREV* (5'-TCGGGATTACCAAACATCAC-3') (Torriani et al., 2001).

I risultati relativi al sequenziamento del 16S rDNA sono riportati nella tabella 13, per quanto riguarda gli isolati ottenuti dalle madri acide. Dalla tabella 13 si vede come la maggior parte degli isolati appartenga al gen. *Lactobacillus*, ma vi siano anche rappresentanti dei generi *Leuconostoc* e *Lactococcus*, come è da attendersi per madri ad associazione labile quali quelle impiegate nella produzione di pane (Foschino et al., 1995). Inoltre, la tabella 14 mostra la frequenza delle specie isolate.

**Tabella 13.** Risultati preliminari del sequenziamento dai campioni di madre acida. I numeri identificativi di ciascun isolato sono indicati con tre colori diversi, che rappresentano i tre diversi terreni (verde: GM17; rosso: mMRS; blu: SETTEBELLO) su cui è stato fatto il primo isolamento.

| Codice preliminare di riferimento | Isolati  |
|-----------------------------------|--|
| 1                                 | <i>Lactobacillus curvatus</i> 100%                                       |
| 2                                 | <i>Lactobacillus curvatus</i> 97%  |
| 3                                 | <i>Leuconostoc citreum</i> 99% - <i>Leuconostoc argentinum</i> 98%       |
| 4                                 | <i>Lactococcus garvieae</i> 100% - <i>Enterococcus seriolicida</i> 100%  |
| 5                                 | <i>Lactobacillus casei</i> 100% - <i>Lactobacillus paracasei</i> 100%    |
| 104                               | <i>Lactobacillus plantarum</i> 99% - <i>Lactobacillus pentosus</i> 99%   |
| 105                               | <i>Lactobacillus plantarum</i> 99% - <i>Lactobacillus pentosus</i> 99%   |
| 106                               | <i>Lactobacillus casei subsp. carnosus</i> 90%                           |
| 107                               | <i>Lactobacillus plantarum</i> 100% - <i>Lactobacillus pentosus</i> 100% |
| 108                               | <i>Lactobacillus plantarum</i> 100% - <i>Lactobacillus pentosus</i> 100% |
| 209                               | <i>Lactobacillus plantarum</i> 99% - <i>Lactobacillus pentosus</i> 99%   |
| 210                               | <i>Lactobacillus plantarum</i> 99% - <i>Lactobacillus pentosus</i> 99%   |
| 211                               | <i>Lb. sanfranciscensis</i> 100%   |
| 212                               | <i>Lb. sanfranciscensis</i> 100%   |
| 213                               | <i>Lb. sanfranciscensis</i> 100% - <i>Lb. lindneri</i> 96%               |

**Tabella 14.** Frequenze delle specie isolate.

| Microorganismi   |     |
|--|-----|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> o <i>Lactobacillus pentosus</i> | 60% |
| <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>                          | 30% |
| Altri  | 10% |

Relativamente alla possibilità di certificare la presenza di varietà antiche di frumento tenero nel prodotto finale (farine e pane), si è costruito un protocollo che mediante l'utilizzo di marcatori molecolari permettesse di caratterizzare le farine impiegate nel processo di panificazione al fine di identificare eventuali contaminazioni con farine da frumento di varietà moderne. La stesura del "passaporto molecolare", certificando la presenza di specifiche varietà di frumento, garantisce quindi la tracciabilità della filiera costituita da grani teneri antichi.

#### *Metodi molecolari per l'identificazione genetica dei frumenti a statura alta e bassa, ovvero per la distinzione tra varietà antiche e moderne*

Disporre di uno strumento in grado di discriminare le varietà moderne da quelle antiche implica la possibilità di poter identificare la presenza di evidenze di varietà moderne all'interno di prodotti che non dovrebbero contenerle.

La certificazione degli sfarinati e dei prodotti trasformati è la più "complessa" poiché non può avvalersi di marcatori morfologici o biochimici (come i profili elettroforetici di proteine di riserva della cariosside, ad es. le glutenine) ma può basarsi solo sull'utilizzo di marcatori molecolari.

I marcatori genetici molecolari rientrano tra le tecniche più diffuse di laboratorio e si basano sull'evidenziazione di mutazioni e/o variazioni individuate sui frammenti di DNA isolati nella matrice alimentare in esame. Nel caso degli sfarinati, al momento che entrano nei processi di trasformazione e produzione del pane, sarà sufficiente prelevare un piccolo campione per isolare una quantità appropriata di DNA al fine delle indagini molecolari.

Il criterio di uso di questi marcatori si basa sul principio della presenza/assenza: un marcatore di un genoma specifico è presente in concomitanza al contributo genomico della specie o varietà indesiderata o del contaminante. Nel caso specifico, l'analisi molecolare dei frumenti finalizzata all'identificazione genetica, si basa sul polimorfismo intraspecifico dovuto a variazioni della sequenza del DNA indotte naturalmente. I marcatori molecolari sono necessari a evidenziare, visualizzare e quantificare le mutazioni del DNA.

La certificazione proposta (il "passaporto molecolare") si propone come strumento in grado di

discriminare le varietà moderne da quelle antiche ed è quindi indispensabile per la verifica di eventuali contaminazioni e/o misture con farine di varietà di frumento non idonee, a garanzia della qualità nutrizionale del prodotto finale. La certificazione dei prodotti comporta che le singole unità tassonomiche del frumento (varietà) siano distinte all'interno dei prodotti di post raccolta di prima e seconda trasformazione.

Quest'approccio si basa sull'identificazione di mutazioni recenti su un particolare gene che permette di discriminare le varietà di frumento a statura bassa da quelle a statura alta.

I frumenti "antichi" sono infatti caratterizzati da una statura alta (generalmente superiore ad 1 m) mentre le varietà "moderne", per effetto del trasferimento del gene Rht (reduced height), dal Norin 10 (una varietà giapponese non più in uso) sono tutte a statura bassa. Le varietà moderne di frumento comunemente coltivate appartengono al frumento tenero *Triticum aestivum* (2n=6X=42; genoma AABBDD) che è esaploide. La mutazione sopracitata marca sia il genoma B (locus Rht-B1b) che il genoma D (locus Rht-D1b) del grano tenero.

Tramite la messa a punto di un metodo PCR (Polymerase Chain Reaction) è possibile evidenziare la presenza di questa mutazione puntiforme e identificare così nei prodotti di post-raccolta la presenza di contaminazioni da varietà moderne tramite una semplice reazione.

Di seguito è descritto il protocollo utilizzato per il completamento del passaporto molecolare:

#### 1. Pre-requisiti per l'analisi

- Presenza di DNA nel prodotto da essere analizzato (farine o pane).
- Qualità, purezza quantità del DNA estratto sufficientemente elevate nel campione analizzato

#### 2. Estrazione DNA da matrice

Il primo passaggio in laboratorio consiste nell'estrazione del DNA dalla matrice alimentare, che può essere sia farina che il prodotto finale trasformato (pane). Esistono diversi kit commerciali le cui soluzioni sono già predisposte per l'uso e il tipo di kit utilizzato dipende dal tipo di campione/matrice che dovrà essere analizzato. Il kit utilizzato (DNeasy Tissue Kit) ha una metodologia basata su membrane di gel di silice al fine di isolare il DNA cellulare in maniera rapida ed efficiente, senza la necessità di utilizzare solventi organici (come ad esempio fenolo o cloroformio). La procedura dei kit prevede diversi passaggi che portano ad estrarre gli acidi nucleici dalla matrice e a purificare il DNA estratto da qualsiasi reagente che potrebbe compromettere i successivi passaggi.

Prima dell'estrazione del DNA dalla matrice può essere necessario un pretrattamento di frantumazione meccanica del campione. L'omogeneizzazione del campione avviene utilizzando un "mulino" che mediante sfere metalliche esercita un'agitazione ad elevata frequenza sul campione in provetta e ne determina la frantumazione.

#### 3. Quantificazione e controllo della purezza del DNA estratto

La quantificazione del DNA estratto viene stimata mediante una lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm ( $\lambda$ ). I campioni di DNA estratto da analizzare vanno diluiti nel rapporto 1:50 (es. 20  $\mu$ L di DNA estratto + 980  $\mu$ L di acqua deionizzata).

Per determinare il grado di purezza del campione occorre valutare il rapporto tra l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e 280 nm. Se il rapporto ha un valore  $< 1,8$  il campione è sporco (es. presenza di proteine); se è compreso tra 1,8-2.0 il grado di purezza è idoneo; se questo rapporto è  $>$  di 2.0 il campione è contaminato da cloroformio o fenolo e va quindi riprecipitato con etanolo, prima di procedere con ulteriori passaggi.

#### 4. Amplificazione del DNA e scelta del marcatore molecolare

Alla base dello sviluppo di gran parte dei marcatori molecolari oggi più utilizzati c'è la reazione a catena della polimerasi (PCR=Polymerase Chain Reaction). La PCR è una tecnica utilizzata per amplificare porzioni brevi di sequenza di DNA. La tecnica permette ad un piccolo ammontare di molecole di DNA iniziali (DNA target) di essere amplificato molte volte in modo esponenziale, in

presenza di due primers (che determinano l'inizio e la fine della regione che necessita di essere amplificata) e di un enzima che catalizza il processo di amplificazione (Taq polimerasi).

In questa fase è fondamentale la scelta della coppia di primer che determina l'amplificazione del marcatore molecolare prescelto e quindi la buona riuscita dello screening genetico.

Nel caso del "passaporto molecolare", volto a discriminare varietà di frumento antiche da varietà di frumento moderne, la ricerca del marcatore molecolare si è concentrata sul gene responsabile del nanismo (Rht) e tipico delle varietà moderne.

Per il cromosoma 4B, il primer forward BF combinato con il primer reverse WR1 produce una reazione positiva (banda di circa 250 bp) per le varietà antiche (Tabella 12). Il primer forward BF in combinazione con il reverse MR1 (Tabella 12), permette invece di evidenziare la presenza del genoma delle piante a bassa statura (varietà moderne di frumento tenero) con una singola reazione di PCR (da Ellis et al. 2002).

Per il cromosoma 4D (Tabella 15), il primer forward DF2 in combinazione con WR2 produce una reazione positiva (banda di circa 300 bp) per le varietà antiche. Quando il primer forward DF2 viene combinato con il reverse MR2 il genoma delle piante a bassa statura (varietà moderne di *T. aestivum*) sarà rintracciato con una singola reazione (da Ellis et al. 2002).

I prodotti di PCR si sono poi separati su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante elettroforesi orizzontale utilizzando bromuro di etidio.

In conclusione la presenza di un'eventuale "contaminazione" da farine di varietà moderne sarà evidenziata dalla presenza di una banda (= reazione positiva della PCR) quando si utilizzano le coppie di primer BF/MR1 o DF2/MR2.

**Tabella 15.** Elenco primer utilizzati nel protocollo.

| Nome primer | Sequenza primer                 |
|-------------|---------------------------------|
| BF          | 5' -GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG-3'    |
| WR1         | 5'-CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTG-3'  |
| MR1         | 5'- CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTA-3' |
| DF2         | 5'-GGCAAGCAAAGCTTCGCG-3'        |
| WR2         | 5'-GGCCATCTCGAGCTGCAC-3'        |
| MR2         | 5'-CCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA-3'   |

Di seguito è descritto il protocollo utilizzato per l'amplificazione dei marcatori genetici tramite PCR. Il volume totale della reazione di PCR è di 20 µl.

In ciascuna provetta il mix di reazione per la PCR è:

- 1 × Hotstar Buffer,
- 1 × Hotstar Q solution,
- 100 ng di DNA (estratto e purificato),
- 4 nmol of dNTPs (nucleotidi),
- 10 pmol sia del primer forward (BF) che reverse (WR1 o MR1),
- 1 unità di Taq polimerasi (enzima)

I cicli di PCR utilizzati sono stati i seguenti (adattati da Ellis et al., 2002):

- 5 min a 94 °C;
- 7 cicli "touchdown" di 30 s a 94 °C,
- 30 s a 65 °C,
- 80 s a 72 °C (con un gradiente di 1°C in temperatura di "annealing" per ogni ciclo);
- 30 cicli di 15 s a 94 °C, 15 s a 58 °C, 50 s a 72 °C.

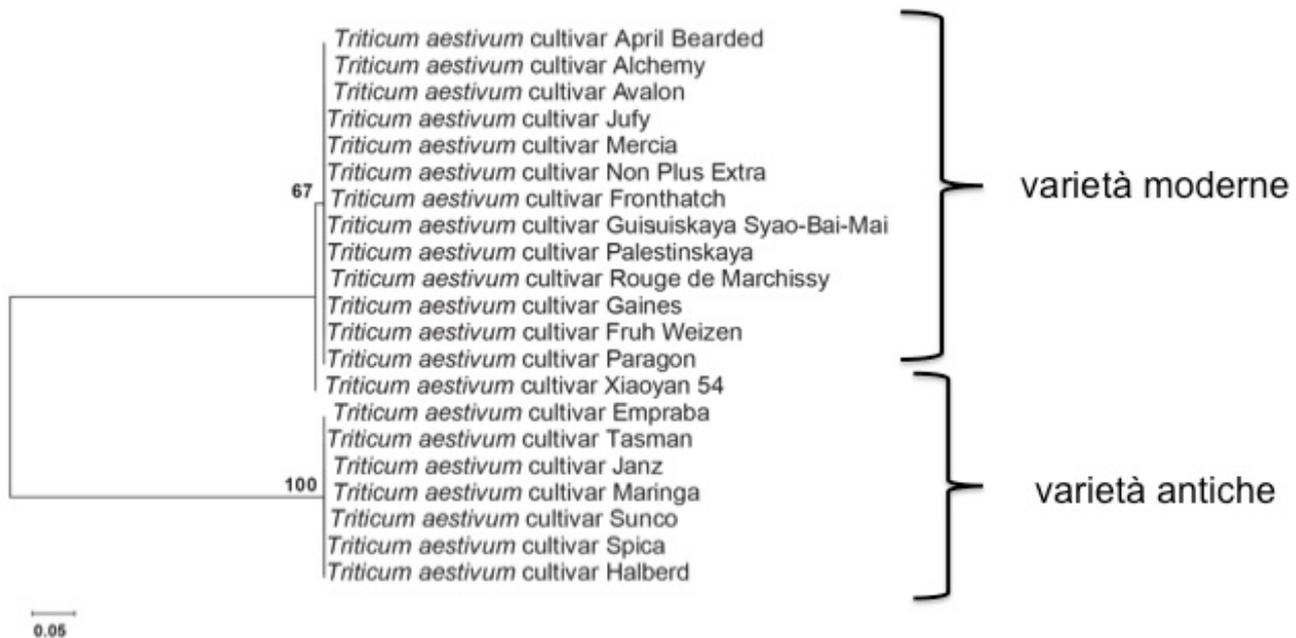
## 5. Analisi filogenetica

Per comprovare la validità dei marcatori molecolari scelti si è proceduto all'analisi filogenetica.

La procedura ha previsto il sequenziamento del DNA estratto durante la fase 1.

Il sequenziamento è avvenuto mediante tecnica Sanger e tramite la più moderna tecnica di pirosequenziamento.

Le successive analisi bioinformatiche hanno portato alla costruzione di un albero filogenetico (Figura 12) che evidenzia come la coppia di marcatori molecolari scelti permetta di distinguere filogeneticamente le varietà antiche da quelle moderne di frumento.



**Figura 12.** Albero filogenetico rappresentante 21 diverse varietà di frumento tenero (*Triticum aestivum*). L'utilizzo del marcatore molecolare che evidenzia la presenza/assenza del gene nanizzante (RhT) permette di discriminare le varietà antiche da quelle moderne.

### **Azione F3.7 Panel e consumer test per la valutazione della qualità organolettica del pane e delle preferenze dei consumatori Partner SSSUP (in collaborazione con CiRAA)**

Nel marzo 2014 il CiRAA ha predisposto e realizzato insieme al partner A3 (SSSUP) il panel test (azione 3.7) relativo alla valutazione organolettica di pani panificati con farine delle varietà antiche e della varietà commerciale, provenienti da quelle testate nelle prove in azienda. Si riassumono i risultati del panel test e del consumer test

#### *a) Panel test*

Un gruppo di 15 assaggiatori, uomini e donne, di età compresa tra 28 e 55 anni, è stato arruolato come membri di un panel organizzato dalla Scuola Superiore Sant'Anna. Ogni panelista, in modo autonomo e isolato dagli altri, ha eseguito la degustazione di ciascun campione di pane preparato con le diverse varietà antiche di grano tenero e la varietà moderna di confronto, seguendo le indicazioni fornite dal panel leader. Durante il test, sono state assaggiate 5 diversi pani ottenuti dalle seguenti varietà di grano tenero:

- 1 varietà moderna: BLASCO;
- 4 varietà antiche: Autonomia B, Gentil Rosso, Risciola e Verna.

Il metodo ha considerato la valutazione dei principali parametri visivi e sensoriali del pane (colore, croccantezza, spessore, friabilità, elasticità, masticabilità e sapore). Gli assaggiatori sono stati chiamati ad esprimere il loro giudizio e a valutare l'intensità di ogni descrittore assegnando un punteggio compreso tra 1 (assenza della sensazione) e 9 (sensazione

estremamente intensa). I 13 parametri di qualità valutati su ciascuno dei cinque pani ottenuti dalle varietà sopra elencate sono stati:

| VISIVI  | ODORE  | STRUTTURALI  | GUSTO  |
|---|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>•Colore crosta</li> <li>•Umidità mollica</li> <li>•Alveolatura mollica</li> <li>•Sviluppo</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>•Odore globale</li> <li>•Odore cereali</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>•CROSTA</li> <li>•Durezza crosta</li> <li>•Croccantezza crosta</li> <li>•MOLLICA</li> <li>•Coesitività</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>•Dolce</li> <li>•Acido</li> <li>•Sapore Globale</li> <li>•Sapore Cereali</li> </ul> |

### *Parametri visivi*

Il primo parametro valutato dal gruppo di osservatori è stato il colore della crosta, ovvero di giudicare la caratteristica doratura della superficie. Il giudizio doveva essere espresso in una scala da 1 a 9 dove 1 corrispondeva al colore arancio e 9 al colore ambrato.

Le varietà Autonomia B e Verna sono risultate al 70% delle osservazioni con un colore della crosta ambrato, al pari della varietà Blasco (moderna). Il Risciola è risultata essere la varietà dal colore della crosta meno ambrato.

Il secondo descrittore è stato l'umidità della mollica, ovvero la percezione di umido che viene percepita o con il contatto delle mani o delle labbra. Le varietà AutonomiaB e Verna sono quelle con parametri ottimali di umidità per più del 30% degli osservatori. Il Gentil rosso è stato percepito dal 66.7% degli osservatori come varietà che non presenta valori ottimali di umidità della mollica. Il Blasco presenta invece valori medi e si evidenzia una maggiore soggettività nel giudizio.

Il terzo descrittore è stato l'alveolatura della mollica, indice della porosità della mollica stessa. Per il 73% degli osservatori la porosità della mollica della varietà moderna Blasco è ridotta o assente e presenta quindi una "struttura" più compatta. Mentre il Verna, il Risciola (86%) e l'Autonomia B presentano una porosità più fine e quindi ottimale.

Anche il descrittore dello sviluppo, che è un indice indiretto della porosità della mollica conferma i precedenti risultati: la varietà più compatta è il Blasco (93% delle osservazioni). Il Verna ha invece una mollica più soffice/spugnosa (93%).

### *Parametri dell'odore*

Il secondo set di parametri descrittivi riguardava i parametri relativi all'odore globale, ovvero crosta e mollica e dei cereali.

Nessuna varietà è stata giudicata avere il massimo dell'intensità di odore totale. Ad ogni modo, solo le varietà antiche sono risultate avere un'intensità di odore sopra al livello 7. Per quanto riguarda la varietà moderna del Blasco, essa è stata giudicata avere un'intensità di odore che variava da una media intensità (60%) fino ad essere quasi impercettibile (40%).

Il giudizio relativo all'intensità di odore dei cereali rispecchia i dati precedenti: sono le varietà antiche ad avere un'intensità odorifera maggiore.

### *Parametri strutturali*

Passando alla valutazione dei parametri strutturali, per quanto riguarda la crosta sono stati presi in esame i parametri descrittivi della durezza e croccantezza. La durezza è stata quantificata come la resistenza che il prodotto oppone alla masticazione valutata nei primi 2-3 atti della masticazione. Mentre la croccantezza è il modo di frantumazione della crosta, valutata spezzando la crosta con le mani ed in bocca con il primo morso. Si è valutata anche la coesività della mollica ovvero la modalità di frantumazione della mollica, valutata spezzandola con le mani. Per quanto concerne la durezza della crosta della varietà Blasco, per il 33% degli osservatori essa è risultata essere eccessiva e solo per il 13% risultava essere vicina a valori ottimali. Mentre per il 46% degli osservatori è il Gentil rosso a presentare valori ottimali di durezza e solo il Verna è stato giudicato con il valore massimo di durezza dal 7% degli assaggiatori.

Per quanto riguarda la croccantezza, invece, ben il 27% degli assaggiatori la ritiene ottimale nella varietà del Blasco, seppur un 33% degli assaggiatori continuano a ritenerla assente. Il Gentil Rosso rimane una varietà giudicata avere parametri ottimali anche di croccantezza della crosta.

La coesività risulta essere generalmente (60%) ritenuta friabile (o che si sbriciola facilmente o all'apposto essere troppo compatta) nella varietà Blasco, anche se un 7% degli osservatori la giudica ottimale. Mentre tutte le varietà antiche sono state giudicate con valori ottimali di coesività.

### *Parametri del gusto*

Infine si sono valutati i parametri del gusto. Il sapore dolce è caratteristico degli zuccheri formati durante la lievitazione sulla mollica e risulta essere impercettibile nel 53% dei casi nella varietà Risciola. Per quanto riguarda il Blasco si osserva una forte soggettività nelle osservazioni anche se in nessun caso è stato giudicato equilibrato. In generale, solo le varietà antiche si avvicinano maggiormente ai valori ottimali di intensità del gusto.

Il gusto acido è invece caratteristico degli acidi organici che si formano durante la lievitazione sulla mollica. Di nuovo, solo due varietà antiche (Verna e Autonomia B) risultano avere valori equilibrati di acidità. Per il 33% degli intervistati anche il Blasco risulta avere valori di acidità ottimali.

Per quanto riguarda il sapore globale che comprende crosta e mollica, nessuna varietà è stata giudicata con un sapore di intensità massimo. Di nuovo, sono le varietà Autonomia B e Verna ad avere i valori più intensi. All'interno delle varietà antiche, Risciola e Gentil Rosso hanno un sapore debole. Il Blasco ricade in valori di sapore globale giudicati nella media.

Infine il sapore caratteristico dei cereali (sulla mollica) risulta essere più intenso nuovamente nelle varietà antiche di Verna e Autonomia B. All'interno delle varietà antiche, Risciola e Gentil Rosso hanno un sapore dei cereali debole. Per il Blasco più del 50% degli osservatori lo giudica debole.

### *Risultati ottenuti*

In figura 36 sono riportati i risultati dell'analisi visivo-sensoriale dei diversi pani di varietà antiche e della moderna a confronto. I risultati relativi all'intensità e la valutazione positiva dei descrittori rispecchia i dati precedenti. In genere, si può notare una maggiore valutazione dei descrittori in riferimento alle varietà antiche rispetto alla varietà moderna. Per quanto riguarda il colore della

crosta, le varietà antiche sono risultate per il 100% delle osservazioni pari al colore ambrato, al pari della varietà moderna. Inoltre, il sapore globale, l'acido e il gusto dolce è meglio apprezzato nella varietà moderna. Mentre la frantumazione della mollica è valutato notevolmente nelle varietà antiche.

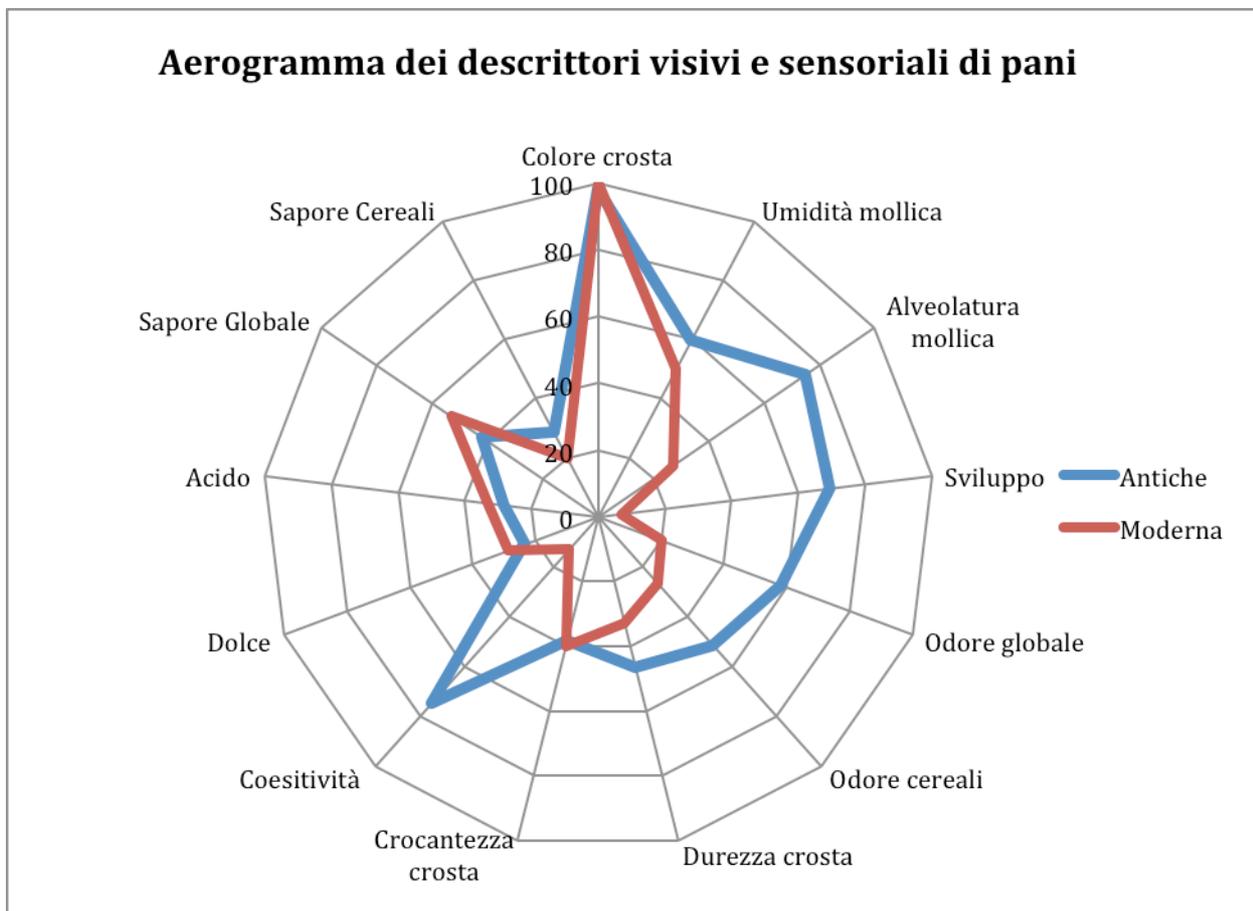


Figura 36. Grafico che mostra le percentuali totali di una buona valutazione dei descrittori

#### b) Consumer test

Nella seguente relazione si riassumono i risultati del consumer test eseguito presso il punto vendita UniCoop Firenze "Porta a mare" di Pisa, mediante il questionario elaborato in collaborazione con CiRRA.

Cinquanta clienti del punto vendita (gli "assaggiatori") sono stati scelti in maniera random per essere sottoposti al test degustativo. Ogni assaggiatore, in modo autonomo e isolato dagli altri, ha eseguito la degustazione di ciascun campione di pane (Pane 1 e Pane 2) seguendo le indicazioni fornite dal "consumer leader".

Durante il test, sono state assaggiate due diverse varietà di pane:

- Pane 1: panificato con varietà moderne di frumento;
- Pane 2: panificato con la varietà di frumento antica "Gentil rosso"

A degustazione conclusa, agli assaggiatori è stato chiesto di compilare un questionario. Il questionario ha considerato la valutazione dei principali parametri sensoriali del pane (consistenza della mollica e della crosta, sapore e odore). Gli assaggiatori sono stati chiamati ad esprimere il loro giudizio e a valutare l'intensità di ogni descrittore assegnando un punteggio compreso tra 1 (assenza della sensazione) e 9 (sensazione estremamente intensa). Solo a compilazione conclusa del questionario, l'assaggiatore è stato informato sull'origine del pane assaggiato.

## Risultati ottenuti

Il campione “random” di 50 assaggiatori è risultato essere stato costituito dal 60% di donne e dal 40% uomini (figura 1). Dal punto di vista dell'età: il 60% aveva un'età > 60 anni, il 24% un'età compresa tra 40-59 anni e il 16% un'età tra i 25-39 anni.

Il 60 % degli assaggiatori ha espresso una preferenza per il pane 1 (varietà “moderna”), mentre il restante 40% degli investitori ha scelto la il pane 2 (varietà “antica”). Un 60% ha preferito la varietà 1 (moderno) principalmente per la sua morbidezza. Invece la varietà antica piaceva per la sua consistenza e per ricordare il pane “con qualità” tradizionale. Allo stesso modo in riferimento alla varietà antica non sono stati convinti dalla compattezza.

### Qual è il pane che preferisce?

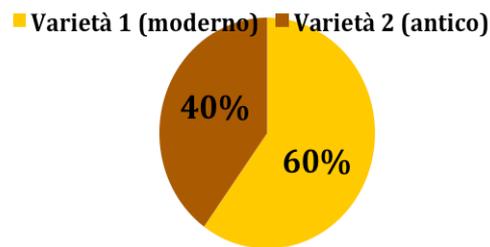


Figura 2. Grafico che mostra le percentuali delle osservazioni relative le varietà di pane preferite dagli assaggiatori .

Per quanto concerne la consistenza della crosta il 60% degli intervistati l'ha giudicata essere “buona/molto buona” nella varietà moderna, mentre tendenzialmente gli osservatori non era molto convinti della crosta nella varietà antica, ritenendola non abbastanza croccante (circa 50% degli assaggiatori non l'ha ritenuta sufficientemente croccante).

Per quanto riguarda il giudizio sulla consistenza della mollica il 65% degli assaggiatori ha ritenuto quella della varietà antica (pane 2) “buona/molto buona”, apprezzandone la maggiore “compattezza”. Nei casi in cui la compattezza non è stata giudicata sufficiente la motivazione è stata addotta alla eccessiva gommosità e alla sensazione di “non sufficiente cottura” al palato. Per gli assaggiatori che hanno preferito la varietà moderna (pane 1), le motivazioni sono state addotte a una maggiore sensazione di leggerezza e friabilità.

Per quanto riguarda l'odore percepito la maggior parte degli assaggiatori non lo giudica sufficientemente intenso. La varietà antica è stata comunque percepita quella con un odore più intenso.

Allo stesso modo, per quanto riguarda il sapore esso è risultato generalmente più gradito quello della varietà moderna perché più simile ai sapori del pane abitualmente consumato, anche se è possibile notare che la percezione di sapore più intenso e gradito è stata avvertita assaggiando il pane “antico” (> 40% delle osservazioni).

Infine, l'86% degli intervistati ha espresso la disponibilità a spendere una cifra maggiore per acquistare un prodotto che dimostra avere delle proprietà nutraceutiche superiori e ben dimostrate (figura 7).

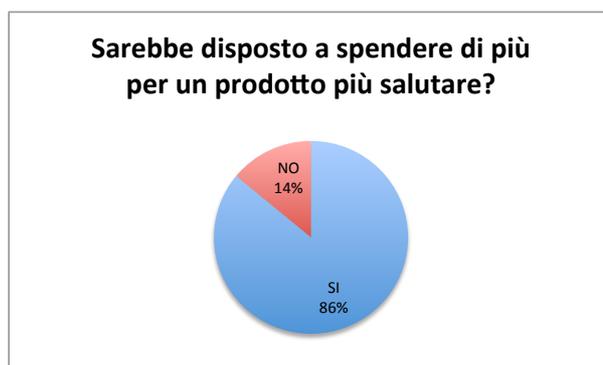


Figura 7. Grafico che riporta la percentuale degli intervistati disposti a spendere di più per un pane funzionale

### Conclusione Finale

Gli assaggiatori hanno espresso una maggior preferenza per il sapore del pane da varietà moderna in quanto più simile a sapori abitualmente consumati. Per lo stesso motivo, ovvero per una maggiore somiglianza visiva a prodotti consumati usualmente, spingeva gli assaggiatori a giudicare la varietà pane 1 come la migliore. Tendenzialmente la consistenza della mollica della varietà “antica” veniva giudicata troppo densa e mancante della friabilità e “leggerezza” del pane moderno. Diffusa è stata la percezione di cottura non sufficiente. Però l’odore e il sapore del pane “antico” è stato giudicato come più deciso e intenso, giudizi espressi con connotazione positiva. In generale, dal grafico a ragnatela in figura 8 si evince come tutti i parametri valutati risultino maggiormente positivi per la varietà 1, moderna.

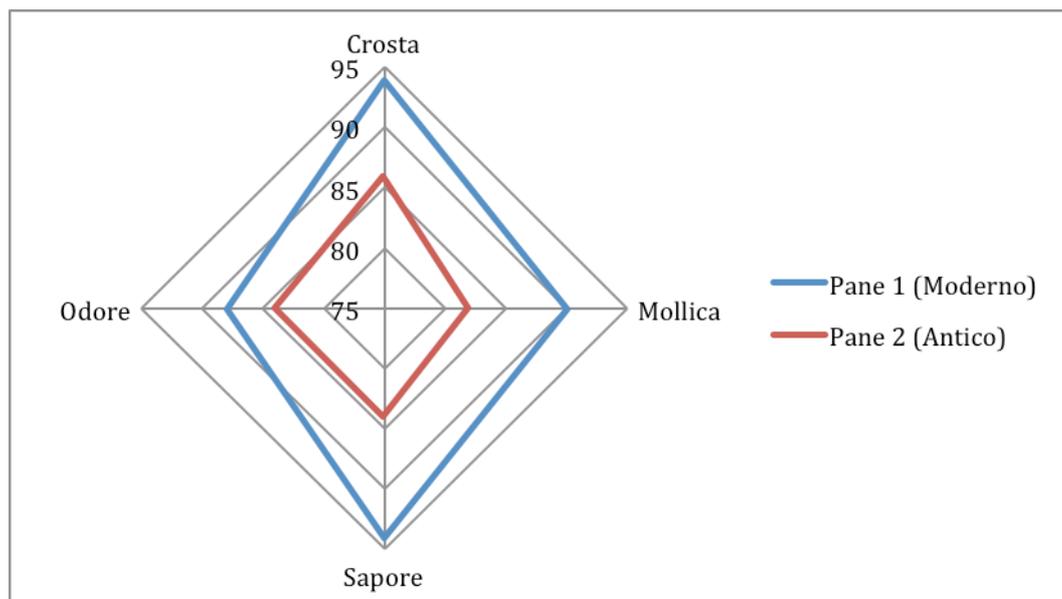


Figura 8. Grafico a ragnatela che riassume i dati del consumer test.

**Azione F2.8 Arruolamento dei pazienti**

**Azione F2.9 Ripetizione esami ematochimici e strumentali**

**Azione F4.2 Raccolta dati anamnestici, clinico-strumentali, biochimici e stoccaggio materiali biologici per indagini successive**

**Azione F4.3 Intervento terapeutico**

**Azione F4.4 Profili di espressione genica e proteomica**

**Azione F4.5 Analisi statistica dei dati e sviluppo di modelli integrati di analisi da usare in prevenzione primaria e per percorsi terapeutico assistenziali in prevenzione secondaria**

**Azione F4.6 Valutazione della trasferibilità nella pratica clinica**

**Partner DAC-UNIFI (Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica - Università degli Studi di Firenze)**

DAC-UNIFI nel primo semestre del progetto in questione si è occupato della messa a punto della metodologia statistica e di arruolamento dei soggetti che sono andati incontro alla fase di sperimentazione con pane da antiche varietà di frumento. In particolare è stato determinato il calcolo della potenza statistica dello studio, in modo tale da avere l'80% di probabilità di evidenziare come statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) una riduzione del 20% dei parametri biologici circolanti associati all'insorgenza di malattie cardiovascolari.

Inoltre è stato preparato il protocollo operativo dello studio di intervento e della tipologia di soggetti che andranno arruolati nella fase operativa del progetto.

Il protocollo operativo dello studio, qui sotto riportato, è stato usato per l'inizio dell'arruolamento del campione di popolazione all'interno dello studio clinico:

#### *Disegno sperimentale dello studio clinico*

Sono stati reclutati 45 individui "sani" che hanno seguito la dieta come specificato di seguito. Prima di iniziare la dieta i soggetti reclutati sono stati sottoposti ad una visita medica con prelievo di sangue e valutazione generale del peso e della composizione corporea.

Lo studio è stato articolato in tre fasi. Nella prima fase (Fase 1) del progetto sperimentale, 22 individui (Gruppo 1) si sono alimentati con pane ottenuto dalla varietà antica Verna coltivata con metodo convenzionale per 10 settimane (non più di 150 g di pane al giorno) mentre i restanti 23 individui (Gruppo 2) si sono alimentati sempre con pane ottenuto dalla varietà antica Verna però coltivata con metodo biologico. Al termine della prima fase sono state effettuate una seconda visita e le successive analisi del sangue. La seconda fase è consistita in una fase dove i partecipanti si sono alimentati con prodotti ottenuti da grano italiano di varietà nuova (con le stesse quantità specificate di pane) per lo stesso periodo (Fase 2). Durante questo periodo, tutti i 45 partecipanti hanno potuto mangiare in base alla loro 'normali' abitudini alimentari, non seguendo alcuna dieta, ma mantenendo le porzioni specificate nella prima fase (non più di 150 grammi di pane al giorno). Terminato questo periodo, è stata effettuata una terza visita e altre analisi del sangue. E' iniziata così la terza fase (Fase 3), dove il Gruppo 1 si è alimentato con i prodotti ottenuti dal grano antico di varietà Autonomia B, mentre il Gruppo 2 si è alimentato con i prodotti ottenuti dalla varietà antica Gentil Rosso con le stesse modalità e tempo previsti nella fase uno. Al termine del terzo periodo (10 settimane), sono state effettuate sia la quarta visita che le analisi del sangue.

- I partecipanti hanno dovuto mangiare solo i prodotti forniti e non mangiare altri prodotti a base di grano. E' stato possibile mangiare carboidrati di altro genere (pasta, mais, riso, patate ecc...)
- 150 g di pane al giorno rappresentavano la quantità massima consentita. E' stato possibile diminuire le quantità di circa 1/4.

### Criteri di esclusione per i soggetti partecipanti allo studio:

I partecipanti allo studio non dovevano avere tali condizioni

- Età >75 anni
- Età < 20 anni
- Presenza di malattia cardiovascolare clinicamente definita
- Diabete mellito o trattamento con ipoglicemizzanti
- Ipercolesterolemia o trattamento con ipocolesterolemizzanti
- Presenza o storia personale di patologia neoplastica
- Morbo celiaco
- Sensibilità al glutine
- Disturbi del comportamento alimentare (anoressia, bulimia etc.)

Durante la prima fase dello studio è stata prevista l'effettuazione di analisi di ripetibilità strumentale e valutazione inter e intra-assay per le metodiche di laboratorio che sono state parte dello studio sperimentale.

In particolare, sono state effettuate analisi di laboratorio per le indagini biologiche e biomolecolari che saranno oggetto di studio nella fase di sperimentazione. Sono stati effettuati delle analisi di ripetibilità inter-operatore e intra-operatore per le cellule progenitrici endoteliali circolanti (CD34+/KDR+, CD133+/KDR+ e CD34+/CD133+/KDR+). I coefficienti di variazione inter e intra-operatore per i tre sottogruppi di cellule sono risultati 0.97 e 0.92, rispettivamente mentre il coefficiente di variazione intra-assay è risultato essere del 7.8%.

Tale analisi si sono rivelate necessarie per poter testare la metodica in citofluorimetria prima dell'inizio dello studio sperimentale e sono state effettuate su campioni di soggetti sani, comparabili con i soggetti che andranno a partecipare allo studio di intervento.

DAC-UNIFI nel secondo e nel terzo semestre del progetto in questione si è occupata delle seguenti attività:

a) Raccolta dati anamnestici, strumentali e biochimici e stoccaggio materiali biologico per indagini successive (F4.2)

Questa fase ha previsto la raccolta dei dati anamnestici e biochimici insieme allo stoccaggio di materiale biologico per indagini successive allo studio di intervento

b) Intervento terapeutico (F4.3)

Questa fase ha previsto l'attuazione dello studio di intervento sulla popolazione di soggetti con l'effettuazione di prelievi ematici, lo stoccaggio del materiale biologico e l'effettuazione della batteria di esami ematochimici di routine che sono parte del profilo biochimico da analizzare.

Questa fase, ha previsto, l'effettuazione dello studio sperimentale con l'analisi biochimiche previste nel protocollo di studio.

In particolare, è stato definito il pattern di esami biochimici che verranno effettuati nello studio di intervento. Gli esami biochimici di routine prevederanno:

- Esame emocromocitometrico con conta linfocitaria
- Profilo lipidico (colesterolo totale, LDL, HDL, trigliceridi)
- Profilo glicemico
- Minerali (sodio, potassio, cloro, magnesio, ferro)
- Enzimi epatici (AST, ALT, Gamma-GT)

### *Risultati ottenuti*

Durante la prima fase di intervento con grano antico Verna è stato riscontrato un significativo miglioramento del colesterolo totale ( $p = 0,003$ ), colesterolo LDL ( $p = 0,03$ ), glicemia ( $p = 0,003$ )

e minerali come potassio e sodio con rispettivamente ( $p = 0,04$ ) e ( $p = 0,03$ ), dopo aggiustamento per età, sesso, BMI, abitudine al fumo e ipertensione. Nella seconda fase di controllo c'è stata invece una significativa riduzione dei minerali circolanti, mentre nell'ultima fase abbiamo visto un miglioramento del profilo lipidico, il colesterolo totale ( $p = 0,001$ ), colesterolo LDL ( $p = 0,04$ ).

Inoltre è stato valutato se c'erano differenze dei vari parametri in base al tipo di coltivazione. Nella distinzione tra grano antico Verna coltivato in modalità convenzionale o biologica non è stato possibile riscontrare alcuna differenza tra le due metodiche.

Nella terza fase di intervento, invece, è stato possibile evidenziare un effetto benefico in alcuni parametri di rischio cardiovascolare come il colesterolo totale e LDL per tutte e due le varianti di grano antico utilizzate, ma soprattutto per il Gentil Rosso.

Sono state studiate anche le cellule progenitrici che derivano dal midollo osseo e sono una popolazione di cellule staminali importanti per mantenere l'integrità dell'endotelio vascolare. Le analisi citoflorimetriche hanno evidenziato, nella prima fase, un aumento del numero di cellule progenitrici circolanti (CPC); in particolare le cellule CPC CD34 + ( $p = 0,04$ ), e CD133 + ( $p = 0,02$ ) hanno dimostrato un aumento significativo durante la fase di intervento con grano antico di varietà Verna.

*Questi risultati suggeriscono che una dieta con antiche varietà di grano potrebbe essere efficace nel ridurre i fattori di rischio e prevenire le malattie cardiovascolari.*

**Azione F2.2 Individuazione delle tecniche produttive e dei costi di produzione ad ettaro e a quintale di varietà moderne di frumento tenero in funzione delle differenti tipologie di produzione**

**Azione F3.2 Elicitazione delle tecniche e dei costi di coltivazione delle varietà di frumento tenero moderno e delle varietà antiche da effettuare presso testimoni privilegiati.**

**Azione F2.5 bis Supporto nella scelta delle varietà antiche di frumento tenero in funzione della diversità genetica, del contenuto proteico e del profilo fenolico.**

**Azione F4.7 Analisi dell'evoluzione dei prezzi e dei costi di frumento tenero come supporto alla definizione di un modello contrattuale di filiera.**

**Partner: Dipartimento di Scienze delle produzioni Vegetali del Suolo e dell'Ambiente Agroforestale Università degli Studi di Firenze – DiPSA**

Nonostante la rilevanza del problema, non sono molti in Italia gli studi volti ad individuare tecniche a basso costo per lo studio dei costi di produzione per coltura. I crescenti vincoli di bilancio di enti di ricerca e committenti invece spingono a ricercare tecniche che integrando le fonti di informazioni disponibili permettano di pervenire a stime affidabili e oggettive con costi largamente inferiori a quelli delle indagini dirette. E' questa la direzione in cui vanno gli studi applicati presentati in questo resoconto finale.

Nel primo la banca dati della RICA (rete italiana di contabilità agraria) è utilizzata per stimare un sistema di equazioni che consente di ripartire i costi congiunti delle aziende agricole e pervenire così ad una stima del costo per ettaro del frumento tenero (Azione F2.2).

Nel secondo le tecniche produttive e la resa di varietà antiche e moderno di frumento sono state ricostruite grazie ad una tecnica di elicitazione statistica basata su interviste ad un ristretto numero di esperti ( Azione F4.7).

Nel terzo il costo di produzione delle varietà antiche è stimato in base alle tecniche elicitate e confrontato con il costo delle varietà moderne.

Un indice modificato dei costi di produzione è infine proposto per aggiornare le stime (Azione F2.2). Tutti i lavori, applicazioni di tecniche bene note seppure di frontiera rispondono ai bisogni informativi dei soggetti della filiera ed in particolare costituiscono un supporto alla redazione dell'accordo di filiera tra panificatore e cerealicoltori. Infine sono riportate alcune notizie circa l'azione di supporto nella scelta delle varietà antiche di frumento tenero in funzione della diversità genetica, del contenuto proteico e del profilo fenolico (Azione F2.5bis).

#### *a) La Stima dei Costi di Produzione del Grano Tenero: Applicazione del Modello Gecom*

L'Azione "Individuazione delle tecniche produttive e dei costi di produzione ad ettaro e a quintale di varietà moderne di frumento tenero in funzione delle differenti tipologie di produzione", affronta il problema della stima dei costi di produzione del grano tenero tramite l'utilizzo dei dati della rete italiana di contabilità agraria (RICA) forniti dall'Istituto Nazionale di Economia Agraria (INEA). Tale analisi viene effettuata sugli anni 2005-2012 (il 2012 è l'ultimo anno per i quali sono disponibili i dati). Il problema viene affrontato con un modello econometrico chiamato GECOM (GENeal COst of production Model). Tale modello è stato messo a punto del progetto FACEPA (Farm Accountancy Cost Estimation and Policy Analysis of European Agriculture), un progetto finalizzato a produrre una metodologia standard europea per la stima dei costi di produzione tramite l'utilizzo dei dati della rete contabile FADN (farm accounting data network).

#### *Risultati ottenuti*

Il modello implementato è stato adattato alle specifiche caratteristiche del dataset RICA ed agli obiettivi della nostra analisi, ossia quello di fornire una stima dei costi di produzione del grano tenero. Per avere stime più precise del processo produttivo legato al grano tenero, abbiamo selezionato le aziende relative all'OTE 1 (specializzate in seminativi).

Abbiamo condotto una duplice stima: un prima stima ("completa") in cui abbiamo inserito nel modello GECOM il valore di tutti gli input produttivi; una seconda stima ("ibrida") in cui abbiamo inserito nel modello GECOM il valore degli input che nel dataset RICA non sono attribuiti ai singoli processi produttivi ma vengono rilevati a livello aziendale, mentre per gli altri input abbiamo riportato i valori ad ettaro rilevati dalle aziende del campione. Il confronto tra le stime ottenute con i due tipi di modelli confermano la bontà delle stime. Dato che nella stima "ibrida" alcuni input sono stati imputati direttamente dalle aziende in fase di rilevazione, consideriamo tale stima come più corretta.

Il modello ha fornito buoni risultati, in termini di significatività dei coefficienti. Inoltre le stime sono in linea con quelle ottenute in altri studi, anche se non direttamente confrontabili (dato che i campioni in questione sono differenti).

La resa di grano tenero per ettaro di terra coltivata è cresciuta gradualmente dal 2005 al 2007 (in particolare tra il 2006 ed il 2007 si ha un aumento importante) per poi calare piuttosto drasticamente nel periodo 2008-2009. Solo nel 2012 si ha un leggero incremento.

La voce di costo più importante negli anni 2005-2009 è quella relativa a manutenzione di macchinari, attrezzi e capitali fissi, pur mostrando una notevole flessione negli anni. La voce di costo relativa ad affitti e interessi su terra e fabbricati, mostra un andamento simile, ma con valori assoluti più bassi. Altre voci di costo importanti sono quelle relative ai fertilizzanti. Negli anni 2010-2012 la voce di costo più importante diventa, invece, quella relativa ai fertilizzanti. È importante sottolineare, però, che ci sono alcune differenze a livello regionale.

Riteniamo che questo studio possa fornire un valido strumento per la trattativa sul costo ad ettaro e a quintale del frumento tenero. Riteniamo che i punti di forza di tale strumento possano essere così sintetizzati:

- utilizzazione di una metodologia (il modello GECOM) ormai consolidata a livello europeo e, se possibile, migliorata tenendo conto delle caratteristiche del dataset a disposizione;
- utilizzazione di dati ufficiali provenienti da un ente pubblico di ricerca indipendente sottoposto alla vigilanza del *Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali*;
- replicabilità delle stime negli anni successivi, tramite la fornitura di una procedura scritta per il software statistico SAS e di un protocollo per la preparazione dei dati.

#### b) *Elicitazione di media e variabilità delle rese per varietà moderne e antiche di frumento*

Il lavoro svolto nell'ambito dell'azione F4.7 di Quantica ha come obiettivo finale la stima di media e variabilità delle rese ad ettaro per varietà antiche e moderne di frumento negli ambienti agronomici della Toscana centrale elicitando queste informazioni da un gruppo di esperti. Come sottoprodotto della procedura di elicitazione si sono ottenute informazioni utili per la stima dei differenziali di costo di produzione tra i due gruppi di varietà.

Il processo di elicitazione è iniziato analizzando le caratteristiche di due varietà di grano, scelte come oggetto di studio: quella più diffusa tra le varietà moderne (Blasco) e quella più diffusa tra le varietà antiche (Verna).

A questo proposito sono state selezionate le variabili ecologiche che influenzano in modo determinante la Resa e il Costo ad ettaro delle due varietà. Le variabili che si è scelto di considerare sono: l'allettamento, la fusariosi, la partita tossica, il tipo di terreno, l'aratura, la rippatura, l'erpicoltura, il carico di azoto effettivo, la densità di semina, il diserbo, il trattamento antiparassitario curativo e quello preventivo. Queste variabili sono state messe in relazione attraverso la creazione di un grafo aciclico direzionato (DAG), costruito col programma GeNIe Network, che rappresenta i legami diretti tra i nodi e la loro natura (nodi deterministici o stocastici) attraverso la loro forma (fig. 3.1). Questi nodi, poi, sono stati messi in relazione con la Resa per ettaro (e il Costo per ettaro), la variabile che dovremmo quantificare alla fine del progetto. E' stata quindi sviluppata una Rete Bayesiana per ogni esperto consultato.

Al fine di determinare il valore della Resa per ettaro si è deciso di sottoporre un questionario ad alcuni esperti del settore, adottando i metodi dell'Elicitazione Bayesiana, chiedendo di esprimere la probabilità dei valori associati ai nodi stocastici dato il valore assunto da quelli decisionali.

Il questionario contiene delle domande in cui si chiede all'esperto di esprimere il suo grado di convincimento nella realizzazione di un evento. Nella domanda, prima si è specificato lo spazio campionario della variabile da elicitare e poi si è fatto presente all'esperto il contesto di riferimento, comunicandogli il valore delle variabili condizionanti da cui il nostro nodo dipendeva. Le domande sono state ripetute per ogni valore delle variabili condizionanti, come appare dal grafo che rappresenta la rete. Al fine di esercitare ed allenare l'esperto nel ragionamento, è stata stilata una lista di domande introduttive di addestramento che riprendevano alcuni concetti base della statistica.

Per evitare che l'intervista diventasse troppo gravosa e cospicua, sono state selezionate solo alcune delle numerose domande derivanti da tutte le combinazioni dei valori delle variabili.

Al fine dell'elicitazione della variabile risposta "Resa per ettaro" sono stati fissati i valori di alcune variabili condizionanti, mentre, per quelle ritenute principali, sono state considerate tutte le combinazioni dei loro livelli.

Una volta concluse le interviste, sono stati associati i valori di probabilità ottenuti da ciascun esperto, ai valori delle variabili contenute nelle due reti probabilistiche (Blasco convenzionale e Verna biologico).

Nei casi in cui il contesto della domanda non fosse stato ritenuto possibile dall'esperto o per cui non avesse avuto sufficiente esperienza, egli non ha elicitato alcun valore. Per elaborare questa informazione, è stato aggiunto un livello denominato "non definito" a cui è stato associato un valore di probabilità pari a 1 nei casi di elicitazione vacante.

Per tutte le domande che non sono state poste agli esperti per semplificare l'intervista, i livelli delle variabili risposta sono stati considerati equiprobabili.

Compilate le reti probabilistiche si è esaminata la variabile risposta "Resa per ettaro" e sono stati individuati i livelli delle condizionanti a cui le risposte degli esperti hanno fatto riferimento; si è guardato, in particolare, ai livelli dei nodi decisionali.

Per quantificare i valori della resa per ettaro il condizionamento è stato effettuato rispetto ai livelli dei nodi decisionali e marginalizzando per i valori delle altre variabili stocastiche.

Così facendo sono state calcolate le medie e le varianze di ognuna delle distribuzioni marginali della variabile risposta.

Le distribuzioni marginali sono state ottenute prima nell'ambito di ogni singolo esperto, condizionandosi ai valori dei nodi decisionali per cui egli aveva risposto, successivamente ne sono state create delle altre includenti le informazioni derivanti da tutti gli esperti; queste sono state ottenute effettuando una media aritmetica delle medie ottenute dai singoli esperti e relative agli stessi condizionanti.

Nessun riferimento è stato fatto per la variabile risposta "Costo per ettaro" nell'ambito dell'intervista; questa variabile è stata calcolata successivamente a partire dalle informazioni elicitate e dalle elaborazioni ottenute attraverso le reti probabilistiche (vedi cap. 4).

#### *Risultati dell'elicitazione della resa per ettaro*

Grazie all'utilizzo delle reti Bayesiane è stato possibile quantificare il valore del nodo risposta Resa per ettaro.

Per ogni esperto sono stati inseriti i risultati ottenuti dalle reti probabilistiche all'interno di tabelle; la resa per ettaro in queste tabelle è condizionata soltanto ai valori dei nodi decisionali a cui hanno fatto riferimento le risposte degli esperti. In particolare tutti i valori di resa sono condizionati ai tipi di terreno, al carico di azoto effettivo, alla densità di semina e, per il Blasco convenzionale, ad un diserbo effettuato in presemina.

Nei casi in cui il contesto della domanda non fosse stato ritenuto possibile dall'esperto o per cui non avesse avuto sufficiente esperienza, egli non ha elicitato alcun valore; in questi casi le celle corrispondenti risultano vuote.

I valori dei nodi decisionali non ritenuti possibili più frequentemente sono stati il carico di azoto inferiore a 116 kg/ha e quello superiore a 233 kg/ha per il Blasco convenzionale, mentre per il Verna Biologico una densità di semina superiore a 253 kg/ha ed un carico di azoto generalmente superiore a 117 kg/ha.

Anche alcuni tipi di terreno sono stati ritenuti meno probabili di altri: per il Blasco convenzionale il tipo di terreno limoso è rimasto vuoto per due esperti, mentre solo in un caso sono stati lasciati vuoti il tipo di terreno sabbioso e quello di medio impasto. Nel Verna Biologico sono stati ritenuti tendenzialmente poco probabili i tipi di terreno sabbioso e limoso.

Analizzando i dati dei singoli esperti, è possibile notare che i valori della resa per ettaro risultano essere uguali per molti di questi, anche al variare dei livelli dei nodi decisionali. Infatti, quando è stata chiesta la resa per ettaro agli intervistati, i valori di alcuni nodi condizionanti sono stati fissati per semplificare il questionario. Ma non tutti gli esperti durante l'elicitazione diretta di questi condizionanti hanno dichiarato tali valori fissati come più probabili. Per questo motivo, inserendo le probabilità elicitate degli intervistati nelle reti Bayesiane, la distribuzione marginale della resa per ettaro risulta essere unica al variare dei livelli dei nodi decisionali.

Generalmente il valore medio della resa per ettaro del Blasco Convenzionale è circa il doppio di quello ottenuto per il Verna Biologico: i valori medi della resa per ettaro nel Blasco

convenzionale vanno dai 29 a 57 q.li/ha circa, mentre quelli del Verna Biologico vanno dai 24 ai 36 q.li/ha (fig. 3.1 e 3.2). Per quanto riguarda la varianza questa risulta essere molto più bassa per la seconda varietà: il valore massimo della varianza per il Blasco convenzionale è pari a 565 mentre per il Verna Biologico è pari a 277 con un minimo a 12.

Calcolando la media delle medie ottenute dai singoli esperti, la distribuzione marginale della resa per ettaro ha assunto valori diversi al variare dei condizionanti e si è potuto notare un tendenziale aumento del suo valore medio al crescere sia del carico di azoto che della densità di semina.

Marginalmente al tipo di terreno, nel Blasco convenzionale i valori medi della resa per ettaro si aggirano tra i 32 e i 46 q.li/ha, mentre tra i 31 e i 36 q.li/ha nel Verna Biologico (tabelle 3.1, 3.2 e appendice) Anche se in pochi casi il valore medio per la prima varietà risulta più elevata, la differenza tra le due varietà non è più così marcata, mentre la varianza si mantiene ancora più elevata nel Blasco Convenzionale che nel Verna Biologico.

In alcuni casi è possibile notare che le distribuzioni marginali della resa per ettaro quando il carico di azoto è inferiore a 116 kg/ha equivalgono a quelle in cui il carico è superiore a 233 kg/ha. Infatti, nei casi in cui alcuni esperti non hanno elicitato valori ed hanno lasciato celle vuote (per esempio quando il carico è superiore a 233 kg/ha), il contributo alla resa per ettaro deriva solo dall'esperto che per quei valori dei condizionanti ha fornito dei risultati, che, dal calcolo della media tra tutti gli esperti, non vengono alterati.

### *c) Il costo di produzione per varietà moderne e antiche di frumento*

Per comparare il costo di produzione si è deciso di seguire un approccio analitico in cui le singole operazioni colturali sono state però valutate in accordo con i prezzi sintetici della FRIMAT (Federazione Regionale Imprese di meccanizzazione agricola) ipotizzando un affidamento totale di tutte le operazioni a contoterzisti. Si sono poi aggiunte stime al 2012 del costo relativo a sementi, diserbanti e concimi. Restano fuori dal computo i costi relativi all'uso della terra e del capitale di anticipazione nonché quelli generali in particolare quelli relativi a stipendi, imposte, tasse e contributi.

Come è illustrato in tabella 3.1, costruita in base alle risposte degli esperti durante l'esercizio di elicitazione (si veda il cap. 2), non vi sono differenze rilevanti nella tecnica colturale della varietà Blasco rispetto alla Verna con le sole notevoli eccezioni dell'erpicoltura e dei trattamenti antiparassitari. Applicando le percentuali della tabella ai costi unitari delle operazioni come da prezzo FRIMAT si ottengono i valori riportati in tabella 3.2, relativi ai prezzi 2011. Nell'esercizio si è ipotizzato che quando non venga effettuata l'aratura la semina sia sul sodo. La differenza tra i costi relativi alla meccanizzazione per le due cultivar risulta trascurabile. I costi relativi al 2012 si possono facilmente ottenere applicando un aumento del 5% a tutte le tariffe come risulta dal prezzo FRIMAT del 2012. Si ottiene così una cifra, per il 2012, pari a 500 Euro ad ettaro per il Blasco e 490 Euro ad ettaro per il Verna.

Le altre categorie di costi specifici considerate sono: sementi, diserbanti e concimi. Per le prime si è ipotizzata una densità di semina pari a 250 Kg /Ha per il Blasco e 200 Kg/Ha per il Verna data la maggiore capacità di accestimento di questa ultima. Il prezzo è stato ipotizzato pari a 40 €/q per entrambe le varietà sulla base del bollettino AGER della Borsa merci di Bologna (in assenza di dati sul prezzo delle sementi biologiche per il Verna). Per i diserbanti è stato ipotizzato un solo intervento per la cultivar Blasco con un diserbante (glufosinate ammonio) ad un dose di 5l /Ha. Infine , per quanto concerne i concimi, si è ipotizzato un carico di azoto di 200 Kg di N ad ettaro per Blasco da ottenersi con la distribuzione di 430 Kg di Urea agricola. Per il Verna biologico in realtà la concimazione dovrebbe esser fatta con concimi organici nell'ambito di una opportuna rotazione. Per semplificare si è ipotizzato un costo di surrogazione pari a quello della concimazione con Urea ma con dosi dimezzate rispetto al Blasco.

Sommando i valori relativi a queste tre voci di materie prime a quelli per i servizi di meccanizzazione si ottiene un stima ad ettaro dei costi specifici delle due varietà. Per il 2012 i

costi specifici ad ettaro della varietà Blasco sono stimati in circa 1000 Euro mentre quelli del Verna sono inferiori di un terzo ammontando a circa 680 Euro.

Conoscendo dal capitolo 2 la stima della resa ad ettaro per le due varietà è possibile passare dal costo ad ettaro al costo al quintale che risulta pari a 28 €/q per entrambe le varietà. In realtà la stima del costo a quintale è molto sensibile ai valori di resa che si ipotizzano, nel nostro caso 36 e 24 quintali ad ettaro per la varietà moderna e quella antica che riflettono la stima più prudente fra quelle dei singoli esperti (figure 3.1 e 3.2) per terreni di medio impasto.

Un'analisi attenta delle stime elicitate esperto per esperto (figure 3.1 e 3.2) mostra infatti che, nei casi in cui lo stesso esperto abbia fornito stime sia per il Verna, sia per il Blasco la differenza di resa tra le due varietà era di circa 10 q/Ha con la resa del Blasco intorno ai 36 q/Ha. Se si applicassero invece i valori medi (37 e 34 q/Ha) all'esercizio di calcolo del costo al quintale si otterrebbero valori di costo unitario molto più bassi per il Verna che avrebbe un costo intorno a 19 Euro a quintale contro i 26 Euro del Blasco.

Un secondo tipo di stima può essere effettuato correggendo i dati presentati nel capitolo 2. Abbiamo infatti ipotizzato che la spesa per diserbanti nel Verna è nulla, quella per concimi dimezzata e quella per sementi ridotta del 20% rispetto al Blasco. Applicando questi coefficienti alle voci stimate nel capitolo 2 per le varietà convenzionali si ottengono i valori riportati in tabella 4.4 che evidenzia un costo ad ettaro del Verna minore del 17% rispetto a quello delle varietà convenzionali. Con la nuova stima il costo unitario calcolato in tabella 4.4 deve ricalcolarsi come in tabella 4.5. Con rese di 36 q/Ha per il Blasco e 24 q/Ha per il Verna i costi a quintali cambiano drasticamente (30 e 37 €/q rispettivamente) con un costo del Verna più alto del 24%.

#### *Risultati ottenuti*

Concludendo, si ritiene più corretto il confronto di costo realizzato in tabella 4.4 perché tiene conto di tutti i costi specifici e congiunti e quindi diluisce la differenza di costo osservata per i costi specifici. Ai fini della contrattazione di filiera il dato rilevante è quello del costo al quintale che è influenzato drasticamente dalla resa ad ettaro. Poiché l'esercizio di elicitazione ha fornito stime delle rese notevolmente variabili da esperto ad esperto è fondamentale che si trovi un accordo durante la contrattazione su questo parametro nell'ambito del range di valori fornito dallo studio (24 -36 q/Ha per Verna e 29-57 q/Ha per Blasco).

#### *d) Supporto nella scelta delle varietà antiche di frumento tenero in funzione della diversità genetica, del contenuto proteico e del profilo fenolico*

Dalla ricerca bibliografica sono emersi i seguenti elementi.

Il frumento è un componente importante della dieta umana ma poco si conosce del profilo fitochimico delle diverse varietà. Gli strati esterni della cariosside hanno mostrato di contenere livelli più alti di fitochimici, come i composti fenolici, fitosteroli, tocoli e folati, che le parti interne al seme, da questo si evince l'importanza del consumo di frumento integrale.

La crusca e il germe, infatti, contengono alti livelli di acidi fenolici inclusi il vanillico, il cumarico e soprattutto il ferulico ma questi composti non sono uniformemente distribuiti nel frumento così le concentrazioni maggiori si trovano nella crusca. Identificare e caratterizzare questi specifici fattori nel frumento può promuovere lo sviluppo di alimenti nutraceutici.

Le infiammazioni croniche sono state identificate come la causa di molte malattie, incluse quelle coronariche (CHD). Gli antiossidanti nella dieta sono legati alla riduzione delle infiammazioni e così riducono il rischio di cancro e dei problemi cardiovascolari. Il possibile meccanismo attraverso il quale operano questi benefici può coinvolgere la terminazione della catena ossidativa dei radicali liberi, la stimolazione degli enzimi antiossidanti, la riduzione dei perossidi e la chelazione dei metalli di transizione.

Numerosi studi hanno mostrato che il frumento contiene significative quantità di antiossidanti naturali come gli acidi fenolici, carotenoidi e tocoferoli. Il consumo di frumento integrale riduce i marker dell'infiammazione. Oltre alle capacità antiossidanti, molti studi hanno identificato nei componenti del frumento specifici effetti nella riduzione del rischio di malattia. Il consumo di

questo cereale quindi aiuta a diminuire i rischi di malattie cardiovascolari, cancro e diabete e questi benefici sono attribuibili al contenuto di sostanze fitochimiche.

*La caratterizzazione completa di tutti i composti benefici presenti nel frumento e nei prodotti derivati è importante per lo sviluppo di varietà arricchite e per promuovere la vendita per una sana alimentazione.* L'interesse relativo ai benefici per la salute dati dal consumo di frumento ha fatto in modo che la ricerca si sia focalizzata sul contenuto dei composti e le diversità presenti tra le diverse varietà di frumento. In questo contesto *si è scoperto che le vecchie varietà hanno un valore superiore alle moderne a causa del loro particolare contenuto di sostanze fitochimiche benefiche per la salute del consumatore.*

Nel frumento sono presenti in alta percentuale i carotenoidi, specialmente luteina e zeaxantina, i quali giocano un ruolo importante nel ridurre il rischio della degenerazione maculare, dovuta all'età, e per la cataratta .

I lignani sono una classe di metaboliti secondari prodotti dalla dimerizzazione ossidativa di due fenilpropanoidi. Il ruolo biologico dei lignani è ancora in discussione ma è generalmente accettato che la loro presenza nelle piante giochi un ruolo importante per la difesa dalle malattie e per la crescita.

*Il consumo di pane integrale ottenuto da farine di frumento appartenente a vecchie varietà ha un chiaro effetto positivo sull'abbassamento della pressione sanguigna* con conseguente riduzione del rischio di aterosclerosi. Questi benefici sono stati verificati da una ricerca effettuata dal Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica, Centro Trombosi della Facoltà di Medicina dell'Università di Firenze in collaborazione con il DIPSA della Facoltà di Agraria di Firenze.

Il frumento, specialmente quello integrale, contiene molte vitamine, B1, tiamina, B2, riboflavina, B3, niacina, B6, tutte le vitamine sono contenute nella parte esterna del seme e nel germe cosicché la raffinazione ne rimuove un'altissima percentuale .

I cereali sono anche una importante fonte di folati che sono tra le vitamine più studiate. Un aumento dei folati può essere, in parte, dovuto alla promozione della loro biosintesi nell'intestino, indotta dalle fibre alimentari. L'assunzione di frumento integrale anche in questo caso è rilevante per la salute.

I cereali, inoltre, sono anche un'importante fonte di micronutrienti minerali per gli esseri umani. La carenza di micronutrienti è chiamata malnutrizione nascosta. Specialmente la carenza di Fe influenza negativamente la crescita, le funzioni immunitarie e causa anemia .

Il diabete è una malattia autoimmune che induce un processo infiammatorio che distrugge molte cellule che secernono insulina nel pancreas. La suscettibilità genetica al diabete è ereditata ma ci sono molti cofattori ambientali che influenzano fortemente l'espressione della malattia. È stato messo in evidenza, nelle cavie, che alcune proteine del glutine inducono anticorpi in grado di aggredire le cellule pancreatiche.

Infine i lignani hanno anche importanti azioni farmacologiche inclusa l'attività antitumorale, antiinfiammatoria, immunosoppressiva, cardiovascolare , antiossidante e antivirale. Inoltre una dieta ricca di lignani può avere un effetto protettivo contro i problemi causati dal rilascio di estrogeni, come l'osteoporosi. La presenza di lignani nei mammiferi, enterolattone ed enterodiolo, formati dalla trasformazione dei lignani vegetali nel colon ad opera di batteri, è importante contro l'incidenza del cancro al seno, prostata e colon .

### *Verifica dati*

I dati relativi ad una ricerca effettuata dal dipartimento DIPSA della Facoltà di Agraria di Firenze in collaborazione con l'Università di Bologna ha verificato la distribuzione e il profilo qualitativo dei lignani nel frumento tenero italiano sia in 4 varietà moderne che in 6 vecchie varietà, sono stati utilizzati per un'ulteriore analisi per caratterizzare e classificare le varietà antiche caratteristiche della Toscana.

- Semi da moderne cultivar: Mieti, Nobel, Eureka, Bolero

- Semi da vecchie cultivar: Verna, Sieve, Andriolo, Benco, Inallettabile, Autonomia A, Autonomia B, Gentil Rosso, Canove, Carosello, Frassineto, Bianco Nostrale, Marzuolo d'Aqui, Marzuolo Val Pusteria,

Differenze significative sono state trovate tra le vecchie e moderne varietà.

*Contenuto di lignani, con idrolisi acida, espresso in  $\mu\text{g/g}$  peso secco di alcune vecchie varietà a confronto con un campione rappresentativo di varietà iscritte al registro.*

| Cultivar              | ARC             | HIN             | SYR             | SECO (tot)      | PIN             | TOTAL           |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Bolero                | n.d             | n.d             | n.d             | 1,55 $\pm$ 0,13 | 1,22 $\pm$ 0,10 | 2,77 $\pm$ 0,16 |
| Mieti                 | n.d             | n.d             | n.d             | 1,64 $\pm$ 0,08 | 1,02 $\pm$ 0,08 | 2,66 $\pm$ 0,12 |
| Nobel                 | n.d             | n.d             | n.d             | 1,30 $\pm$ 0,15 | 0,98 $\pm$ 0,08 | 2,29 $\pm$ 0,16 |
| Eureka                | n.d             | n.d             | n.d             | 1,58 $\pm$ 0,15 | 1,09 $\pm$ 0,07 | 2,67 $\pm$ 0,04 |
| Verna                 | 1,02 $\pm$ 0,11 | 0,95 $\pm$ 0,10 | n.d             | 1,44 $\pm$ 0,12 | 1,22 $\pm$ 0,07 | 4,64 $\pm$ 0,14 |
| Sieve                 | n.d             | 1,00 $\pm$ 0,08 | n.d             | 1,34 $\pm$ 0,11 | 1,01 $\pm$ 0,10 | 3,36 $\pm$ 0,04 |
| Andriolo              | 0,96 $\pm$ 0,12 | 1,00 $\pm$ 0,10 | n.d             | 1,33 $\pm$ 0,08 | 1,09 $\pm$ 0,08 | 4,38 $\pm$ 0,10 |
| Inallettabile         | 0,85 $\pm$ 0,08 | 0,84 $\pm$ 0,06 | 1,34 $\pm$ 0,11 | 1,53 $\pm$ 0,12 | 1,28 $\pm$ 0,07 | 5,84 $\pm$ 0,11 |
| Gentil rosso aristato | 1,08 $\pm$ 0,08 | 0,93 $\pm$ 0,07 | n.d             | 1,25 $\pm$ 0,13 | 1,42 $\pm$ 0,10 | 4,67 $\pm$ 0,11 |
| Gentil rosso mutico   | 1,20 $\pm$ 0,08 | 1,59 $\pm$ 0,10 | n.d             | 2,46 $\pm$ 0,14 | 1,86 $\pm$ 0,09 | 7,11 $\pm$ 0,05 |

ARC arctigenina, HIN hinochinina, SYR siringaresinolo, SECO secoisolariciresinolo totale anidro e secco, PIN pinoresinolo.

Una valutazione dei componenti funzionali presenti nel frumento duro italiano in vecchi e moderni genotipi è stata effettuata tramite HPLC–ESI-TOF-MS che evidenzia notevoli differenze tra le moderne e le vecchie cultivar. L'interpretazione allo spettrometro di massa ha evidenziato ben 70 composti fenolici, inclusi cumarina, acidi fenolici, antocianine, flavoni, isoflavoni, pro antocianine, stilbeni e lignani.

*d) Analisi dell'evoluzione dei prezzi e dei costi di frumento tenero come supporto alla definizione di un modello contrattuale di filiera.*

Nonostante la rilevanza del problema, in Italia c'è una sostanziale mancanza di studi sistematici sulla gestione del rischio di prezzo nelle filiere agroalimentari. Questo lavoro nasce nell'ambito di un'azione di trasferimento di conoscenze scientifiche volta a supportare la redazione di un contratto di filiera tra un panificatore e gli agricoltori produttori di grano tenero. L'azione è parte integrante di un progetto integrato di filiera, finanziato dal PSR della Regione Toscana, che prevede investimenti complessivi per oltre 7 milioni di euro ed un discreto impatto sull'occupazione a livello locale. Scopo dell'azione 4.7 "Analisi dell'evoluzione dei prezzi e dei costi di frumento tenero" è fornire un supporto alla definizione di un modello contrattuale di filiera. Il report è indirizzato principalmente allo studio delle possibili modalità di gestione del rischio prezzo nell'ambito della filiera. E' questo un tema sempre più rilevante soprattutto in seguito alla riforma della PAC che smantellando progressivamente le misure di protezione commerciale e disaccoppiando il sostegno al reddito ha visto negli ultimi anni un aumento sostanziale della volatilità dei prezzi nei mercati UE che ora sono collegati ai mercati internazionali e ne seguono le alterne vicende.

Il report (di cui qui per brevità si riportano le conclusioni) è organizzato in tre parti. Nella prima (capp. 2 e 3) si analizzano le caratteristiche e le proprietà statistiche delle serie dei prezzi spot e dei prezzi future relativi al grano tenero nazionale ed estero. Nella seconda (capp. 4 e 5) si descrive il funzionamento dei mercati future, il loro uso per la gestione del rischio prezzo e si misura l'efficienza di questi mercati nel caso specifico del frumento tenero italiano. Infine, nell'ultima parte (cap. 6) si introducono i modelli per le strategie ottimali di copertura del rischio (*optimal hedging*) applicandoli sia al caso degli agricoltori con i contratti a termine, sia al caso del panificatore con i contratti future.

### *Risultati ottenuti*

L'obiettivo di questo lavoro era trasferire conoscenze scientifiche per poter "disporre di modalità di definizione contrattuali che possano meglio valorizzare la remunerazione dell'agricoltore" nell'ambito di un contratto che vede coinvolti circa 40 agricoltori ed un panificio industriale con capacità di stoccaggio di circa 6000 tonnellate di grano tenero. Attualmente, le relazioni contrattuali in essere si basano su contratti a termine offerti dal panificatore secondo tre modalità di fissazione del prezzo:

- costo di produzione + premio;
- prezzo del fino di Bologna + premio;
- prezzo del fino di Bologna con protezione tipo cap-floor.

In due di queste modalità il rischio prezzo è trasferito in misura più o meno completa dal produttore al panificatore. Scopo specifico dell'azione F4.7 è stato di verificare se gli strumenti finanziari disponibili per gestire il rischio prezzo erano utilizzabili per migliorare il regime contrattuale di questa filiera. In particolare si è indagato:

- quali futures fossero efficienti e in che misura per il prezzo spot utilizzato nel contratto di filiera;
- quale fosse il comportamento statistico della base;
- quali fossero le strategie di hedging più efficienti per il panificatore.

A questi temi se ne è affiancato un altro relativo alle strategie di hedging degli agricoltori, questa volta utilizzando i contratti a termine offerti dal panificatore. In particolare lo studio ha evidenziato, date alcune ipotesi sui coefficienti tecnici di produzione:

- il premio di prezzo minimo necessario per indurre a partecipare al contratto di filiera agricoltori con diverso grado di propensione al rischio;
- la percentuale di produzione conferita col contratto a termine da parte degli agricoltori in relazione all'importo del premio e all'avversione al rischio

Queste misure sono state ripetute sia per le varietà moderne di grano sia per le antiche.

*In conclusione sembra di poter affermare che l'utilizzo di strumenti futures possa fornire un contributo non marginale alla riduzione della variabilità dei risultati economici del panificatore soprattutto in periodi di forte turbolenza del mercato.*

## **Azione F5.2 Predisposizione e diffusione di materiale divulgativo/scientifico e organizzazione iniziative pubbliche**

### **Partner SSSUP – Università Pisa**

Il presente progetto Quantica è stato presentato a Expo rurale 2013, un'iniziativa della Regione, che ha permesso di dare visibilità al progetto.







**Misura 124 del PSR 2007-2013 – Cooperazione per lo sviluppo dei nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale**  
**Filiera di riferimento: cerealicola e/o proteoleaginose**  
**Strumento di finanziamento Bando regionale fase 2 – 2012**

**Titolo del progetto:**  
**Pane da antiche varietà di frumento per la valorizzazione della filiera e il miglioramento della salute**  
**QUANTICA (QUALità ANTICA)**

**Descrizione delle innovazioni del progetto:**

Con riferimento ad un'innovazione del **contesto scientifico in ambito nutraceutico/medico (Miglioramento dei parametri cardiovascolari su pazienti alimentati con pane prodotto da una varietà antica di frumento tenero - FT)**, la proposta si è basata su **7 tipologie di innovazione:**

- 1 - Coltivazione di varietà antiche di FT ottimali da punto di vista nutraceutico.
- 2 - Introduzione delle più moderne tecniche di coltivazione legate al metodo integrato e biologico.
- 3 - Macinazione della granella con molini a pietra al fine di ottenere farine non raffinate, genuine e nutrienti grazie alla presenza del germe e della fibra grezza.
- 4 - Fermentazione del pane utilizzando la lievitazione naturale con pasta madre in modo da ottenere un pane più nutriente e digeribile.
- 5 - Caratterizzazione attraverso analisi molecolare sia della flora microbica contenuta nella pasta acida che delle varietà di frumento utilizzate per la produzione del pane.
- 6 - Pane ad elevato contenuto di acido folico.
- 7 - Redazione di un contratto di filiera mediante trasferimento di conoscenze sui costi di produzione e sui possibili profili redditività/rischio di differenti ipotesi contrattuali.

**Principali obiettivi/risultati del progetto:**

Il progetto si propone come **obiettivo generale l'organizzazione e la valutazione tecnico-economica di una filiera corta per la produzione di un pane ottenuto da farine di varietà antiche di FT e caratterizzato da un elevato contenuto di vitamine del gruppo B, B6 ed acido folico, importanti nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.** A tale scopo il progetto si propone **3 obiettivi specifici:**

- 1 - **tecnico-agronomico:** introdurre la coltivazione di alcune varietà che hanno mostrato ottime qualità produttive, salutistiche e tecnologiche; produrre farine secondo due sistemi culturali sostenibili in modo da ottenere un pane ad alto contenuto di acido folico e con caratteristiche organolettiche intervenendo sia sulla macinazione che sulla lievitazione naturale da pasta acida.
- 2 - **socio-economico:** individuazione delle tecniche di produzione e dei costi medi (modali) ad ettaro ed a quintale del FT di varietà moderne e confronto con i costi di produzione di varietà antiche a seconda delle diverse tipologie di produzione. Supportare la redazione di un contratto di filiera per l'acquisto di grano tenero coltivato in Toscana.
- 3 - **nutrizionale-clinico su un campione di pazienti:** caratterizzazione dei parametri bioumorali correlati all'insorgenza di malattie cardiovascolari, del profilo metabolomico e di quello di espressione genica.

**Soggetti partner:**  
 Newcopan – SCUOLA SUPERIORE SANT'ANNA (Istituto di Scienze della Vita) – UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE (Dip. di Area Critica Medico-Chirurgica; Dip. di Scienza delle Produzioni Vegetali, del Suolo e dell'Ambiente Agroforestale – UNIVERSITA' DI PISA (Centro Interdipartimentale di Ricerche Agro-Ambientali "E. Avanzi") – Azienda Agricola Podere La Casetta (Montaione, Fi) – Azienda Agricola Il Sapito (Montaione, Fi) – Azienda Agricola Crocetti Eligio (Castelfiorentino, Fi).

**Costo totale:** 332.598,00 Euro ; **Contributo:** 312.674,20 Euro ; **Durata:** Maggio 2012 – Novembre 2013.  
**Contatti:** Newcopan srl, Empoli, Fi - Serena Migliori [s.migliori@newcopan.it](mailto:s.migliori@newcopan.it);  
 SCUOLA SUPERIORE SANT'ANNA – Dott. Elisa Pellegrino <http://sites.google.com/site/elisapellegrinosite/Home>

Figura 23. Poster presentato a Expo Rurale 2013.

Inoltre all'interno della Giornata dei Georgofili su "Quale futuro per le grandi colture dopo il 2013" è stata eseguita una presentazione dal titolo "Le problematiche agronomiche nella scelta del sistema colturale a livello aziendale" (vedi comunicato stampa Figura 24).



Scuola Superiore  
Sant'Anna  
di Studi Universitari e di Perfezionamento  
**COMUNICATO STAMPA**



***Il 24 maggio (ore 15.00) giornata di studio promossa da Accademia dei Georgofili e Scuola Superiore Sant'Anna***

## **Il futuro delle grandi colture dopo il 2013**

Accademia dei Georgofili e Scuola Superiore Sant'Anna promuovono una giornata di studio sul tema "Quale futuro per le grandi colture dopo il 2013?" per **martedì 24 maggio** (inizio ore 15.00, aula magna della Scuola Superiore Sant'Anna) che vedrà anche la partecipazione di **Enrico Bonari**, Direttore dell'**Istituto di Scienze della Vita** della Scuola Superiore Sant'Anna.

Sarà Enrico Bonari a portare il saluto insieme a **Filiberto Loreti**, Presidente della Sezione Centro Ovest dell'Accademia dei Georgofili. Le relazioni saranno tenute da **Giampiero Maracchi** (Agricoltura, energia e cambiamenti climatici), da **Antonio Michele Stanca** (La genomica e la cerealizzazione dell'agricoltura del futuro), dallo stesso **Enrico Bonari** (Le problematiche agronomiche nella scelta del sistema culturale a livello nazionale), da **Federico Vecchioni** (Le grandi colture tra mercato globale e contesto nazionale). La **conclusione** sarà affidata a **Leonardo Casini**. L'analisi dei recenti dati ISTAT sulla preoccupante riduzione nell'ultimo decennio dei terreni destinati all'agricoltura sarà il punto di partenza delle riflessioni sui futuri scenari delle grandi colture in agricoltura.

**Di seguito è disponibile un intervento di Enrico Bonari per presentare la giornata di studio.**

*"Nell'aprile del 2008 l'Accademia dei Georgofili ha pubblicato un promemoria sulle problematiche prioritarie dell'agricoltura legate alle previsioni di revisione della politica agricola comunitaria (PAC) del 2013 e agli impatti che tale revisione potrebbe determinare sull'agricoltura italiana. In tali raccomandazioni una particolare attenzione è stata rivolta all'urgenza di analizzare le cause di regressione strutturale dell'agricoltura, tra cui la progressiva riduzione della SAU, e al ruolo centrale che la ricerca scientifica deve svolgere a sostegno dell'innovazione, dello sviluppo tecnologico, della diffusione della conoscenza attraverso istruzione, formazione e aggiornamenti professionali. In particolare l'Accademia dei Georgofili ritiene prioritario che debbano essere attentamente considerate anche le conseguenze che la progressiva riduzione dei redditi agricoli ed il miraggio di un "Paese Globale" in cui gli alimenti possono essere prodotti anche a grandi distanze dai consumatori hanno, e continuano ad avere, sull'evoluzione della SAU e sul destino delle grandi colture agrarie in Italia.*

*L'evoluzione delle attività agricole in Italia nel decennio 2000-2010 mette in luce una preoccupante contrazione sia della superficie complessivamente coltivata (- 12%) sia di quella destinata alle principali colture erbacee di pieno campo (- 22% per i cereali e - 60% per le colture industriali) ed in molte aree della penisola si è fatto sempre più evidente e preoccupante il*

**Figura 24.** Comunicato stampa Georgofili 24 maggio 2012.

## Considerazioni conclusive

Le attività nel complesso si sono svolte secondo quanto programmato, salvo alcuni elementi di differenziazione dovuti prevalentemente ad avverse condizioni meteorologiche per quanto riguarda i test in campo.

Le conclusioni sono sostanzialmente sovrapponibili agli obiettivi iniziali, nel complesso è poi possibile ricavare alcuni elementi di “trasferimento dell’innovazione” a denominatore comune dell’intero progetto.

In buona sostanza l’ambito delle attività agronomiche ha evidenziato la fattibilità delle coltivazioni di “varietà antiche” nei tre metodi, biologico, integrato e convenzionale. Le criticità rilevate riguardano rese e resistenza all’allettamento.

Con alcuni distinguo per alcune varietà si è comunque dimostrata possibile il trasferimento “a regime ordinario di produzione” di farine da varietà antiche.

Si è inoltre definita una modalità scientificamente molto avanzata e sicura per poter verificare l’effettivo uso di farine da varietà antiche nei panificati ottenuti.

Sia il panel test sia il consumer test hanno confermato percezioni ben differenziate fra “pane moderno” e pane da antiche varietà di cereali. Questo porta ad individuare e percorrere come punti di forza gli elementi distintivi tra i due tipi di pane focalizzando gli elementi organolettici valutati con maggior positività per i pani da varietà antiche.

L’ambito medico ha pienamente confermato gli effetti positivi del pane da antiche varietà sui più comuni fattori di rischio delle malattie cardiovascolari.

La valutazione dei costi di produzione del grano da antiche varietà ha evidenziato come in estrema sintesi vi siano maggiori oneri correlati alle più basse rese per unità di superficie. Pertanto, in ottica di filiera organizzata, è necessario poter riconoscere all’agricoltore un margine di remuneratività adeguato.

Risultata pertanto pacifico che il costo al consumo del pane dovrà essere più alto rispetto al “pane moderno”.

Ad ogni modo il dato specifico emerso in “consumer test” in cui l’86% del campione si dichiarava “disposto a spendere di più” per l’acquisto di pani da antichi grani rappresenta un buon elemento di conferma circa la percorribilità dell’azione di valorizzazione di questi prodotti nell’ambito di una filiera condivisa.

Montaione 10 ottobre '14

NEWCOPAN SPA  
Il legale rappresentante  
Andrea Dringoli

