

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
DAFNE
Dottorato di Ricerca in Ortoflorofrutticoltura – XXVI ciclo

**STUDIO DELLE INTERAZIONI
TRA CARCIOFO E CARDO
MEDIANTE INNESTO E IBRIDAZIONI**

Dottorando
Gianmarco Pandozy



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
DAFNE**

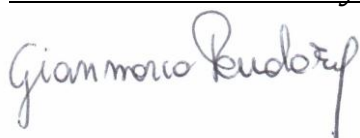
Dottorato di Ricerca in Ortoflorofrutticoltura – XXVI ciclo
Settore scientifico-disciplinare Agr/04

**STUDIO DELLE INTERAZIONI TRA CARCIOFO
E CARDO MEDIANTE INNESTO E IBRIDAZIONI**



Dottorando

Gianmarco Pandozy



Tutor

Dott.ssa Paola Crinò



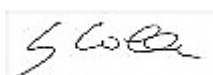
Tutor

Dott. Olindo Temperini



Coordinatore del corso

Dott. Giuseppe Colla



Collaborazioni

CRA-RPS (E. Rea e A. Trinchera) studi anatomico-fisiologici dell'innesto
ENEA UTAGRI-INN (S. Lucretti, D. Giorgi, V. Grosso, A. Farina) citogenetica
Azienda Dimostrativa Sperim. ARSIAL di Tarquinia (R. Mariotti) campi sperimentali

Alla mia famiglia, punto di riferimento della mia vita.

Alle persone che mi sono state sempre vicine.

RIASSUNTO

Il cardo, sia selvatico che coltivato, risulta essere una pianta più tollerante agli stress per cui, essendo botanicamente vicina al carciofo, è possibile trasferire in questa specie tali caratteristiche. È stata quindi studiata l'interazione tra cardo e carciofo e l'utilizzo di eventuali resistenze a stress biotici in carciofo mediante innesti e ibridazioni.

Le fasi del lavoro hanno riguardato (a) preliminarmente lo studio citogenetico a scopo conoscitivo di entrambe le specie per una stima del quantitativo di DNA e la definizione del cariotipo; (b) il reperimento del germoplasma di cardo e l'individuazione di fonti di resistenza a *Verticillium dahliae*; (c) l'utilizzo a breve termine del germoplasma resistente di cardo come portinnesto del carciofo e, (d) a lungo termine, il trasferimento di caratteri in carciofo mediante ibridazioni carciofo/cardo. L'obiettivo a breve termine ha mirato ad utilizzare i genotipi di cardo resistenti a *V. dahliae* mediante la tecnica d'innesto carciofo/cardo, mettendo a punto una procedura ottimale, effettuando studi anatomico-fisiologico nel punto di unione, valutando la compatibilità e le traslocazioni dal portinnesto al nesto, ma soprattutto la risposta agronomica delle combinazioni di innesto.

Il carciofo è una *Asteracea* (Fam. *Compositae*), specie *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* L. cui, secondo i rari dati esistenti in letteratura, possiede 34 cromosomi e circa 2,22 pg di DNA (Marie D. *et al.*, 1993) mentre il cardo (*C. cardunculus* var. *altilis*) possiede anch'esso 34 cromosomi ma un quantitativo di DNA pari a 2,10-2,11 pg (Khaldi *et al.*, 2014); in bibliografia risulta assente uno studio approfondito del cariotipo per entrambe le specie. I genotipi utilizzati per la prova di citologia sono stati: un cardo coltivato (AFGI), un cardo selvatico (AFSA) e due varietà ibride di carciofo (Romolo ed Istar). L'attività è iniziata con l'individuazione del tampone ottimale per l'estrazione dei nuclei da giovani foglie da utilizzare per la stima del contenuto di DNA mediante citofluorimetro. I tamponi testati sono stati: il Tris $MgCl_2$, l'LB01, l'Otto I e II. Successivamente è stata applicata la tecnica di estrazione dei nuclei dalle giovani radici, i cui apici sono stati fissati in formaldeide al 3,5% a diversi tempi di permanenza e successivamente a diverse velocità e tempi di frantumazione per mezzo di un mini-frullatore. Il preparato ottenuto è stato saggiato attraverso un citofluorimetro da cui si è potuto stimare e confrontare il valore di DNA con quello presente in bibliografia e constatare il quantitativo leggermente inferiore per il cardo rispetto al carciofo. Gli esperimenti hanno dimostrato che il procedimento migliore per l'ottenimento delle

sospensioni di nuclei da utilizzare al citofluorimetro è la fissazione in formaldeide 3,5% delle giovani foglie di cardo e carciofo; il mais è stato utilizzato come specie di riferimento. I quantitativi stimati di DNA rispettivamente del carciofo e del cardo sono stati 2,48 e 2,29 pg.

Lo studio del cariotipo del carciofo e del cardo ha inizialmente richiesto l'ottimizzazione del protocollo per la sincronizzazione delle metafasi; per questo motivo sono state testate diverse metodologie, concentrazioni e tempi di permanenza degli apici radicali di carciofo e cardo in APM (amiprophos-methyl), 8-idrossichinolina, orizalina, α -bromonaphtalene, paradichlorobenzene (PDB) e ghiaccio. È stato constatato che l'effetto migliore di sincronizzazione delle metafasi si ha con l'orizalina e l'8-idrossichinolina, cui permettono di ottenere un 20% di metafasi e diminuiscono anche la condensazione dei cromosomi. Il ghiaccio ha invece l'effetto opposto di condensare i cromosomi. La colorazione dei cromosomi è stata quindi eseguita con DAPI e metodo Feulgen, da cui sono state ottenute le foto e utilizzate per l'ottenimento dei primi cariotipi di cardo e carciofo sia mediante il programma Imagej sia utilizzando le immagini ottenute dalle ibridazioni *in situ* (FISH) effettuate. Le sonde utilizzate a riguardo sono state, sia per il carciofo che per il cardo, le seguenti:

(AG)₆ – (AAT)₇ – (GAA)₇ – (TTAGGG)₅ – (AG)₁₂ – (GACA)₄ – (AG)₉ – (CAT)₅ – (ATT)₈ – (AGG)₅ – (GA)₁₀ – (CA)₁₀ – (AAC)₅ – (AT)₇ – (ATC)₅ – pTa 71.

Si tratta di sonde definite “oligonucleotidi”, risultate da marcatori molecolari e quindi da sequenze ripetute e piccole di DNA marcate con dei fluorofori, che si legano alle sequenze corrispettive del DNA di cardo e carciofo. I metodi FISH applicati sono stati la tecnica “Drop spread”, applicata con delle modifiche (Giorgi *et al.*, 2013), e la FISH Standard (Scwarzacher e Heslop Harrison, 2000). Grazie a Levan, un plug-in di Imagej, sono state misurate le lunghezze e tutti i rapporti dei bracci di ognuno dei 34 cromosomi di cardo e carciofo, confermando l'esistenza preponderante di cromosomi sub-metacentrici e di altri più piccoli acrocentrici, in cui un braccio è molto piccolo e quasi assente.

Contemporaneamente allo studio del cariotipo del carciofo e del cardo è stato reperito il germoplasma di cardo selvatico e coltivato da saggiare per la resistenza a *V. dahliae*. In totale è stato fatto uno screening di 51 accessioni di cardo a cui sono state affiancate anche 5 varietà commerciali di carciofo come controllo. Il protocollo di inoculazione è consistito nel taglio delle radici e immersione delle piantine nella sospensione fungina con 5×10^5 conidi/ml. L'incubazione è stata effettuata in condizioni

controllate ($t=24\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.=60%). Sono state individuate in totale 9 accessioni di cardo più resistenti a *V. dahliae*. Le piante sopravvissute ai test sono state trasferite in vaso e propagate per una loro moltiplicazione.

Le tolleranze individuate nelle accessioni di cardo sono state quindi utilizzate, a breve termine, mediante innesti carciofo/cardo. A riguardo, sono state applicate tre tipologie d'innesto, a spacco inglese e spacco in testa con o senza i cotiledoni, per i seguenti genotipi: cardo coltivato (CC) – AFB, AFGI, Versi; cardo selvatico (WC) – AFSA, AFSI, come portainnesti e carciofo – F1 Romolo, Istar e Opal come nesti. La tecnica a spacco inglese in carciofo non presenta la problematica del ricaccio dei germogli dal portainnesto. Questa è stata osservata con lo spacco in testa dove il taglio è stato eseguito al di sopra dei cotiledoni; con l'eliminazione dei cotiledoni, si potrebbe risolvere il problema. Ha rappresentato notevole importanza lo studio anatomico-fisiologico del punto d'innesto effettuato per mezzo del SEM (Electron Scanning Microscopy) a pressione variabile sulle stesse tipologie d'innesto. Le analisi sono state effettuate a 3, 6, 10, 12, 17, 20, 30 giorni e anche dopo due mesi dalla data d'innesto, evidenziando che la cicatrizzazione avviene in tutte le combinazioni e non è influenzata né dal genotipo, né dalla tipologia d'innesto. In particolare, la combinazione d'innesto carciofo/WC, ha manifestato elevata affinità e, già dopo 3 gg. dall'innesto, erano visibili dei plasmodesmi tra i due bionti nel punto d'innesto e, a 6 gg., erano visibili piccoli ponti di connessione tra il tessuto indifferenziato del callo; a 12 gg., il tessuto cominciava a differenziarsi. Nella combinazione carciofo/CC, i plasmodesmi sono comparsi dopo 6 gg dall'innesto, mentre i piccoli ponti di connessione erano visibili solo dopo il decimo giorno; la differenziazione dei tessuti è avvenuta dopo il dodicesimo giorno.

Lo studio dei cambiamenti anatomico/fisiologici nel punto d'innesto è stato ampliato con la valutazione della compatibilità dal punto di vista morfologico, verificando il numero dei vasi che caratterizzano i diversi genotipi utilizzati come bionti. Nell'innesto, l'uniformità di sviluppo della pianta svolge una notevole importanza nell'attecchimento, ma anche la distribuzione dei vasi e il loro numero facilitano la cicatrizzazione dei due bionti. I genotipi utilizzati sono stati: il cardo selvatico AFSA e il coltivato AFB mentre il carciofo Romolo è stato utilizzato come nesto. Sono state fatte delle sezioni trasversali dei fusti che, viste al microscopio ottico, hanno evidenziato come la posizione dei vasi sia concentrata al centro; le sezioni di AFB e Romolo, oltre ad essere simili per dimensione, hanno anche un numero e una

simmetria dei vasi che invece non si trova nel cardo selvatico AFSA. È stato poi praticato l'innesto a spacco inglese alle stesse piantine e, dopo 26 giorni, sono state lasciate ad imbibirsi con un colorante per valutare la traslocazione dello stesso nel punto d'innesto. Praticando sezioni longitudinali del fusto nel punto d'innesto, non sono stati evidenti veri e propri vasi ma solo dei punti di connessione e di ripresa della vascolarizzazione. Da un punto di vista agronomico e di attività antiossidante, le piante innestate non hanno mostrato comportamenti significativamente diversi rispetto alle piante non innestate.

Per l'obiettivo a lungo termine della tesi, le ibridazioni fino ad ora effettuate sono state:

- genotipo maschiosterile MS6 ibridato con 11 genotipi di cardo coltivato – AFB, Bianco gigante, AFGI, AFFF, Cerveteri, AFM, AFN, 33, 32 e selvatico – AFSI, AFSA;
- 3 linee selezionate (7, 14, 21) di carciofo (portaseme) ibridati con 3 cardi (AFB, AFM) e reciproci.

Preliminarmente sono state ripetute per due anni (2012 e 2013) le caratterizzazioni morfologiche delle linee parentali utilizzate di cardo; in particolare sono state valutate 3 piante per ognuno degli 11 genotipi di cardo, utilizzando i descrittori UPOV specifici per il cardo proposti dalla Dott.ssa Romana Bravi del C.R.A. Svolge un ruolo importante la ricerca di piante maschiosterili che, per la segregazione dei caratteri, si manifesta in generazione F_2 , dopo autofecondazione degli ibridi. Pertanto, è stata valutata la vitalità pollinica di diverse F_2 carciofo x cardo mediante colorazione con carminio acetico. Su un totale di 273 piante analizzate, sono state individuate 6 piante maschiosterili.

In conclusione, l'attività svolta in questa ricerca ha permesso di stimare il quantitativo di DNA del cardo e del carciofo e di effettuare i rispettivi cariotipi mai sviluppati fino ad ora, ma vista la grande difficoltà nel sincronizzare, nello stadio giusto della mitosi, gli apici radicali e quindi nell'ottenere un numero di metafasi sostanzioso, si necessita di un ulteriore approfondimento specifico. Lo studio verrà facilitato con l'utilizzo della metodica FISH e di sonde specifiche per il carciofo che permetteranno d'identificare i singoli cromosomi.

Sono state individuate 9 accessioni di cardo risultate resistenti a *V. dahliae*, di cui 5 di cardo selvatico e 4 di cardo coltivato; sarà importante effettuare una moltiplicazione e caratterizzazione morfologica in campo di questi genotipi.

Agronomicamente l'innesto migliore è risultato lo spacco inglese perché non presenta la problematica dell'emissione dei germogli laterali di cardo; al contrario l'analisi anatomica e fisiologica ha invece evidenziato una capacità di attecchimento migliore dello spacco in testa, vista la maggiore superficie di contatto tra i bionti. Questo è stato anche confermato dalle analisi SEM con cui è stato seguito il processo di cicatrizzazione in diverse combinazioni d'innesto.

Il trasferimento di geni interessanti dal cardo al carciofo richiede un'attività a lungo termine, e sono stati avviati i lavori per definire i parentali ottimali di cardo (maschile) e individuati ulteriori genotipi maschiosterili come parentali femminili. Sono state tentate alcune combinazioni di incrocio, valutate solo in parte da un punto di vista agronomico.

ABSTRACT

Cultivated and wild cardoon are stress tolerant plants that, being botanically close to artichoke, can transfer this characteristic into this species. So, the PhD work aims at studying the interaction between artichoke and cardoon and at using any resistance to biotic stresses of cardoon both through graftings and hybridizations with artichoke.

The phases of the PhD work have been focused on (a) a preliminary cytogenetic study for cognitive purposes of both species to estimate the amount of DNA and the definition of the karyotype; (b) the collection of cardoon germplasm and the identification of sources of resistance to *Verticillium dahliae*; (c) the short-term use of resistant cardoon rootstocks in graftings with artichoke, (d) the long-term transfer of verticillium resistance sources through artichoke x cardoon hybridizations. The short-term activity aimed at using the cardoon genotypes resistant to *V. dahliae* in artichoke / cardoon graftings, at developing the best grafting practice to apply, at conducting anatomical and physiological studies on the grafting union formation as well as at studying the rootstock/scion compatibility and translocations; the agronomic response and the antioxidant activity of grafting combinations have been reported.

Artichoke is an *Asteracea* (Fam. *Compositae*), *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* L. that, according to the rare data existing in literature, has 34 chromosomes and about 2.22 pg of DNA (Marie D., *et al.*, 1993); while cardoon (*C. cardunculus* var. *altilis*) has also 34 chromosomes but a DNA amount of 2.10 - 2.11 pg (Khaldi *et al.*, 2014); bibliographic references on the karyotype studies of both species are quite absent. The genotypes used for the cytology studies were a cultivated cardoon (AFGI), a wild cardoon (AFSA) and two F₁ hybrid varieties of artichoke (Romolo and Istar). The activity was started by the identification of a buffer optimal for the extraction of nuclei from young leaves to be used for the DNA content estimation by flow cytometry. The buffers tested were: Tris MgCl₂, the LB01, the Otto I and II. Subsequently, the extraction technique of nuclei from young roots was applied; the apices were fixed in 3.5% formaldehyde at different permanence times, speeds and times of crushing by a mini-blender,. The preparations obtained have been assessed by a flow cytometer from which it was possible to estimate and compare the DNA values with those found in literature; a quantity slightly lower for cardoon respect to artichoke was determined. The experiments have shown that the best procedure for obtaining suspensions of nuclei to be used in flow cytometry is represented by the fixation in 3.5% formaldehyde of the young leaves both of cardoon and artichoke; corn was used as the reference species. The

DNA quantities estimated for artichoke and cardoon were 2.48 and 2.29 pg, respectively. Karyotype studies of artichoke and cardoon initially required to optimize the protocol for the synchronization of the metaphases. For this reason, several methods have been tested by dipping, at different concentrations and times, the root tips of both species in APM (amiprophos-methyl), 8-hydroxyquinoline, orizalina, α -bromonaphthalene, paradichlorobenzene (PDB) and ice. The best effect of synchronization of metaphases was that with the orizalina and 8-hydroxyquinoline, which allow to obtain a 20% of the metaphases and also decrease the condensation of chromosomes. Ice had the opposite effect of the chromosomes condensation. Staining of the chromosomes was then performed with DAPI and Feulgen method, from which the photos were obtained and used for developing the first karyotypes of cardoon and artichoke either using the Imagej program or the images made by *in situ hybridization* (FISH). The probes used for both artichoke and cardoon have been as follows:

(AG)₆ - (AAT)₇ - (GAA)₇ - (TTAGGG)₅ - (AG)₁₂ - (GACA)₄ - (AG)₉ - (CAT)₅ - (ATT)₈ - (AGG)₅ - (GA)₁₀ - (CA)₁₀ - (AAC)₅ - (AT)₇ - (ATC)₅ - pTa71.

They are defined as "oligonucleotide" probes resulting from molecular markers and then by repeated sequences and small DNA labelled with fluorophores, which bind to corresponding DNA sequences of cardoon and artichoke. The methods applied were the FISH "Drop spread" technique modified by Giorgi *et al.* (2013) and the Standard FISH technique (Scwarzacher and Heslop Harrison, 2000). Levan, a plug-in for ImageJ program, has been used to obtain the lengths and the ratios of the arms of each of the 34 chromosomes of cardoon and artichoke, confirming the existence of predominant sub-metacentric and other smaller acrocentric chromosomes.

At the same time, after a preliminary collection, the cultivated and wild cardoon germplasm has been tested for resistance to *V. dahliae*. In total, a screening of 51 accessions of cardoons, which have been accompanied also by 5 commercial varieties of artichoke as control, has been made. The inoculation protocol consisted in cutting the roots of seedlings and dipping them into the fungal suspension containing 5×10^5 conidia/ml. Incubation was carried out under controlled conditions ($t = 24 \pm 2^\circ\text{C}$, RH = 60%). A total of 9 cardoon accessions have been identified as more or less resistant to *V. dahliae*. The plants survived after the test was transferred into the pots for their multiplication.

The tolerances identified in the cardoon accessions were used in a short term activity based on artichoke/cardoon graftings. In this regard, three types of grafting,

tongue and cleft grafting with or without cotyledons, have been applied onto these following genotypes: cultivated cardoon (CC) - AFB, AFGI, Versi and wild cardoon (WC) - AFSA, AFSI as rootstocks and artichoke - F1 Romolo, Istar and Opal as scions. Tongue grafting technique did not give the problem of the regrowth of shoots from the rootstock, as observed with the cleft grafting, where the cut is made above the cotyledons; elimination of the cotyledons might solve the problem. The anatomical and physiological aspects of the grafting union formation, carried out by SEM (Scanning Electron Microscopy) on the same types of grafting, were of considerable importance. The analyses were performed at 3, 6, 10, 12, 17, 20, 30 days and even two months after grafting, pointing out that the grafting union is affected neither by the genotype nor by the type of grafting. In particular, the artichoke/WC grafting combination has shown high affinity already after 3 days after the grafting; plasmodesmata were visible between the two bionts into graft junction in 6 days and small bridges were visible as connections between the undifferentiated callus tissues after 12 days, when the tissues began to differentiate. In the artichoke/CC combination, plasmodesmata have appeared 6 days after grafting, while the small bridges of connection were visible only after the tenth day; tissue differentiation took place after the twelfth day. The study on anatomical/physiological changes into graft union formation has been expanded with the assessment of the compatibility of the two bionts from the morphological point of view, checking the number of vessels that characterize the genotypes used as rootstock and scion. In the grafting, the uniformity of the plant development plays a considerable importance for the graft union, but also the distribution of the vessels and their numbers can facilitate the cicatrization of the cutting surfaces. The genotypes used were: wild cardoon AFSA and cultivated cardoon AFB as a rootstock, while Romolo was used as scion. Sections of the stems were made; by the optical microscope, they showed that the position of the vessels is concentrated in the centre; AFB and Romolo, being of similar size, also have a number and a symmetry of the vessels that instead is not present in the wild cardoon AFSA. Then, tongue grafting technique was practiced onto the same analysed seedlings, which have been left to blend for 26 days in a colorant to evaluate its translocation in the coupling point of the grafting. Longitudinal sections of the stem from the coupling point have been made; obviously, not real vessels but only connection points and recovery of the vasculature were evident. From an agronomical point of view and antioxidant activity, the grafted plants did not show any significant different behaviour respect to the non-grafted plants.

For the long-term activity of the thesis, hybridizations were carried out. They were as follows:

- male-sterile genotype MS6 hybridized with 11 genotypes of cultivated cardoon - AFB, Bianco Gigante, AFGI, AFFG, Cerveteri, AFM, AFN, 33, 32 and wild - AFSI, AFSA;
- 3 artichoke selected lines (7, 14, 21) (seed-bearing) hybridized with 3 cardoons (AFB, AFM) and reciprocal.

Preliminarily, a morphological characterization were repeated for two years (2012 and 2013) of the cardoons parental lines used; in particular, 3 plants for each of the 11 genotypes of cardoon were evaluated using the UPOV descriptors specific for cardoon, as proposed by Dr. Roman Bravi from CRA. The search for male sterile plants, occurring in the F₂ generation after selfing of hybrids for the segregation of characters, plays an important role in breeding activity. Pollen vitality of different F₂ artichoke x cardoon populations was assessed by its staining with acetic carmine. Out of a total of 273 plants analysed, 6 new male-sterile plants were identified.

In conclusion, the activities carried out in this study allowed to estimate the amount of DNA of cardoon and artichoke and to make their karyotypes never seen before. Nevertheless, considering the great difficulties in synchronizing the cells of the root tips in the right stage of mitosis, so getting a substantial number of metaphases, further specific studies are required. Use of the FISH analysis and specific probes for artichoke, that will allow to identify the individual chromosomes, could implement the data up now obtained. Nine accessions of cardoon proved to be resistant to *V. dahliae*, these including 5 of wild and 4 of cultivated cardoon; a multiplication and morphological characterization of these genotypes in the field is important.

Agronomically, the tongue technique revealed to be the best grafting procedure used because it does not give the problematic development of side shoots from the rootstock cardoon; on the contrary, the anatomical and physiological analyses have instead showed a better engraftment capacity of the bionts by cleft grafting, due to the greater surface area of contact between rootstock and scion.

Considering that the transfer of characters of interest by artichoke x cardoon hybridizations requires a long-term activity, nevertheless, some effort has been made to obtain stable parental lines by alternating selfing and sib-crosses to avoid negative effects due to inbreeding depression. Some hybrid combinations have been accomplished but their genetic and agronomic evaluations will be carried out next year.

INDICE

INDICE

1. <u>PORTE GENERALE</u>	pp.	1
1.1 IL CARCIOFO E IL CARDO	pp.	3
1.1.1 Cenni storici	pp.	3
1.1.2 Cenni tassonomici e botanici	pp.	4
1.1.3 Risorse genetiche	pp.	10
a. Pool genetico coltivato	pp.	10
b. Pool genico selvatico	pp.	13
c. Controllo genetico di caratteri economicamente importanti	pp.	13
d. Conseguenze dell'inbreeding	pp.	14
e. Eterosi	pp.	14
f. Maschiosterilità	pp.	14
– Origini e reperimento della Maschiosterilità	pp.	15
– Classificazione	pp.	16
i. Maschiosterilità genetica	pp.	17
ii. Maschiosterilità non genetica	pp.	18
– Utilizzo della Maschiosterilità	pp.	19
1.1.4 Situazione della coltura nel Mondo	pp.	19
1.1.5 Situazione della coltura in Italia	pp.	22
a. Situazione della coltura Lazio	pp.	26
1.1.6 Panorama varietale italiano	pp.	28
a. Carciofo "Romanesco"	pp.	30
1.1.7 Aspetti agronomici	pp.	33
a. Esigenze pedo-climatiche	pp.	33
b. Esigenze idriche	pp.	34
c. Esigenze nutritive	pp.	34
d. Propagazione	pp.	35
– Metodi convenzionali	pp.	35
i. Carducci	pp.	36
ii. Ovuli	pp.	36
iii. Zampe	pp.	37
– Metodi innovativi	pp.	37
– Propagazione gamica	pp.	40
e. Tecniche colturali	pp.	41
f. Avversità da stress biotici	pp.	44
g. Fisiopatie	pp.	47
1.1.8 Importanza alimentare	pp.	47
1.1.9 Impiego industriale e sottoprodotti	pp.	49
 2. <u>PARTE SPERIMENTALE</u>	pp.	51
2.1 OBIETTIVI GENERALI DELLA RICERCA	pp.	53
2.2 CARATTERIZZAZIONE CITOGENETICA	pp.	55
2.2.1 Introduzione	pp.	55
2.2.2 Materiali e metodi	pp.	56
a. Materiale vegetale	pp.	56

b.	Citometria a flusso	pp.	57
–	Isolamento dei nuclei	pp.	57
–	Analisi al citometro	pp.	58
c.	Citogenetica	pp.	59
–	Pretrattamenti alle radici	pp.	59
–	Stoccaggio degli apici radicali	pp.	61
–	Preparazione dei vetrini	pp.	61
–	Colorazione dei cromosomi	pp.	62
d.	Ibridazione <i>in situ</i> FISH	pp.	62
–	Sonde utilizzate	pp.	62
–	Metodi FISH	pp.	63
–	Microscopia ed analisi delle immagini	pp.	64
2.2.3	Risultati	pp.	64
a.	Citometria a flusso	pp.	64
b.	Citogenetica: ottimizzazione dei protocolli	pp.	67
–	Pretrattamenti alle radici	pp.	67
–	Preparazione dei vetrini	pp.	69
–	Metodi FISH	pp.	69
–	Analisi morfologica e definizione del cariotipo di cardo e carciofo	pp.	69
c.	Ibridazione <i>in situ</i> FISH	pp.	74
2.3	REPERIMENTO DEL GERMOPLASMA E SELEZIONE PER TOLLERANZA A STRESS BIOTICI	pp.	77
2.3.1	Introduzione	pp.	77
2.3.2	Materiali e metodi	pp.	77
a.	Reperimento del germoplasma	pp.	77
b.	Screening per tolleranza a <i>V. dahlie</i>	pp.	79
2.3.3	Risultati	pp.	83
2.4	OBIETTIVO A BREVE TERMINE: INNESTO	pp.	87
2.4.1	Introduzione	pp.	87
2.4.2	Materiali e metodi	pp.	88
a.	Microscopia elettronica a scansione (SEM)	pp.	88
b.	Materiale vegetale e condizioni colturali	pp.	89
c.	Tecnica di innesto	pp.	93
–	Esperimenti primaverile ed autunnale	pp.	93
–	Confronto tra le tecniche	pp.	94
d.	Studi anatomici	pp.	95
–	Esperimenti primaverile ed autunnale	pp.	95
–	Confronto tra le tecniche dal punto di vista fisiologico	pp.	96
e.	Valutazione della compatibilità	pp.	97
f.	Analisi qualitativa	pp.	99
–	Preparazione dell'estratto	pp.	100
–	Determinazione dell'attività antiossidante	pp.	100
–	Determinazione del contenuto di fenoli totali	pp.	101
g.	Caratterizzazione agronomica	pp.	102
2.4.3	Risultati	pp.	103
a.	Tecnica ottimale	pp.	103
b.	Esperimento primaverile ed autunnale	pp.	106

–	Esperimento primaverile	pp.	106
–	Esperimento autunnale	pp.	111
–	Comparazione degli esperimenti	pp.	111
c.	Confronto tra le tecniche	pp.	116
d.	Valutazione della compatibilità	pp.	122
e.	Analisi qualitativa	pp.	127
–	Determinazione dell'attività antiossidante	pp.	129
–	Determinazione del contenuto di fenoli totali	pp.	130
f.	Caratterizzazione agronomica	pp.	130
2.5	OBIETTIVO A LUNGO TERMINE: IBRIDAZIONI	pp.	133
2.5.1	Introduzione	pp.	133
2.5.2	Materiali e metodi	pp.	135
a.	Materiale vegetale e condizioni colturali	pp.	135
b.	Caratterizzazione parentali	pp.	136
c.	Ricerca di nuovi genotipi maschiosterili	pp.	143
d.	Incroci	pp.	144
e.	Metodi di elaborazione statistica	pp.	146
2.5.3	Risultati	pp.	146
a.	Caratterizzazione carciofi e cardi	pp.	146
b.	Maschiosterili	pp.	151
c.	Incroci effettuati	pp.	153
2.5.4	Stage in California	pp.	158
a.	Attività	pp.	158
b.	Risultati	pp.	158
2.6	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pp.	162
2.7	RINGRAZIAMENTI	pp.	166
2.8	BIBLIOGRAFIA	pp.	168

PARTE GENERALE

1.1 IL CARCIOFO E IL CARDO

1.1.1 CENNI STORICI

Il carciofo (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) è un ortaggio tipico e molto diffuso nel bacino del Mediterraneo sin dai tempi dei Greci e dei Romani che ne apprezzavano le caratteristiche gastronomiche e curative.

La sua origine non è ben chiara, ma di sicuro proviene dai paesi del bacino del Mediterraneo orientale, comprese le isole Egee e Cipro, e dell'Africa settentrionale, compresa l'Etiopia e l'Egitto (Bianco *et al.*, 1990), dove tuttora sono presenti diverse specie spontanee del genere *Cynara*. Le prime tracce della sua coltivazione, ma anche di cardì selvatici e spinosi, si hanno con gli Arabi, nel IV secolo a.C., che ne apprezzavano le sue caratteristiche organolettiche, nutrizionali e terapeutiche (corroboranti, diuretiche, depurative). La domesticazione del carciofo in Italia è iniziata in Sicilia, a seguito dell'occupazione greca durante il I secolo a.C., continuata poi, ad opera di giardinieri che ne hanno selezionato le prime cultivar, idonee all'alimentazione umana da specie selvatiche compreso il cardo.

La prima testimonianza scritta della coltivazione risale al *Naturalis Historia*, trattato naturalistico di Gaio Plinio Secondo del I sec. d.C. in cui è riportata una distinzione tra cardo selvatico e carciofo, assieme a vere e proprie indicazioni sulla loro coltivazione. La coltivazione del carciofo si è successivamente estesa a tutti i paesi del Mediterraneo e dell'Europa centrale e intorno al 1700, è arrivata anche negli Stati Uniti (Oliaro, 1967).

Le prime descrizioni delle varietà di carciofo risalgono comunque al XVIII secolo, ma già prima erano probabilmente noti diversi tipi. Ai tempi di Plinio c'era infatti distinzione tra i carciofi provenienti dalla Numidia e quelli importati dalla Libia (Viani, 1929), nel 1735 si distinguevano varietà provviste e sprovviste di spine mentre, nel 1810, Filippo Re differenziava un carciofo domestico o “Mazzaferrata dei toscani” da uno selvatico o “Sgalera dei toscani”.

Secondo Columella, il nome del genere *Cynara* potrebbe derivare da “cinis”, dal momento che il terreno, destinato ad ospitare le piante di carciofo era solitamente cosparso di cenere; a riguardo, è stata osservata un'analogia tra il colore grigio-verde delle foglie e la cenere. Secondo la mitologia greca, invece, il nome potrebbe derivare da Cynara, una bella fanciulla dai capelli color cenere trasformata in carciofo da Giove innamorato. In greco, il termine “*kinara*” sembra comune a molte piante spinose mentre

il termine “*scolymus*” significa appuntito, spinoso e potrebbe alludere proprio alla forma appuntita di alcuni tipi di carciofo o alla presenza di spine. È più probabile invece che il termine carciofo derivi dal latino “*artiacus*”, da cui la parola italiana, attualmente in disuso di “articiocco”, quella francese di “*artichaut*” e quella inglese di “*artichoke*” (Oliaro, 1967).

1.1.2 CENNI TASSONOMICI E BOTANICI

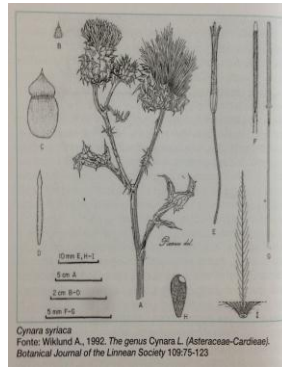
Il carciofo [*Cynara scolymus* L. = *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori], è un’angiosperma dicotiledone appartenente all’ordine delle *Asterales* che, con le due famiglie *Asteraceae* e *Cichoriaceae*, raggruppa circa 19.000 specie, nella sottofamiglia *Tubuliflorae* ed nella tribù *Cynareae* (Bianco, 1990).

Altre specie di interesse agronomico appartenenti alla famiglia delle *Asteraceae* sono: *Cynara cardunculus* var. *cardunculus* (cardo), *Helianthus annuus* (girasole), *Carthamus tinctorius* (cartamo), *Matricaria chamomilla* (camomilla), *Chamaemelum nobile* (camomilla romana), *Achillea millefolium* (cerfoglio), *Dahlia variabilis* (dalia). La famiglia è caratterizzata dalla presenza di piante erbacee robuste erette e perenni, fiori tubulosi e spesso anche ligulati, con ligula formata da tre petali e presenza di ghiandole schizogene oleifere, ricche di olii eterei (Strasburger, 1982); il genere *Cynara* si caratterizza invece per la presenza di soli fiori tubulosi (Pignatti, 1982).

Il nome *C. scolymus* L., fu dato al carciofo da Linneo nel 1753, anche se, per il fatto che non si conosce allo stato selvatico, Pignatti (1982) ha preferito considerarlo una sottospecie di *C. cardunculus* L. denominandolo perciò *C. cardunculus* L., subsp. *scolymus* (L.) Hayek (Bianco *et al.*, 1990). Oltre al carciofo e al cardo, il genere *Cynara* include (secondo Wiklund), un altro raggruppamento di specie selvatiche (Fig. 1.1.1) quali: *C. syriaca*, *C. auranitica*, *C. cornigera*, *C. algarbiensis*, *C. baetica*, *C. cyrenaica* e *C. humilis* (Fig. 1.1.2).



Fig. 1.1.1 – Distribuzione delle diverse specie del gen. *Cynara* (Pignone *et al.*, 2009).



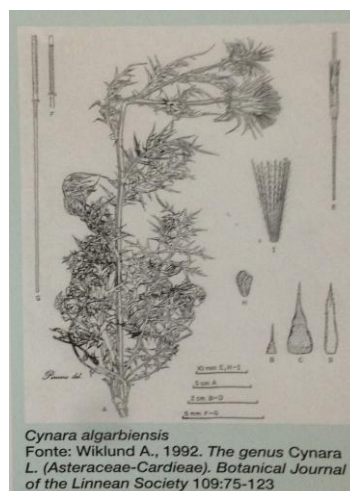
C. syriaca, tipico delle zona della Siria meridionale, Libano nord-occidentale ed Israele, presenta un pianta robusta con steli fiorali lunghi e pochi capolini abbastanza grandi.



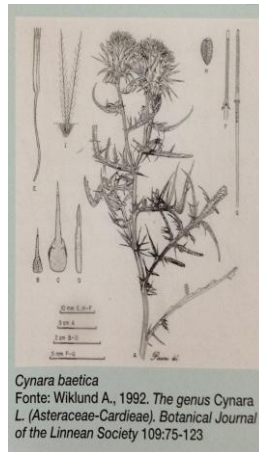
C. auranitica cresce spontaneamente in Turchia sud-orientale, nel nord dell'Iraq, a sud-ovest della Siria, nel sud del Libano, in Iran ed in Israele.



C. cornigera è una pianta piuttosto piccola con corte infiorescenze, fiori bianchi e foglie verdi brillanti. È diffusa nella zona del Mediterraneo orientale ed in particolare in Grecia, Libia ed Egitto.



C. algarbiensis è una specie di sviluppo ridotto e caratteristica della zona sud-occidentale della Penisola Iberica.



C. baetica è una pianta di taglia media con foglie a venature biancastre e capolini con brattee dai margini scuri; ne esistono due sottospecie diffuse nelle regioni montuose della Spagna a fiori bianchi e nelle montagne dell'Atlante in Marocco a fiori bluastri.



C. cyrenaica è una delle specie selvatiche meno conosciute e diffuse nella regione omonima della Libia e Creta.



C. humilis ha una taglia abbastanza piccola che si diversifica dalle altre specie selvatiche per la presenza di acheni alati; è diffusa nella parte sud-occidentale della Penisola Iberica, Marocco ed Algeria.

Fig. 1.1.2 – Raggruppamento di specie selvatiche del genere *Cynara* (Wiklund, 1992; Pignone *et al.*, 2009).

L'origine del carciofo è stata studiata, per la prima volta, nel 1848 da De Candolle, il quale basandosi su aspetti di ordine morfologico, concluse che il carciofo deriverebbe dalla specie *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori ($2n=2x=34$) (*Cynareae* selvatiche della regione mediterranea). Basnizki (1981) e Bianco *et al.* (1990) invece,

dopo ripetuti incroci fra due specie selvatiche ed una coltivata, sono riusciti a dimostrare l'affinità genetica tra il carciofo coltivato var. “Gros Camus de Bretagne” (cultivar di carciofo coltivata in Bretagna, Francia) e le specie selvatiche di *Cynara*, *C. cardunculus* L. e *C. syriaca* Boiss (Fig. 1.1.3).

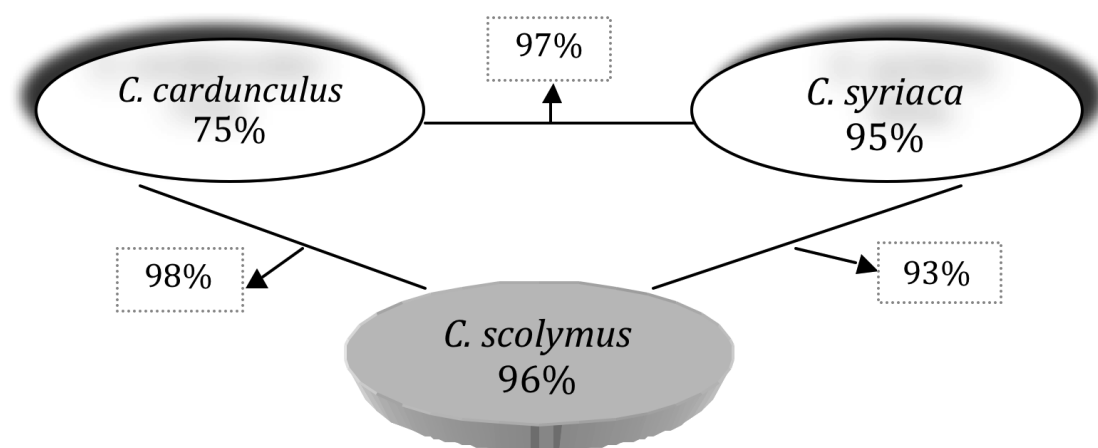


Fig. 1.1.3 – Fertilità del polline di tre *Cynareae* e dei loro ibridi F₁ (Basnizki, 1981).

Sulla base di questi risultati, Basnizki (1981), ha dimostrato che le tre specie incrociate sono da ritenere razze geo-ecologiche di una stessa specie biologica che rappresenta il “pool-genetico” selvatico della pianta coltivata.

I più importanti caratteri botanici che caratterizzano il carciofo sono i seguenti:

- pianta erbacea poliennale con corredo cromosomico diploide ($2n=2x=34$);
- germinazione del seme di tipo ipogeo che genera un apparato radicale di tipo fittonante;
- organi di riserva quali il rizoma (fusto trasformato) e le radici ingrossate;
- fusto raccorciato, non ben differenziato dal rizoma, con una gemma apicale da cui si originano lo scapo fiorale e numerose gemme laterali che svilupperanno i carducci e da questi gli ovoli;
- foglie che differiscono sensibilmente fra le diverse cultivar per il margine, il colore, la forma, la spinescenza, la lunghezza;
- fiori ermafroditi, di colore violaceo, raggruppati in una infiorescenza (capolino);
- gineceo formato da un ovario infero monovulare, che dà origine ad un achenio (frutto), da uno stilo e da uno stigma bifido le cui parti recettive rimangono aderenti nella parte longitudinale mentre è libera per la germinazione del polline solo la parte laterale;

- androceo composto da cinque stami liberi con le antere saldate tra loro a formare un tubo;
- polline di colore bianco avorio, fortemente glutinoso e riunito in piccole masse compatte;
- impollinazione entomofila, dovuta all'asincronia tra la maturazione del polline e la recettività dello stigma (proterandria) che rende la specie allogama;
- fioritura scalare che procede dall'esterno verso l'interno del capolino (centripeta);
- parte edule costituita dalle infiorescenze immature e dal ricettacolo carnoso (capolini);
- frutti costituiti da acheni duri e globosi, di forma obovata, tronchi all'estremità e di colore grigio marmorizzato di bruno, con una grande quantità di pappo formato da setole piumose pluriseriate, riunite alla base e caduche con essi (Jacoboni, 1958);
- produzione di 9-40 g di seme per capolino (peso 1000 semi = 30-70 g (Pignatti, 1982).

I capolini si trovano all'apice del fusto principale e di quelli secondari, che si formano all'ascella delle foglie: i primi capolini presentano uno sviluppo maggiore rispetto ai secondari.

L'involucro di ogni infiorescenza si presenta espanso, quasi globulare, con brattee piuttosto larghe, ingrossate alla base, quasi glabre, bislunghe-triangulari e disposte in serie; le brattee interne presentano all'apice una breve appendice scariosa e spinescente, traslucida ad infiorescenza matura. Il ricettacolo è carnoso, piatto, discoidale, setoloso nella parte superiore. Sul ricettacolo sono inseriti i fiori ermafroditi, di colore azzurro intenso o violetto o eccezionalmente bianco: essi prendono il nome di flosculi (Jacoboni, 1958).

Inframmezzate fra i flosculi e direttamente inserite sul talamo, si notano numerose setole bianche e traslucide, assai rigide; esse misurano 200 μm di spessore e la loro superficie appare irregolarmente striata in senso longitudinale (Jacoboni, 1958).

I flosculi sono provvisti di un ovario infero monovulare, di forma tendenzialmente parallelepipedica asimmetrica, sormontato da un lungo tubo corollino, la cui base è circondata da un cerchio di peli che costituiscono il pappo. Tale organo, che misura circa 130 μm di spessore, una volta raggiunta la maturazione degli acheni, assolve l'importante compito di agevolare la disseminazione; deriva da una trasformazione del calice, i cui elementi si sono convertiti in sottili peli bianchi e piumosi.

La corolla, che per circa i due terzi della sua lunghezza è cilindrico-tubulosa, nel terzo distale si dilata, quindi si restringe per poi dividersi in cinque petali canalicolati ed

arrotondati all'apice, tutti di uguale lunghezza meno uno, più sviluppato degli altri. La corolla è bianca madreperlacea; nella sua porzione terminale, però, immediatamente sopra alla dilatazione ampolliforme, diviene gradualmente rosso-bruna e quindi azzurro-violacea nei petali.

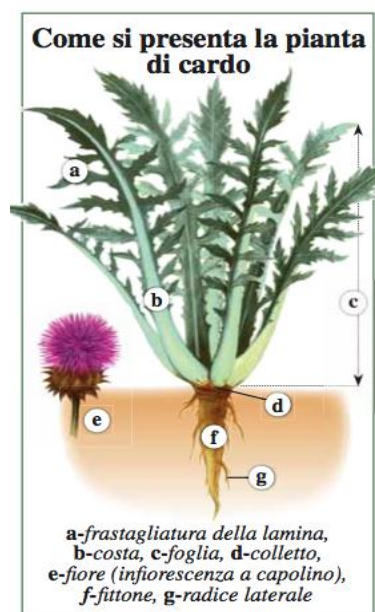
Le antere, essendo concresciute, aderiscono fortemente l'una all'altra, in modo da costituire un tubo che fluttua nell'interno della dilatazione ampolliforme della corolla ed è, a sua volta, attraversato dal pistillo. I filamenti staminali sono concresciuti con il tubo corollino per un lungo tratto, ma diventano liberi non appena la corolla accenna a dilatarsi a forma di ampolla.

Il polline è di color bianco avorio, fortemente glutinoso, perciò i singoli granuli aderiscono reciprocamente formando delle piccole masse compatte. Allo stato secco questi sono ellissoidali e presentano la superficie verrucosa. Le dimensioni medie di un granulo pollinico sono di 60 x 50 micron e sembra che non differiscano tra cardo e carciofo. Ciascun fiore produce una elevata quantità di polline che, in gran parte, viene rapidamente bottinato dalle api e dagli altri insetti pronubi che ne sono particolarmente attratti. Da un'unica infiorescenza sono stati raccolti fino a 400 mg di polline (Jacoboni, 1958).

All'interno del tubo corollino e di quello anterico, decorre il lungo stilo, di color bianco madreperlaceo ad eccezione del tratto terminale corrispondente al terzo superiore, dove gradualmente diviene violaceo. Alla base della zona così pigmentata, lo stilo è provvisto di un cerchio di papille che costituiscono l'anello dei petali collettori del polline. Lo stigma è costituito da due ramificazioni a sezione ellittica che diventano facilmente distinguibili all'apice dei fiori a fine antesi poiché allora tendono a divaricarsi.

Il frutto è un achenio obovato, subtetragono, duro, costolato, glabro, con pappo e setole piumose e plurisetate, riunite alla base e caduche con esso (Jacoboni, 1958). Nel linguaggio comune, gli acheni sono denominati "semi". Il cardo è una pianta erbacea perenne in natura e annuale in coltura. Senza dubbio è uno degli ortaggi che presenta maggiore sviluppo vegetativo, potendo raggiungere e superare un metro e mezzo di altezza (Cipriani, 2007).

Fig. 1.1.4 – Tipica pianta di cardo (da Cipriani, 2007).



Le parti che si utilizzano sono i larghi e carnosi piccioli (coste o costolature) delle foglie, i quali si presentano, alla base, larghi talora 10 centimetri o più. Le foglie sono pennatosette, superiormente di colore verde-cenerino, inferiormente biancastre e molto tomentose. Le lamine (o lembi) delle foglie possono inoltre risultare più o meno frastagliate a seconda delle varietà e possono, più o meno presentare delle spine di colore chiaro (giallo-biancastro), sempre in rapporto alla varietà di appartenenza. I piccioli, in cui si notano delle solcature più o meno profonde, hanno colore grigio-verdastro. La radice principale (fittone) è molto sviluppata e profonda (si forma un rizoma corto dotato di gemme) ed anche le radici laterali, seppur non numerose, sono notevoli. L'infiorescenza è un capolino con fiori ermafroditi; il frutto è un achenio (*Fig. 1.1.4*).

Il cardo può essere coltivato in tutta la nostra penisola, comprese le posizioni di bassa collina del nord. Resiste però poco a temperature sotto lo zero e non sopravvive ai -2°C . Nelle zone con inverni rigidi è opportuno quindi raccoglierlo prima che si verifichino forti e ripetute gelate (metà novembre-metà dicembre) capaci di danneggiare notevolmente le piante o di distruggerle. La temperatura minima a cui il cardo comincia a vegetare è attorno ai 7°C , quella ottimale va dai 16 ai 18°C (Cipriani, 2007).

1.1.3 RISORSE GENETICHE

a) Pool genico coltivato

In Italia è presente il più ampio pool genetico di carciofo (Saccardo, 2009) e cardo. Non è facile determinare il numero delle cultivar e cloni propagati vegetativamente e conservati in tutto il bacino del Mediterraneo anche perché, ad ognuno di questi, possono essersi riferiti nomi diversi (es.: circa 14 per indicare il carciofo “Catanese”; Bianco, 1990). Sono stati comunque descritti 37 tipi economicamente importanti (Dellacecca *et al.*, 1976), anche se soltanto 11-12 cultivar, propagate vegetativamente e ben differenziate tra loro per determinati caratteri (epoca di raccolta, dimensioni, forma e colore del capolino, dimensione della pianta e presenza o assenza di spine), sono considerate di maggiore importanza commerciale. In base alle affinità tra i cloni (Porceddu *et al.*, 1976; Vannella *et al.*, 1981), è stato inoltre suddiviso il germoplasma noto di carciofo (*Fig. 1.1.5*) nelle seguenti tipologie principali:

1. “Spinosi”, caratterizzati da lunghe spine sulle brattee e sulle foglie;
2. “Violetti”, con capolini viola e di medie dimensioni a produzione autunnale;

3. “Romaneschi”, con capolini più o meno globosi a produzione primaverile;
4. “Catanesi” con capolini relativamente piccoli e allungati con produzioni che si prolungano dall’autunno alla primavera.

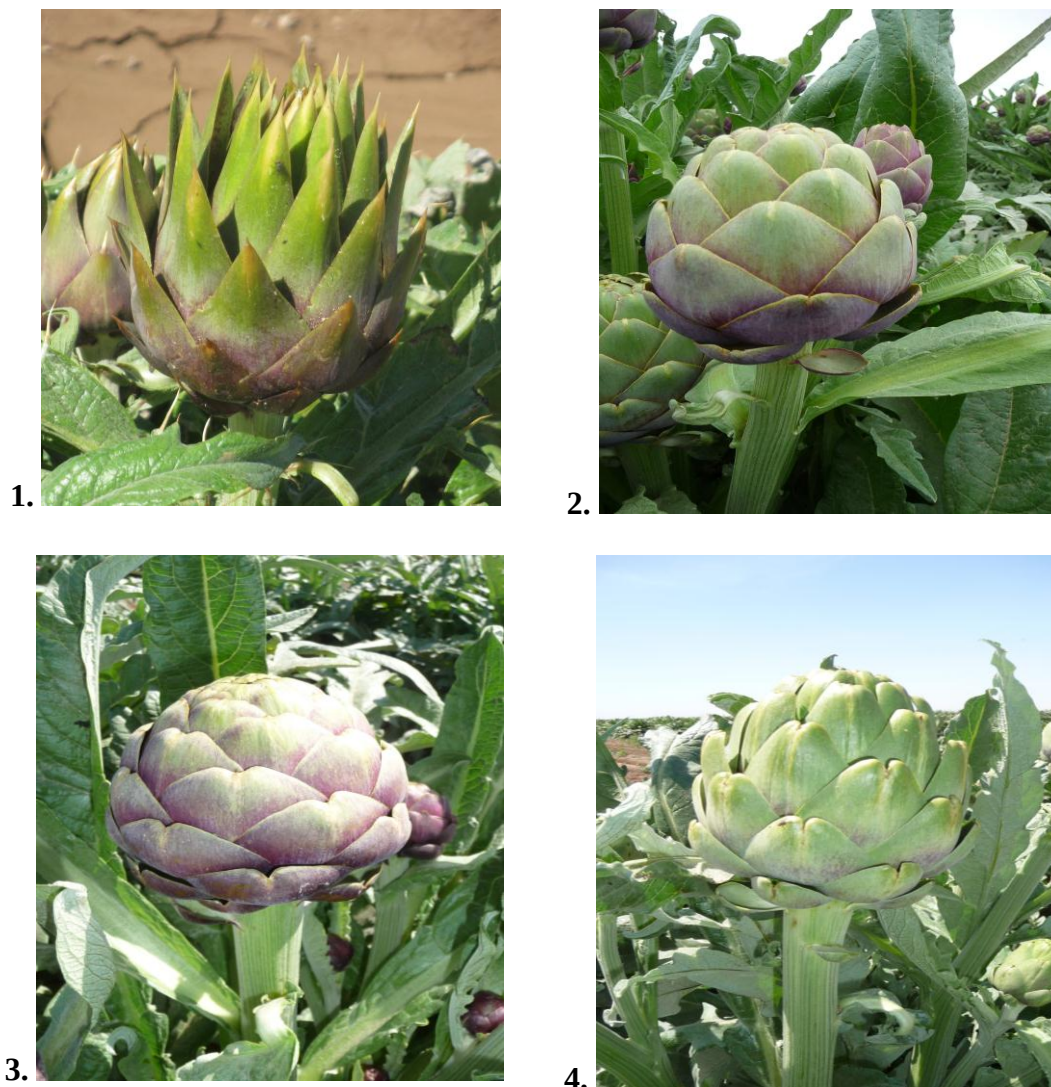


Fig. 1.1.5 – Carciofo classificato in quattro gruppi in funzione della morfologia del capolino.

Altre cultivar analizzate da Porceddu *et al.* (1976), tra cui la spagnola denominata “Tudela”, sono considerate appartenenti ad un gruppo intermedio. Vanno considerati anche a parte i cardi coltivati, completamente fertili, se incrociati con il carciofo (Dellacecca *et al.*, 1990).

La California sta diventando un grande produttore mondiale ed il suo panorama varietale è dominato da tipologie a capolino verde; si stanno molto diffondendo le varietà Green Globe, Imperial Star, Big Heart, Desert Globe; tutte a produzione primaverile (Saccardo, 2009).

Anche per il cardo, il nome delle varietà, è riferito soprattutto ai luoghi di diffusione, ad esempio cardo di Asti, di Romagna, di Chieri, di Nizza, ecc. Un'altra distinzione si basa sulla presenza di spine sulle foglie (cardi spinosi) o sulla loro assenza (cardi inermi). Questo ortaggio figura solo in alcuni cataloghi di ditte produttrici di sementi orticole e il numero di varietà, che può interessare la maggior parte dei piccoli orticoltori è piuttosto limitato. Le varietà che si possono reperire abbastanza facilmente sono le seguenti:

Bianco avorio (varietà simili: Bianco avorio inermi, cardo di Asti). Pianta con foglie che hanno lamine suddivise (frastagliate), costolature medio larghe e carnose. Di regola è senza spine. Ne esistono alcune selezioni che generano le varietà (Fig. 1.1.6).



Fig. 1.1.6 – Particolari della pianta e delle costole del Bianco avorio.



Fig. 1.1.7 – Costolatura del Gigante di Romagna.

Gigante inermi (varietà simili: Gobbo di Nizza, Spadone). Presenta foglie con lamina poco suddivisa, coste larghe, molto carnose. È privo di spine. Ne esistono alcune selezioni (Fig. 1.1.8).

Fig. 1.1.8 – Costolatura del Gigante inermi.



Altre varietà coltivate in Italia sono il Cardo di Bologna, privo di spine, con costole piene di media grossezza; il Cardo di Chieri, molto diffuso in Piemonte, di buona qualità, poco spinoso e facilmente conservabile; il Cardo di Tours, pregiato ma poco diffuso perché spinoso.

Per quanto riguarda la scelta delle varietà è consigliabile indirizzarsi verso quelle coltivate localmente, in particolare nelle zone dove con questo ortaggio si preparano piatti caratteristici e non solo per un migliore adattamento all'ambiente di coltivazione.

b) Pool genico selvatico

Il genere *Cynara* è relativamente piccolo e comprende, oltre al carciofo, 6-7 specie selvatiche perenni, tutte originarie del bacino del Medieterraneo, come illustrato nella figura 1.1.1 (Wiklund, 1992; Saccardo, 2009). Quella più vicina al carciofo è il cardo selvatico (*C. cardunculus* L. var. *sylvestris*), distribuito dal Portogallo alla Turchia. Si tratta di una pianta robusta e ramificata, con tipica rosetta di foglie grandi e spinose e fiori di colore blu-violetto. Altre 5 specie selvatiche hanno mostrato affinità genetiche con il carciofo e 3 ($2n=2x=34$ cromosomi), in particolare, hanno prodotto pochi semi quando sono state incrociate con il carciofo maschiosterile (Rottenberg, 1993). Si tratta di *C. baetica*, diffusa al sud della Spagna e al nord del Marocco, di *C. algarbiensis*, endemica al sud del Portogallo e Spagna, e di *C. syriaca*, originaria del vicino Oriente. Altre due specie, *C. cornigera* e *C. cyrenaica* mostrano affinità genetiche con il carciofo ma i loro ibridi F_1 sono risultati parzialmente fertili (Bazniski e Zohary, 1994).

c) Controllo genetico di caratteri economicamente importanti

La maggior parte dei caratteri morfologici, legati alla produzione e descritti da Dellacecca *et al.* (1976), presentano un determinismo poligenico. Si tratta in particolare della (a) dimensione, forma e peso del capolino, (b) della dimensione della pianta, della lunghezza del peduncolo (c) della precocità.

Sono invece controllati da geni singoli o da due geni “*major*” i seguenti caratteri:

- assenza/presenza di spine; l'allele “non spinoso” (*Sp*) è dominante su quello selvatico spinoso (*sp*);
- marcatori della foglia e del fiore; i caratteri “foglia gialla” (*j*) e “fiore bianco” (*b*) sono entrambe mutazioni recessive, la prima delle quali è presente nei tipi “romaneschi” (Foury *et al.*, 1977; Foury e Aubert, 1977).

Riguardo alla pigmentazione del capolino, la base genetica per la colorazione antocianica, influenzata anche dalla temperatura, è complessa in quanto coinvolgerebbe una serie di geni modificatori in aggiunta a 1 o 2 geni *major* (Bazniski e Zohary, 1994).

Poco studiato è invece il carattere della maschiosterilità. Inizialmente riportato sotto il controllo di un gene recessivo, *ms₁* (Principe, 1984), il determinismo di tale carattere è stato successivamente attribuito all'azione di due geni recessivi, *ms₂* e *ms₃* (Basnizki e Zohary, 1994).

d) Conseguenze dell'inbreeding

Le autofecondazioni ripetute nel carciofo determinano fenomeni di depressione da inbreeding con conseguenze negative sul vigore della pianta, sulla superficie fogliare, sull'altezza dello stelo, sul numero e dimensione dei capolini commerciali, sulla qualità e quantità del polline, sul numero dei semi vitali (Foury, 1979; Pécaut *et al.*, 1981). Talvolta la depressione da inbreeding compare già alla seconda autofecondazione mentre, in altri casi, gli effetti possono essere tanto severi dalla III-IV autofecondazione da dover rinunciare alla produzione di linee inbred (Pécaut, 1993).

e) Eterosi

Effettuare incroci tra cloni di carciofo determina elevata eterosi, espressa per lo più in un aumento della biomassa e della produzione (Pécaut *et al.*, 1992; Stamigna C. *et al.*, 2004). La maggiore vigoria riscontrata in questo tipo di ibridi la ritroviamo anche nelle ibridazioni tra carciofo, cardo e *C. syriaca*.

f) Maschiosterilità

L'incapacità di un individuo a produrre gameti o zigoti vitali, è nota come sterilità che, in alcuni casi può essere totale, parziale o interessare l'uno o l'altro sesso. La sterilità viene causata da fattori ambientali, da specifici alleli (sterilità genica), da fattori genetici extra-nucleari (sterilità citoplasmatica), da incompatibilità tra embrione ed endosperma, da una condizione ibrida dello zigote (sterilità ibrida), da poliploidia e da aneuploidia.

Quando la sterilità è dovuta all'impossibilità di una pianta a produrre antere, polline o gameti maschili funzionanti, è detta maschiosterilità. Questo tipo d'infertilità si differenzia dall'incompatibilità per la presenza di microspore non funzionali o la mancata formazione di quelle funzionali e si esprime per azione di geni mutati nucleari, plastidiali e mitocondriali (citoplasmatici) e dei loro effetti combinati. L'aspetto comune ai due meccanismi riproduttivi (incompatibilità e maschiosterilità) consiste nella

limitazione o nella riduzione delle autofecondazioni, che genererebbe problemi di inbreeding.

Dei due tipi di sterilità, quella maschile prevale su quella femminile in quanto i microsporofiti ed i microgametofiti sono più vulnerabili all'azione di forze intrinseche (es.: situazioni di aneuploidia) ed estrinseche (es.: fattori ambientali), rispetto ai sacchi embrionali e/o gli ovuli che sono invece più protetti. Inoltre, a causa della facile reperibilità di una grande quantità di polline nelle antere e della semplice determinazione della sua fertilità, attraverso colorazione con carminio acetico, l'individuazione della maschiosterilità è più facile di quella della sterilità femminile. Quest'ultima richiede, per essere confermata, incroci e studi di sviluppo durante l'antesi e la formazione del seme, in modo da selezionare eventuali individui apomittici e i tipi che presentano aberrazioni nello sviluppo del seme.

– Origini e Reperimento della maschiosterilità. Nelle specie vegetali, la maschiosterilità compare dopo mutazioni spontanee ed incroci, oppure in seguito a trattamenti mutageni. La maschiosterilità genetica appare soprattutto in seguito a mutazioni spontanee o dopo trattamenti mutageni, interessando per lo più specie dicotiledonari. Dato che la maschiosterilità genetica è solitamente controllata da geni recessivi, gli individui maschiosterili si trovano frequentemente nelle piante autogame o dopo cicli di autofecondazione nelle specie allogame. Nelle piante allogame invece possono essere individuati casi di maschiosterilità se si procede ad ibridazioni e suddivisioni delle popolazioni in gruppi più piccoli.

La maggior parte delle piante che presentano maschiosterilità genetico-citoplasmatica, al contrario, si è originata in seguito ad ibridazioni intergeneriche ed interspecifiche. Infatti è necessaria una combinazione specifica fra geni nucleari “*fr*” e citoplasmatici “*c*” per l'espressione di questo tipo di sterilità. Questo tipo di maschiosterilità è quindi più frequente nelle specie allogame. Il basso numero di piante maschiosterili, che si originano da mutazioni spontanee o indotte, è dovuto alla bassa probabilità di mutazioni simultanee dei geni da “*Fr*” a “*fr*” e dei geni citoplasmatici da “*C*” a “*c*” in un genotipo fertile.

Il reperimento della maschiosterilità avviene in seguito a mutazioni spontanee o indotte ed incroci intergenerici, intra e interspecifici. Nel caso in cui la maschiosterilità non sia reperibile o non presenti le caratteristiche richieste (stabilità ambientale, assenza di *linkage* con geni indesiderati, controllo citoplasmatico), questa può essere indotta facendo ricorso alla mutagenesi con agenti chimici e fisici, da soli o in combinazione. Si

sono così ottenute nuova maschiosterilità in diverse specie tra cui il peperone (Daskaloff, 1974). Nelle specie allogame, il controllo monogenico-recessivo di questi mutanti ne ha limitato fortemente la possibilità d'utilizzo. È inoltre possibile trasferire i geni della maschiosterilità tra specie incompatibili mediante creazione di ibridi somatici. Un enorme passo avanti è stato fatto con la messa a punto di biotecnologie in grado di trasferire nei loro genomi singoli geni esogeni, anche di maschiosterilità.

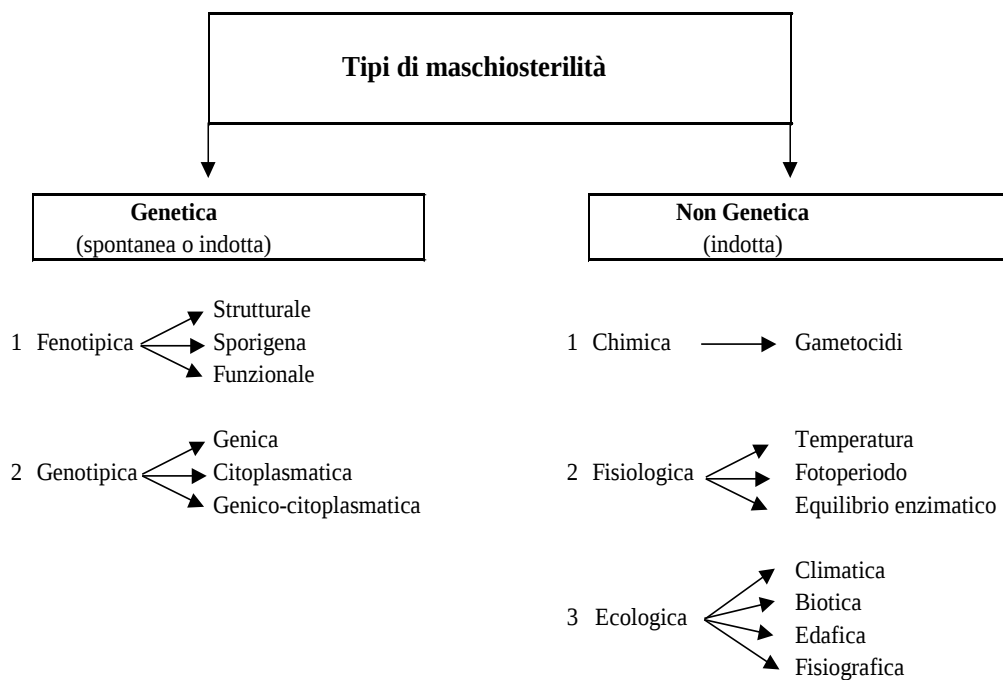
– Classificazione. Gli eventi che possono portare alla maschiosterilità sono molteplici e, a riguardo, sono state proposte diverse suddivisioni:

- I. Gabelman (1956) ha distinto tre tipi di maschiosterilità, dovuta ad:
 - assenza di polline vitale;
 - malformazione degli stami (maschiosterilità staminale);
 - mancato rilascio di polline vitale (maschiosterilità funzionale);
- II. Lacadena (1968) si è basato sui risultati di incroci intra e interspecifici e intergenerici, identificando i seguenti tipi di sterilità:
 - autoplasmica, che include piante maschiosterili ottenute da mutazioni in una popolazione geneticamente distinta;
 - omoplasmica, comprendente piante maschiosterili originate da incroci intraspecifici;
 - alloplastica, dove la maschiosterilità è comparsa a seguito di incroci interspecifici ed intergenerici;
- III. Heslop-Harrison (1971), distinguendo una maschiosterilità gametofitica da una sporofitica, ha individuato tre momenti diversi in cui si manifestano anomalie:
 - durante la pre-meiosi (controllo sporofitico), con la soppressione delle antere;
 - nel corso della meiosi o della microgametogenesi, con anomalie nei processi sia a livello sporofitico che gametofitico;
 - all'antesi, con mancato rilascio del polline per indeiscenza delle antere;
- IV. Gottshalk (1976) ha incluso nella maschiosterilità funzionale tutti quei mutanti in cui gli stami non sono formati oppure, pur formandosi il polline, la fecondazione è impedita dalla indeiscenza delle antere o da una separazione spaziale tra antere e stigma. Al contrario, non rientrano nella maschiosterilità funzionale quei casi in cui l'azione dei geni della maschiosterilità interessa la microsporogenesi o la microgametogenesi;

- V. Johns (1981) ha introdotto il termine di sterilità strutturale per indicare quelle piante in cui la sterilità è causata da anomalie nei fiori, comprendendo nella classificazione proposta, sia la sterilità maschile che femminile;
- VI. Kaul (1988), dal momento che nessuna delle classificazioni viste sopra è fondata contemporaneamente su basi fenotipiche e genotipiche, ha proposto invece un modello di classificazione che considera sia il fenotipo che il genotipo delle piante maschiosterili (*Fig. 1.1.9*).

Questa classificazione considera oltre la sterilità maschile di origine genetica, controllata da geni nucleari da soli o in combinazione con geni citoplasmatici, anche quella non genetica, causata da stress fisiologici, da agenti chimici e fisici, e da fattori ambientali (*Fig. 1.1.9*).

Fig. 1.1.9 – Classificazione generale della maschiosterilità (Kaul, 1988).



i. Maschiosterilità Genetica

Le anomalie fenotipiche nello sviluppo delle antere e nella loro funzionalità, portano alla maschiosterilità. Sulla base di tali alterazioni fenotipiche predominanti nelle piante maschiosterili, si distinguono tre tipi di maschiosterilità:

- strutturale, quando il gene della maschiosterilità interessa la differenziazione e lo sviluppo dei primordi staminali (staminoidi rudimentali);

- sporigena, quando il gene della maschiosterilità agisce bloccando la microsporogenesi o la microgametogenesi (l'aborto delle cellule microsporigene può avvenire prima, durante o dopo la meiosi);
- funzionale, se la microsporogenesi avviene normalmente con la formazione di polline vitale ma la fecondazione è impedita dalla mancata deiscenza delle antere, o dall'incapacità del polline di staccarsi dalla parete della teca.

Le classi genotipiche sono classificate in:

- genetica, determinata dalla presenza di uno o più geni nucleari, recessivi “*ms*” e/o dominanti “*Ms*”, la cui azione non è influenzata dal citoplasma (Fig.1.1.10);

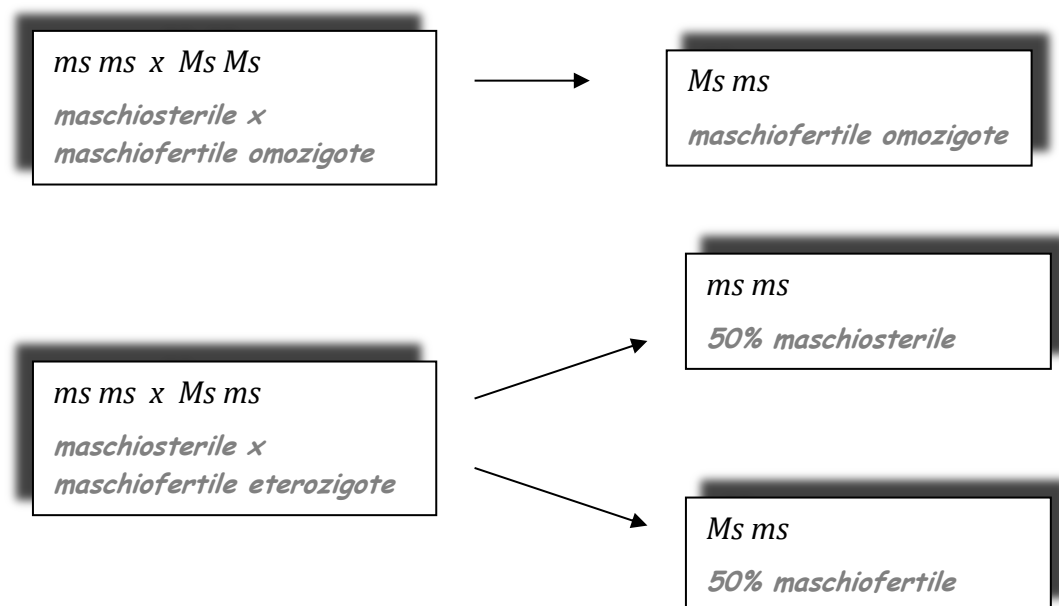


Fig. 1.1.10 – Maschiosterilità genetica (allele *Ms* dominante sull'allele *ms*).

- citoplasmatica, al contrario, è determinata dall'azione di geni citoplasmatici “*c*”, localizzati nella maggior parte dei casi nel genoma mitocondriale, in plasmidi circolari o lineari, alcuni dei quali si comportano come episomi;
- genetico-citoplasmatica, è il risultato dell'azione cooperativa di certi geni nucleari, denominati ristoratori (“*fr*”, “*Fr*”), e di un tipo specifico di citoplasma, detto “*S*”.

ii. Maschiosterilità non genetica

Chimica. - Diverse sostanze chimiche sono state saggiate su numerose specie vegetali per verificare l'attività gametocida. I risultati dell'applicazione di questi prodotti sono stati alquanto deludenti, non perché l'efficacia maschiosterilizzante sia stata poco soddisfacente, ma per i numerosi effetti collaterali negativi indotti sulle

piante trattate (es.: riduzione della fertilità femminile, sintomi di fitotossicità ed anomalie nella crescita).

Fisiologica ed ecologica. - La maschiosterilità può manifestarsi in una popolazione in seguito a stress biotici ed abiotici. Condizioni ambientali particolari possono indurre nella specie squilibri fisiologici tali da determinare la comparsa di piante maschiosterili.

– Utilizzo della maschiosterilità. La maggior parte degli studi effettuati sulle specie coltivate, comprese quelle che normalmente si riproducono per autofecondazione, hanno l'intento di ottenere varietà ibride che generano un incremento produttivo grazie al vigore dell'ibrido (eterosi).

La tecnica adottata per produrre seme ibrido F_1 differisce da specie a specie, ma normalmente si cerca di ricorrere ad interventi manuali che, tranne qualche eccezione (es.: il pomodoro, il peperone, la melanzana, il melone, etc.), risultano quasi sempre antieconomici. L'utilizzo di linee maschiosterili per la produzione di seme ibrido ha come vantaggio, una minore manodopera, una più facile impollinazione ed una maggiore produzione di seme. La maschiosterilità è stata utilizzata per la produzione di seme commerciale ibrido F_1 , soprattutto in quelle specie che presentano fiori piccoli difficili da emasculare, pochi semi per fiore e un prezzo del seme che non copre il costo della demasculazione manuale (es.: specie allogame come la cipolla, il finocchio e la carota).

Tra i diversi tipi di maschiosterilità, quella citoplasmatica e genetico-citoplasmatica si sono dimostrate preferibili nella produzione sementiera di specie allogame.

Al contrario la maschiosterilità genetica viene utilizzata prevalentemente in specie autogame, presentando delle difficoltà nella conservazione delle linee maschiosterili per l'impossibilità di ottenere progenie totalmente sterile.

1.1.4 SITUAZIONE DELLA COLTURA NEL MONDO

Il carciofo è una specie ortiva tipicamente mediterranea per cui il 73% circa dell'intera produzione mondiale (1.549.159 t) è sostanzialmente concentrata nei paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo: soprattutto Italia, Spagna, Francia, Grecia, mentre circa del 25% interessa Egitto, Tunisia, Algeria, Marocco, Turchia, Israele, Libano e Siria (*Fig. 1.1.11*).

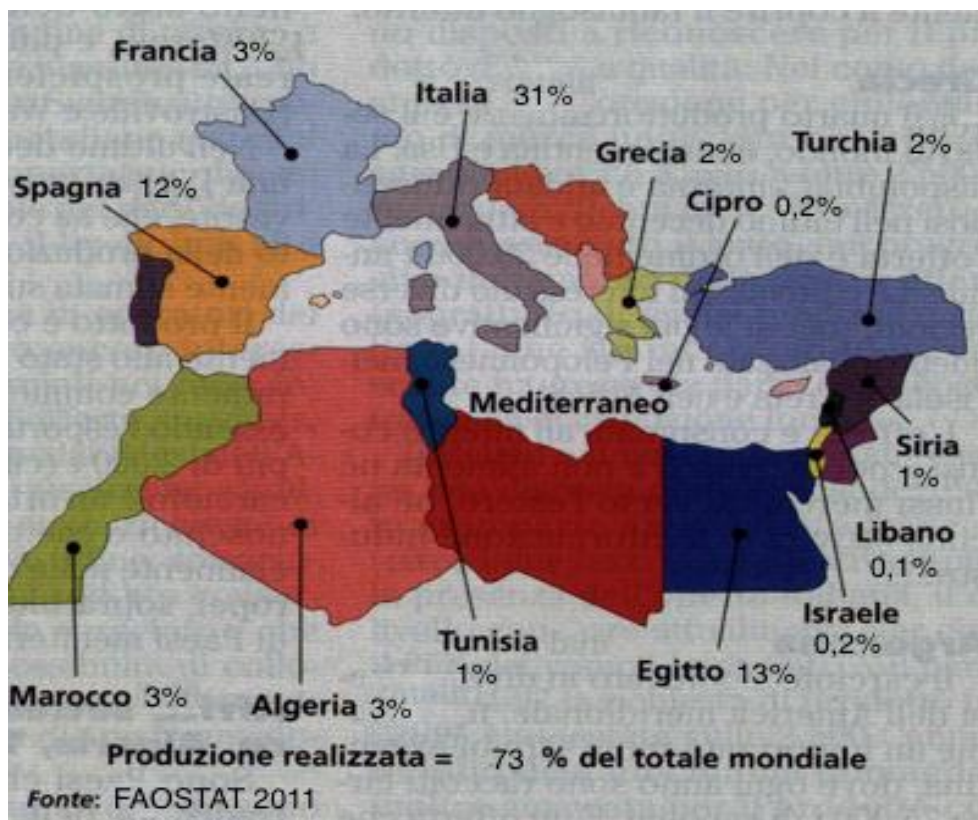


Fig. 1.1.11 – Paesi produttori di carciofi nel bacino del Mediterraneo (Produzioni FAOSTAT 2011).

A livello mondiale altri paesi si stanno dimostrando grandi produttori di carciofo quali Perù, Argentina, Cina, Cile e California.

L'Italia rispetto agli altri stati produttori di carciofo occupa una posizione preminente (Fig. 1.1.12), con una superficie investita a carciofo di 49.577 ettari pari al 39% del totale.

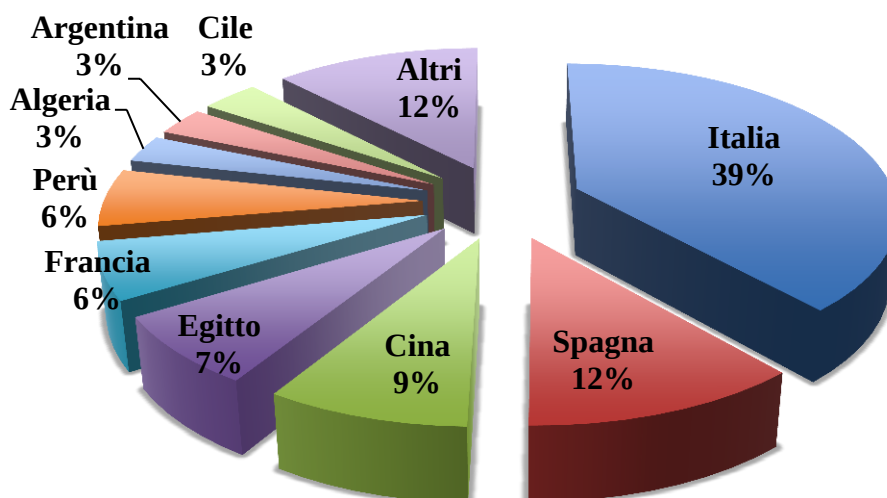


Fig. 1.1.12 – Superfici mondiali investite a carciofo (FAOSTAT 2011).

Tra i paesi produttori del mediterraneo, come superfici coltivate, segue quindi la Spagna (12%), l'Egitto (7%), la Francia (6%) e gli Stati dell'Africa e dell'Asia mediterranea (dati FAOSTAT 2011).

La Spagna, ormai terzo produttore mondiale subito dopo l'Egitto, attualmente dispone di un'offerta dell'ordine di 182.120 tonnellate annue. Le coltivazioni di carciofo sono localizzate soprattutto nelle regioni prospicienti il Mediterraneo e in particolare nella regione della Murcia con 6.500 ha, seguita dalla Comunità Valenciana con 6.860 ha, dall'Andalusia con 2.484 ha e dalla Catalogna (Macua *et al.* 2009). La produzione spagnola, oltre a soddisfare un consistente consumo interno, sia come prodotto fresco che conservato, alimenta anche un importante flusso commerciale verso l'estero. I principali Paesi importatori risultano la Francia, la Germania e l'Italia che importa carciofo nei mesi più freddi. Infatti è proprio in inverno che si dispone della maggior quantità di produzione, grazie soprattutto al particolare clima mite presente nelle coste orientali spagnole (Macua *et al.* 2009).

Dalla *figura 1.1.13* si evince il trend di produzione dei maggiori paesi dal 2002 al 2011; l'Italia ha mantenuto abbastanza costanti i quantitativi prodotti, al contrario della Spagna che dal 2005 ha avuto una notevole riduzione. Tra i paesi del Mediterraneo, l'Egitto ha incrementato dal 2005 la produzione di carciofo fino a diventare il quarto produttore mondiale; come anche il Perù che è al sesto posto.

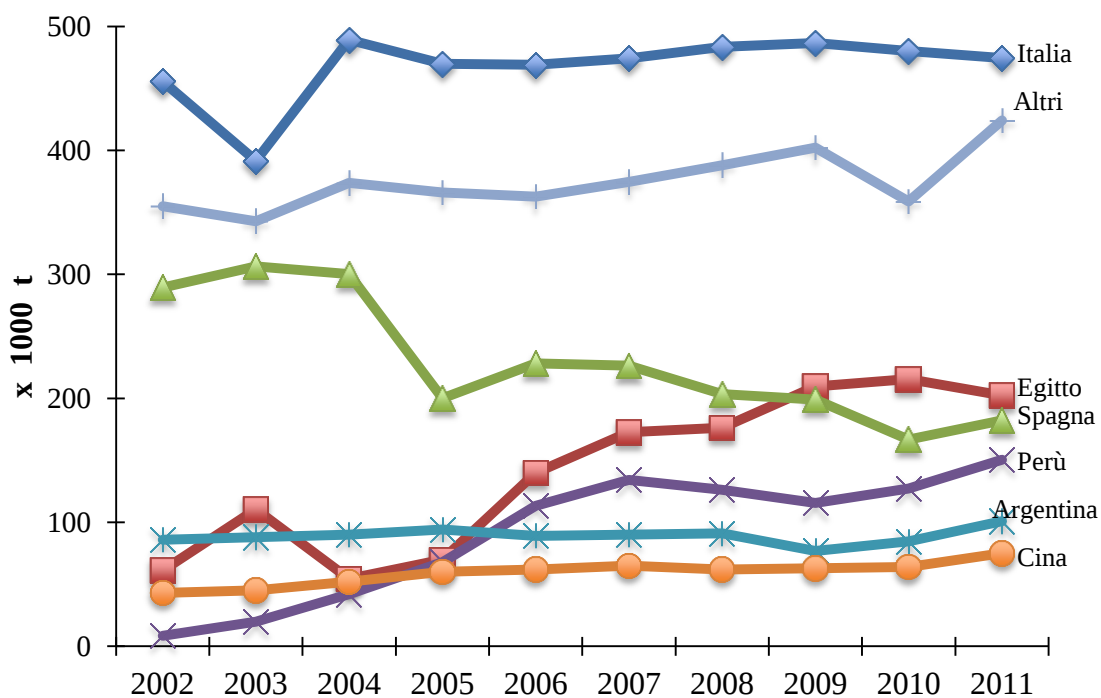


Fig. 1.1.13 – Andamento delle produzioni di carciofo dei maggiori paesi mondiali (FAOSTAT 2011).

La Francia rappresenta il terzo Paese produttore europeo, con raccolti dell'ordine di 50.589 tonnellate annue. Le migliori coltivazioni (circa l'82%) sono dislocate in Bretagna anche se dal 1068, quando la produzione era di 93.147 t, si è passati a circa 40.000 t nel 2008. In questa zona che va dalla costa di Brest a Saint Malo e circa 10 km nell'interno, la produzione è concentrata nel periodo da maggio a ottobre, con punte a giugno-luglio. Nel Dipartimento del Languedoc-Roussillon, nel Sud-Est e Sud-Ovest della Francia, si ottengono produzioni (circa il 14%) più precoci da aprile a giugno (Bazinet *et al.*, 2009). L'offerta interna non consente di soddisfare il fabbisogno del Paese, per cui la Francia è costretta a ricorrere a cospicue importazioni (circa 12.793 tonnellate annue), provenienti soprattutto dalla Spagna e, in minor misura, dall'Italia e dall'Egitto (FAOSTAT 2011). Sia in Spagna che in Francia, una parte del prodotto (circa il 80%) è destinato all'utilizzazione industriale. La Grecia è il quinto produttore dell'Unione Europea ed il decimo al mondo, dopo Egitto, Perù, Argentina, Cina, Cile, Algeria e Stati Uniti. La disponibilità interna si è andata riducendo nell'ultimo decennio e attualmente è dell'ordine delle 38.000 tonnellate annue (FAOSTAT 2011). Le coltivazioni interessano diverse regioni, fra cui le più significative sono localizzate nel Peloponneso, nell'isola di Creta e nell'Attica (Pirazzoli, 1999).

L'Egitto dall'inizio degli anni 2000 ha avuto un notevole incremento nella produzione di carciofo fino a diventare il secondo produttore mondiale negli ultimi anni superando anche la Spagna con 202.458 t, ma rimanendo al quarto posto dopo anche la Cina come superficie investita con 9.476 ha (FAOSTAT 2011). Il carciofo in Egitto trova le condizioni climatiche per ottenere delle produzioni notevoli e di ottima qualità in ambienti che si trovano intorno alle città costiere quali Al-Beharia, Al-Sharquia, Ismailia e in aree limitate interne come Al-Giza e Al-Minya (Eldin M.S., 2009).

In Europa, la richiesta di carciofo è sostenuta soprattutto da Francia, Italia, Germania, Svizzera, Regno Unito e, più recentemente, da paesi del Nord-Europa quali Svezia e Danimarca. La domanda francese dà preferenza a capolini di buona pezzatura, con brattee serrate e carnose. Le forniture provengono essenzialmente dalla Spagna (ottobre-febbraio) e Italia (in primavera) (Pirazzoli, 1999).

1.1.5 SITUAZIONE DELLA COLTURA IN ITALIA

Dopo il pomodoro, la fava-fagiolini e la patata, il carciofo rappresenta in Italia la quarta coltura orticola per superficie investita con 33.296 ettari secondo i dati ISTAT 2013 (*Fig. 1.1.13*). Il nostro Paese, seguito da Spagna e Francia come paesi produttori europei e dall'Egitto ormai secondo produttore mondiale, è il protagonista della scena

internazionale con 474.550 t (dati FAOSTAT 2011), pari al 31% della produzione mondiale che è stimata intorno a 1.549.159 t/anno. Nel 2012, il P.L.V. si attestava già intorno ai 424.018 mila euro con una produzione di circa 478.100 tonnellate per il carciofo e 8.722 mila euro con una produzione di circa 9.400 tonnellate per il cardo (fonte ISMEA 2012). Nella *figura 1.1.14* sono riportati i P.L.V. delle singole Regioni italiane sia per il cardo che per il carciofo, da cui si evince che la Sicilia e la Puglia che sono le più grandi produttrici di carciofo non lo sono invece di cardo. Al contrario la Sardegna, grande produttrice di carciofo, lo è anche di cardo. Piemonte, Emilia-Romagna, Toscana e Sardegna sono i più grandi produttori di cardo (fonte ISMEA 2012).

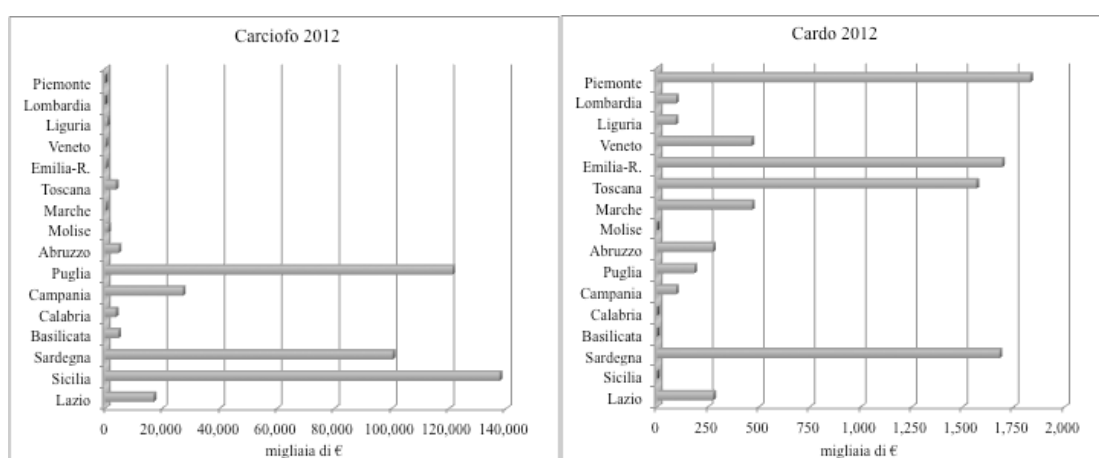


Fig. 1.1.14 – P.L.V. delle regionali per il cardo e carciofo (ISMEA 2012).

Si tratta di una specie ancora poco conosciuta nei paesi non produttori e ciò spiega, in parte, perché è poco esportata all'estero; ciò nonostante, l'Italia risulta la quarta nazione esportatrice dopo la Spagna, la Francia e l'Egitto. Allo stesso tempo è il secondo paese importatore dopo la Francia, seguito dai paesi del nord Europa e dal Canada (FAOSTAT 2011).

In Italia, la coltivazione è principalmente concentrata nelle isole, al Centro-Sud e nelle regioni costiere della penisola. La distribuzione regionale (*Fig. 1.1.15*) vede la Sicilia al primo posto con 14.540 ettari e 1.527.960 t di produzione, seguita dalla Puglia (14.980 ha e 1.385.850 t) e dalla Sardegna (13.630 ha e 1.198.300 t). Altre regioni come Lazio (936 ha e 182.100 t), Campania (958 ha e 132.189 t), Abruzzo (412 ha e 53.130 t) rappresentano circa il 4 ed il 3% rispettivamente della superficie investita e della produzione totale in Italia.

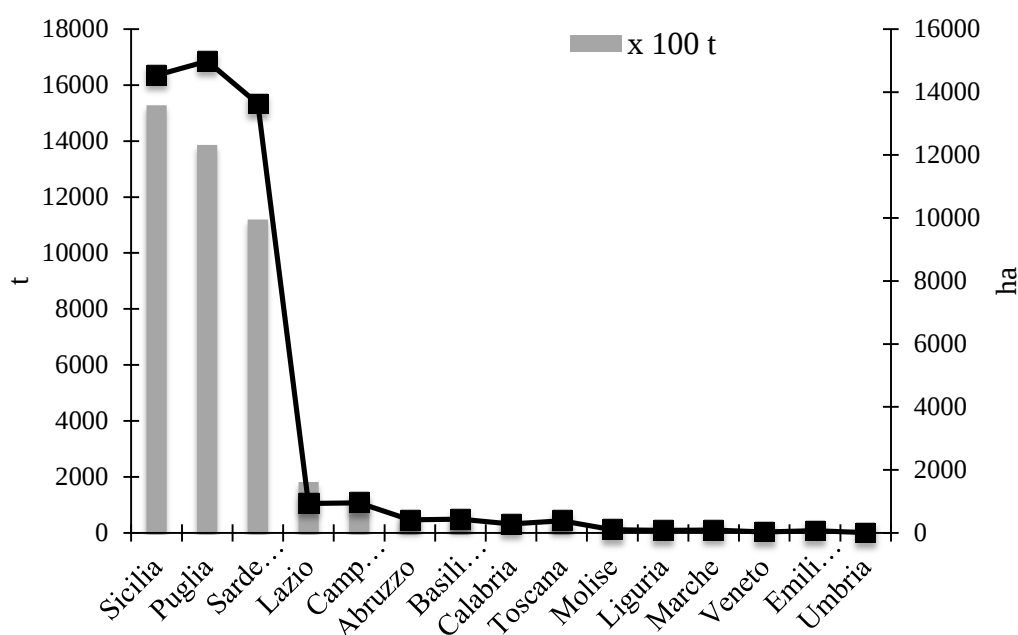


Fig. 1.1.15 – Coltivazione del carciofo nelle regioni italiane (dati ISTAT, 2013).

La Puglia spicca in Italia per avere le maggiori superfici investite (circa 14.980 ettari di cui il 45% ed il 43% rispettivamente nel foggiano e nel brindisino, dove le condizioni climatiche ottimali e i terreni idonei ne favoriscono la coltivazione), anche se dall'inizio del 2000 sta avendo sempre una piccola contrazione, passando dal 34 al 32% della superficie totale registrata. Se la Puglia primeggia come superficie investita, la Sicilia domina come produzione ottenuta e, con un 33%, è la prima regione produttrice italiana (circa 1.527.960 t), seguita dal 30% della Puglia e dal 25% della Sardegna. La coltivazione in Sicilia è concentrata per un 42% nella provincia di Caltanissetta e per un 29% ad Agrigento, per un totale di 14.540 ettari (dati ISTAT 2013). Nel Lazio le superfici investite si sono mantenute abbastanza costanti dall'inizio del 2000 (circa 1100 ha), fino ad avere una piccola contrazione negli ultimi anni ed arrivare ai 936 ha del 2013 pari al 2% della superficie totale (dati ISTAT).

Il totale della superficie investita in Italia a carciofo si è mantenuta abbastanza costante dall'inizio del 2000, ma è andato tuttavia diminuendo negli ultimi due anni (Fig. 1.1.16), passando da 50.000 ettari a 33.296 nel 2013 (dati ISTAT). Ciò è dovuto principalmente al periodo di crisi che l'Italia ed il settore agricolo stanno affrontando, che si ripercuote sull'abbandono delle colture vocate che non sono altamente remunerative.

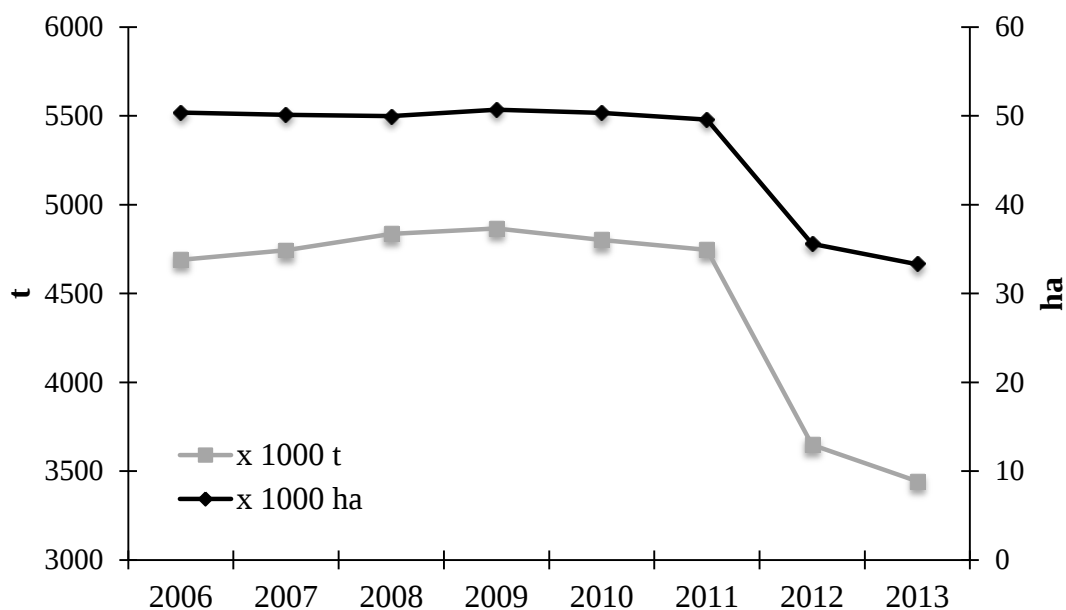


Fig. 1.1.16 – Andamento negli anni della superficie investita a carciofo e della relativa produzione in Italia (dati ISTAT).

L'adozione di tecniche colturali appropriate (Magnifico, 2000), soprattutto riferite all'irrigazione e alla concimazione, ha permesso di migliorare le rese produttive per unità di superficie (da 8 a 12 t ha⁻¹), mantenendo inalterato il livello complessivo di quanto raccolto a fronte degli investimenti complessivi maggiori, dovuto anche a piante di taglia inferiore. Tuttavia, pur costituendo un piccolo settore nell'orticoltura europea e mondiale, il mercato del carciofo trova un preciso punto di riferimento nella specificità e competenza italiana.

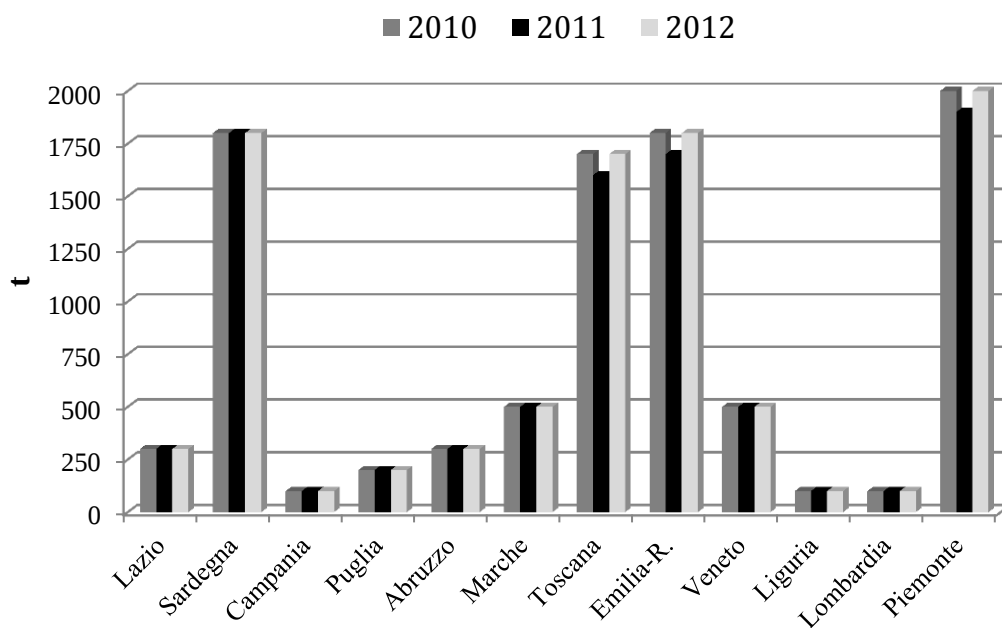


Fig. 1.1.17 – Produzione del cardo nelle regioni italiane (dati INEA).

La maggior parte della produzione allo stato fresco è destinata al consumo interno, che assorbe una quota oscillante intorno all'85% della produzione vendibile; il consumo italiano *pro-capite* è attualmente di circa 8 kg anno⁻¹. Il 10% della produzione è destinata all'industria di trasformazione mentre ai carciofini sott'olio sono destinate le code di produzione. L'esportazione del prodotto è diretta soprattutto alla Francia (80%), alla Germania (8%) e ai Paesi Bassi (2%).

Come precedentemente constatato per quanto riguarda i P.L.V. regionali e nazionali di cardo e carciofo, sono state individuate anche le regioni più produttive di cardo ed al primo posto abbiamo il Piemonte con una produzione pari a 2.000 t, poi la Sardegna e l'Emilia-Romagna con 1.800 t e la Toscana con 1.700 t (fonte INEA 2012) (*Fig. 1.1.17*).

a) Situazione della coltura nel Lazio

Il carciofo, per la regione Lazio, è sempre stata una coltura orticola importante e tradizionale sebbene, negli ultimi decenni, la superficie coltivata si sia notevolmente contratta.

Tra le ortive di pieno campo, infatti, si colloca al nono posto (936 ha), dopo il pomodoro (3.280 ha), carota (2.160 ha), cavoli e broccoli (2.100 ha), zucchino (1.370 ha), lattuga (1.300 ha), patata (1.200 ha), cocomero (980 ha), cavolfiore (975 ha). Il P.L.V. laziale di carciofo è di 17.027 mila €, pari al 4% del totale italiano, mentre quello del cardo è di 276 mila € cioè il 3,2% di quello italiano (fonte INEA 2012).

Le province interessate da questa coltura (*Fig. 1.1.19*) sono state, nel 2013, Roma (500 ha), Latina (296 ha) e Viterbo (140 ha) (dati ISTAT, 2013).

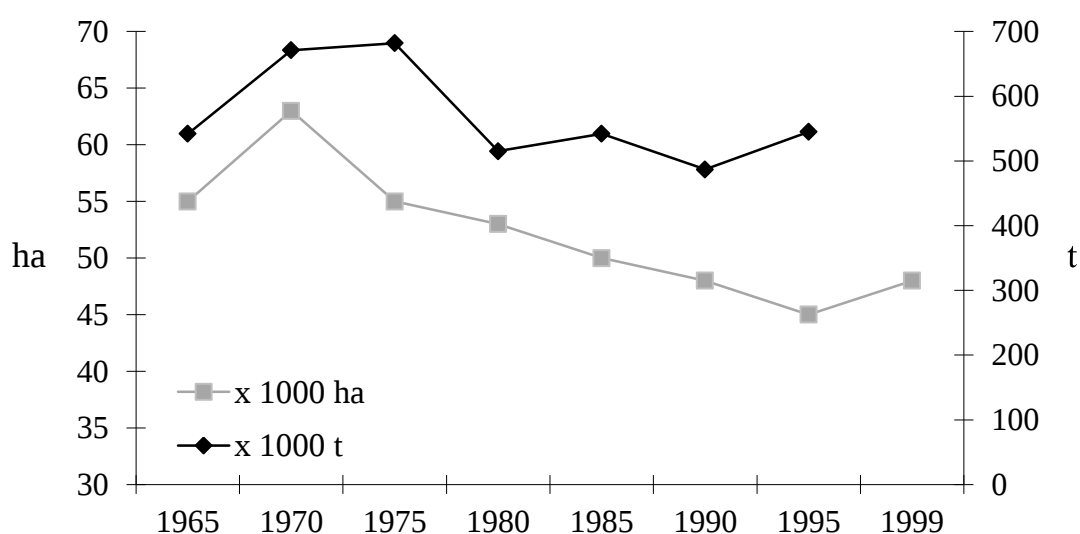


Fig. 1.1.18 – Storico dell'andamento delle superfici investite e delle relative produzioni di carciofo nel Lazio (dati ISTAT).

L'andamento delle superfici è stato crescente nel periodo 1950-1960, in cui si è registrato il picco massimo di coltivazione con 8.440 ha. Dal 1960 al 1975 si è verificata una leggera costante diminuzione. Tra il 1975 ed il 1980 si è assistito ad un vero crollo di questa coltura, che è passata dai 6.480 ha ai 2.880 ha. Negli ultimi vent'anni è continuata la tendenza negativa (*Fig. 1.1.18*).

Come si può rilevare, sempre dalla *Figura 1.1.19*, le province di Roma e Latina sono quelle che hanno fatto registrare una flessione più consistente delle superfici investite a carciofi. La provincia di Viterbo, invece, ha presentato riduzioni meno drastiche.

Le cause che hanno determinato questa notevole contrazione della superficie nel Lazio, sono da imputare agli elevati costi di produzione ed alla minore resa unitaria rispetto al carciofo a produzione autunnale oltre alle condizioni climatiche e pedologiche diventate meno favorevoli per la coltura (Temperini *et al.*, 2001).

Al contrario invece, dal 2000 ad oggi, la produzione e la superficie investita a carciofo è rimasta abbastanza costante e soltanto negli ultimi due anni si è avuta una piccola flessione dovuta probabilmente all'effetto che la crisi finanziaria generale svolge in ogni settore, tra cui anche quello agricolo.

Nella *figura 1.1.19* è visibile l'andamento delle superfici e produzioni dal 2006 ad oggi, da cui è possibile evincere questa fase di stabilità con un leggero decremento nel 2012 e 2013. Roma è, tra le province costiere, quella che primeggia sulle altre con circa il 63% della produzione raccolta regionale, pari a 115.000 t.

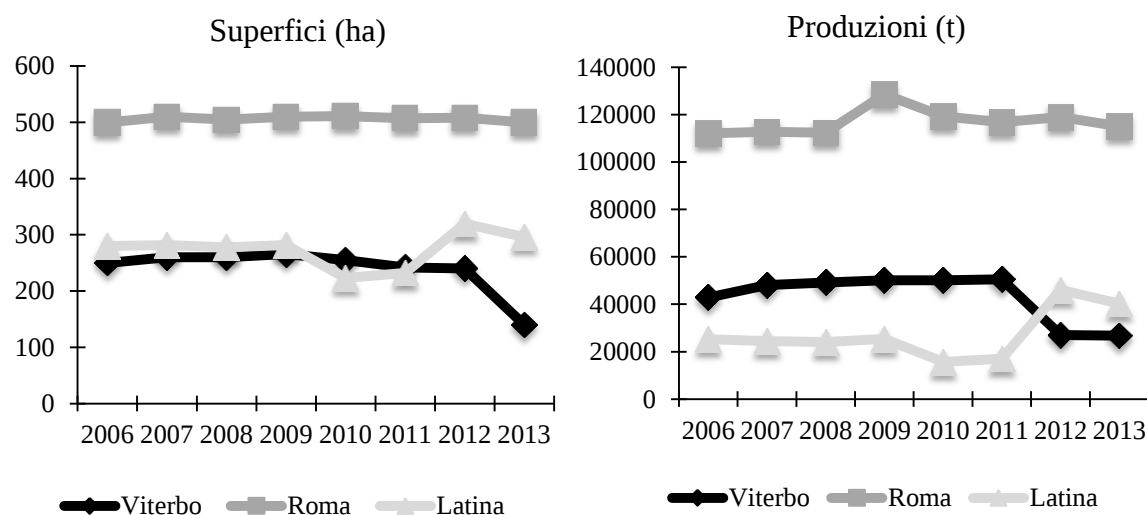


Fig. 1.1.19 – Andamento rispettivamente delle superfici investite e delle relative produzioni di carciofo nel Lazio e in particolare nelle province di Roma, Latina e Viterbo dal 2006 al 2013 (dati ISTAT).

1.1.6 PANORAMA VARIETALE ITALIANO

La costituzione di nuove varietà di carciofo è stata realizzata per molto tempo mediante selezione clonale individuando, all'interno di popolazioni locali propagate per via agamica, individui con caratteristiche particolarmente interessanti. I numerosi svantaggi che la propagazione vegetativa presenta quali poca flessibilità nella scelta del trapianto, eterogeneità del materiale ottenuto, basso attecchimento delle piante, manodopera elevata e diffusione di malattie, hanno portato all'individuazione di tecniche innovative di propagazione. Una di queste è per via gamica e quindi da seme utilizzando il miglioramento genetico e la costituzione di ibridi F₁. Gli ibridi commerciali diffusi non presentano le problematiche suddette della propagazione vegetativa, in più hanno maggiore produzione dovuta anche all'effetto dell'eterosi che si genera, ed una maggiore adattabilità alla lavorazione industriale (Zaniboni, 2009).

Malgrado l'importanza economica della coltura, il carciofo è una specie sostanzialmente trascurata dalla ricerca. In Italia sono stati svolti e si stanno avviando programmi di ricerca che considerano le necessità e le prospettive di utilizzazione di questo ortaggio, promuovendo il rinnovamento del panorama varietale.

Il materiale più coltivato di carciofo, il cui nome richiama generalmente le zone di origine, è costituito da popolazioni o cloni provenienti dalle principali aree di coltivazione da dove sono stati successivamente introdotti in altre regioni (Mauromicale *et al.*, 2000). Le varietà di carciofo possono essere oggi raggruppate e classificate secondo differenti criteri, fondamentalmente basati sull'epoca di produzione, autunnale e primaverile (Maccioni, 1954; Barbieri, 1961) e sulle caratteristiche morfologiche del capolino (*Fig. 1.1.20*) quali la forma, il colore delle brattee, la presenza o assenza di spine (Dellacecca *et al.*, 1974; Mauromicale *et al.*, 2000). I criteri di identificazione varietale possono essere comunque unificati sulla base di cinque parametri principali:

1. epoca di inizio raccolta (autunnali, primaverili e rifioventi e non rifioventi);
2. presenza o assenza di spine:
 - inermi (foglie e capolini inermi);
 - poco spinescenti (foglie inermi e capolini spinescenti);
 - spinescenti (foglie e capolini spinescenti);
3. precocità rispetto all'epoca di inizio raccolta (precoci, medio-precoci, intermedi, medio-tardivi, tardivi);
4. forma del capolino (cilindrica, conica, ovoidale, sferica, subsferica);

5. colore delle brattee esterne (verde-chiaro, verde, verde intenso, verde con sfumature violette, verde con sfumature violette all'apice, violetto con sfumature verdi, violetto, violetto intenso) (Dellacecca *et al.*, 1974).

Le varietà precoci, dette anche rifioventi o autunnali sono coltivate principalmente nella regione della Puglia e nelle isole, le quali assicurano una produzione pressoché continua tra l'autunno e la primavera e riguardano l'80% del patrimonio varietale nazionale (Tab. 1.1.1).

Tab. 1.1.1 – Varietà precoci maggiormente coltivate in Italia (Calabrese *et al.*, 2007).

Areale di coltivazione	Cultivar	Epoca di produzione
Sardegna	Spinoso Sardo, Masedu (o Liscio sardo)	novembre-aprile
Sicilia	Violetto di Sicilia, Spinoso violetto di Palermo (o Spinella)	ottobre-aprile
Puglia	Violetto di Provenza (o Francesino) ⁽¹⁾ , Brindisino ⁽²⁾ , Locale di Mola ⁽³⁾	ottobre-aprile

(¹) Diffuso soprattutto in provincia di Foggia. (²) Coltivato in provincia di Brindisi. (³) Coltivato in provincia di Bari.

Le varietà tardive o primaverili, di cui oggi fanno parte diversi ibridi commerciali che spesso ricadono nel raggruppamento dei “Romaneschi”, sono molto diffuse nelle regioni del centro Italia, forniscono solo produzioni nel mese di febbraio le più precoci, come il C3, nel mese di aprile/maggio le più tardive, come il Campagnano (Tab. 1.1.2).

Tab. 1.1.2 – Varietà tardive più coltivate in Italia (Mauromicale *et al.*, 2000).

Areale di coltivazione	Cultivar	Epoca di produzione
Campania	Castellammare ² , Campagnano ²	marzo-maggio
Lazio	Romaneschi: C3 ¹ , Grato1, Romolo	febbraio-aprile
Toscana	Violetto di Toscana e Terom	aprile-giugno

(¹) Diffuso soprattutto in provincia di Roma (²) Coltivato anche nel Lazio.

Un maggiore impegno nel miglioramento genetico è auspicabile ai fini della produzione di varietà in grado di coprire e possibilmente ampliare il periodo di coltivazione, caratterizzate da un migliore adattamento alle esigenze dei diversi ambienti pedoclimatici di coltivazione, con caratteristiche più idonee per i diversi impieghi possibili (consumo fresco, carciofini sott'olio, paste, surgelato).

Le varietà a propagazione via seme negli ultimi anni si stanno notevolmente diffondendo, visti i benefici che si hanno sia a livello di razionalizzazione delle tecniche colturali, sia al miglioramento fitosanitario ed incremento delle produzioni. Ciò è dovuto anche all'utilizzo di ibridi F₁ che risultano più vigorosi e produttivi, ormai di facile reperimento a causa del fatto che ormai molte ditte sementiere si dedicano alla loro commercializzazione (Zaniboni, 2009).

a) Carciofo “Romanesco”

Nel Lazio sono soprattutto diffuse cultivar primaverili del tipo "Romanesco", di cui Campagnano e Castellammare rappresentano i cloni tradizionali più rilevanti. La cultivar Campagnano risulta essere il discendente diretto delle colture che un tempo si praticavano nei paesi più interni del Lazio (nelle zone di Campagnano, Sezze, Priverno) che, arrivando nei dintorni di Roma verso il 1870, hanno contribuito a stabilire la fama di cui il carciofo romanesco attualmente gode.

La cultivar Castellammare è stata invece introdotta più tardi dal Sud con lo spostarsi e l'affinarsi della coltura verso gli areali litoranei, dove indubbiamente trova ambienti con clima temperato-caldo più adatti alla coltivazione della specie (Jacoboni, 1958). L'unica differenza tra le due cultivar consiste nella maggiore precocità di “Castellammare” (anticipo di 20 giorni) ma il carciofo “Campagnano” oggi viene considerato il tipico romanesco (*Fig. 1.1.20*).

Le piante hanno un'altezza di circa 1.20 m, con l'inserzione del capolino principale, il cimaro, intorno a 1 m e capolini secondari o braccioli formati dalle gemme ascellari delle foglie superiori e sottostanti; nel corso di una stagione, ogni pianta può produrre 8-10 capolini.

Nel carciofo romanesco, è evidente l'eterofillia: le foglie più giovani sono indivise o presentano appena un inizio di lobatura, si ergono verso l'alto avvicinandosi ai capolini, mentre quelle sottostanti e basali sono tutte bipennatifide.

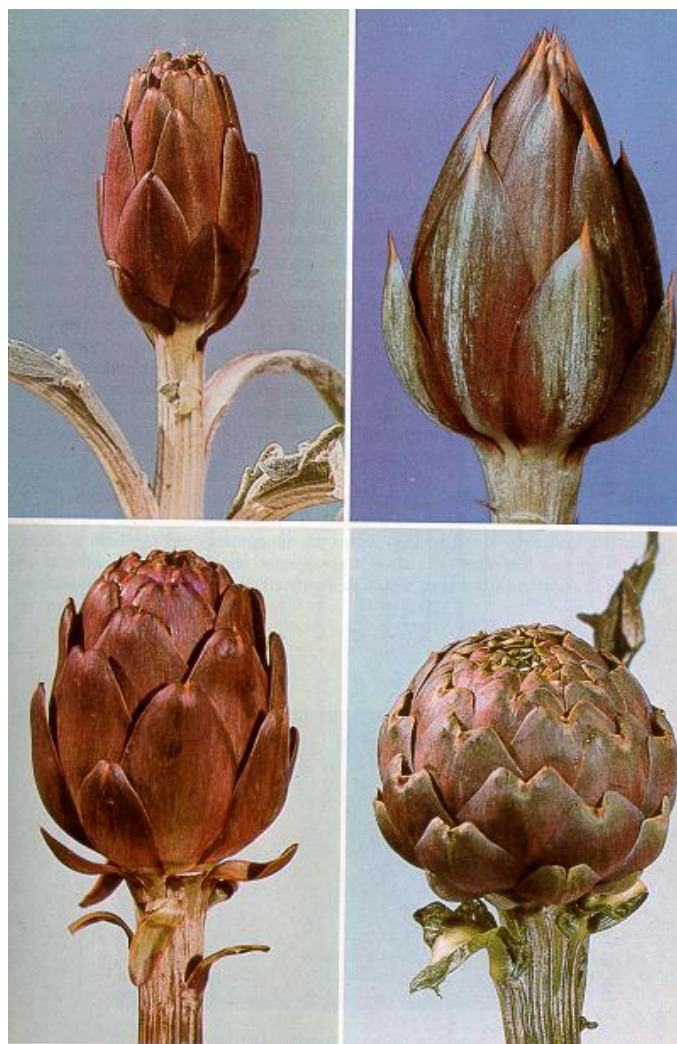


Fig. 1.1.20 – Capolini di cultivar diverse: Catanese, Spinoso Sardo, Violetto di Toscana e Romanesco (Bianco *et al.*, 1990).

I capolini sono per lo più sferici, con depressioni in corrispondenza delle due estremità, e grandi (lunghi mediamente 10,5 cm e larghi anche 10,5 cm) (Bianco, 1990); le brattee sono di colore variabile tra il verde con sfumature violette, serrate e disposte in modo da lasciare un foro al centro del capolino, al violetto. Il peso medio del capolino è di 300-450 g.

L'applicazione di nuove tecniche di moltiplicazione quali la micropropagazione ha portato alla diffusione di altri cloni precoci quali C3, C4 (Temperini, 2009).

Esistono tuttavia recenti costituzioni come ad esempio la cv. “Terom”, una varietà di tipo primaverile più precoce del “Violetto di Toscana” caratterizzata da un capolino notevolmente più grande (Tesi, 1981) che, ottenuta presso l'Università di Pisa, è tuttora coltivata nelle aree tipiche del “Violetto di Toscana”; la cv. “Tema 2000”, una varietà di tipo autunnale, è stata isolata da una popolazione di semi derivati dalla cv. “Terom” (Tesi, 1994).

Gli agricoltori laziali hanno manifestato interesse anche nei confronti di due cultivar, “Grato 1” e “Grato 2” (*Fig. 1.1.21 a e b*), entrambe di tipo “Romanesco” e selezionate da semi derivati da libera impollinazione di piante della cv. “Castellammare” e “Campagnano” (Graifenberg *et al.*, 1996; Temperini, 2009). “Grato 1”, precoce e produttivo, presenta dei capolini globosi, simili al “Campagnano” ma con pezzatura maggiore e brattee più carnose e violette (Graifenberg *et al.*, 1993) mentre “Grato 2” è caratterizzato da capolini più verdi e tardivi (Graifenberg *et al.*, 1993).

Nel 1997, Papalini *et al.* hanno realizzato due nuove varietà, “Moro di Corneto” ed “Etrusco”, derivate rispettivamente da incroci tra le cv. Terom e Castellammare e tra il clone A4 israeliano e la cv. Castellammare, i quali non hanno avuto una notevole diffusione.

La cv. Moro di Corneto è caratterizzata da capolini globosi, di colorazione violetta e dimensioni più grandi del tipo “Romanesco”, mentre la cv. Etrusco è caratterizzata da una forma più allungata del Romanesco e da elevata produttività.



Fig. 1.1.21 – Cultivar (a) Grato 1 e (b) Grato 2.

Il clone C3 è una varietà precoce di carciofo “Romanesco”, ottenuto mediante selezione clonale, abbastanza diffuso nel litorale laziale. È una pianta di media vigoria con foglie di colore verde cinereo; il capolino è di forma sub-sferica schiacciata, con brattee molto serrate di colore verde con sfumature violacee, disposte in modo da lasciare un incavo nel centro (*Fig. 1.1.22*).



Fig. 1.1.22 – Cultivar C3 del tipo “Romanesco”.

1.1.7 ASPETTI AGRONOMICI

a) Esigenze pedo-climatiche

Il carciofo è una pianta che si adatta bene al clima mediterraneo, caratterizzato da inverni miti, temperature elevate e siccità estive. Le condizioni estive avverse vengono superate dalla pianta attraverso il riposo vegetativo.

Per quanto riguarda le esigenze termiche distinguiamo: 15-20°C per la germinazione, 20-22°C diurni e 12-14°C notturni per la crescita delle piante, 7-9°C come temperatura minima biologica e inferiore a -10°C come temperatura letale.

Il carciofo si adatta a quasi tutti i tipi di terreno, anche se preferisce quelli di medio impasto, profondi, freschi e ben drenati, ad un pH compreso fra 6,4 e 7,0 e con esposizione preferenziale a Sud o Sud-Est (Bianco *et al.*, 1990).

Per il cardo, il terreno deve essere lavorato bene in tutto il suo spessore perché le radici si sviluppino e si approfondiscono molto. Il cardo comunque predilige terreni fertili e profondi, di medio impasto con reazione tendenzialmente neutra. In realtà questo ortaggio può adattarsi in vari tipi di terreno, compresi quelli sassosi, purché si disponga di acqua per irrigare, e quelli più pesanti, qualora non vi siano ristagni. È opportuno non coltivare il cardo in terreni dove nelle precedenti 2-3 annate c'era il cardo stesso o altre piante della stessa famiglia botanica (es. carciofo).

Le esigenze termiche del cardo sono analoghe a quelle del carciofo anche se è un po' più sensibile alle basse temperature in quanto arresta la crescita a 0°C e può andare incontro a morte se scendono al di sotto dei -2°C. L'esposizione deve essere soleggiata.

b) Esigenze idriche

Il carciofo è una pianta che potrebbe portare a termine il suo ciclo colturale con l'aiuto delle sole acque meteoriche, anche se per raggiungere ottimi livelli produttivi, necessita di diversi interventi irrigui. A seconda del metodo di coltivazione i fabbisogni idrici del carciofo possono essere diversi e sono molto alti nel caso di propagazione da seme e trapianto a luglio oppure risveglio anticipato a giugno e più bassi nel caso di risveglio tardivo a settembre (Cantore *et al.*, 2009).

I metodi di irrigazione più utilizzati sono quelli per aspersione e a goccia, con dei volumi di adacquamento stagionale di circa 4.000-5.000 m³ ha⁻¹ per anno. Il metodo localizzato a goccia si sta diffondendo soprattutto al Sud e nelle Isole dove si riscontrano basse disponibilità idriche e un'elevata evapotraspirazione. Gli interventi irrigui vanno effettuati quando l'umidità del terreno è circa il 25-30% della capacità di campo. La fase di maggior fabbisogno idrico risulta essere quella relativa alla formazione del capolino (Tarantino, 1979; Bianco *et al.*, 1990).

Per esprimere le capacità produttive del cardo, è necessario effettuare regolari irrigazioni se il decorso pluviometrico è sfavorevole e queste si rendono necessarie a partire dal mese di giugno. Le irrigazioni corrette sono infatti le cure colturali più importanti per lo sviluppo dei cardi, devono essere effettuate non appena il terreno si asciuga e intensificate durante i periodi secchi in quanto, questi ortaggi temono la siccità. Se le piante soffrono la siccità, oltre ad avere uno sviluppo contenuto, producono coste coriacee e amare. Per eseguire l'irrigazione, si possono adoperare tanto i sistemi per aspersione (a pioggia) che per infiltrazione laterale dentro solchi, oppure è possibile impiegare manichette forate poste a livello del terreno. È opportuno in ogni caso irrigare spesso con limitati volumi di acqua piuttosto che bagnare molto e poi lasciare le colture a lungo senza irrigazioni.

c) Esigenze nutritive

La somministrazione degli elementi nutritivi deve tener conto delle differenze di produzione di sostanza secca tra le cultivar autunnali e quelle primaverili di carciofo a parità di densità di impianto di circa 7.000 pt ha⁻¹: 13 t ha⁻¹ per le rifioranti (autunnali) e 17,6 t ha⁻¹ per le non rifioranti (primaverili) (Graifenberg *et al.*, 2009).

Le asportazioni di macroelementi dal terreno raccogliendo soltanto i capolini risultano:

- precoce 31% N – 32% P₂O₅ – 33% K₂O;
- tardivo 21% N – 27% P₂O₅ – 17% K₂O.

Pertanto le dosi medie di concime da somministrare, consigliate da Tesi (1994), sono le seguenti: 100-150 kg ha⁻¹ di N, 150-200 kg ha⁻¹ di P₂O₅ e 150 kg ha⁻¹ di K₂O. In inverno è utile un apporto di 150-200 kg ha⁻¹ di N ureico. Tali quantitativi vanno tuttavia aumentati nelle regioni meridionali, in considerazione del ciclo produttivo più lungo e quindi delle maggiori asportazioni.

d) Propagazione

A parte la necessità di produrre nuovi cloni migliorati, uno dei problemi ancora non completamente risolti è quello della produzione di materiale genetico valido per la moltiplicazione.

Infatti rimanendo quello della moltiplicazione per seme un metodo ancora da migliorare, la propagazione vegetativa associata alla necessità di ringiovanire le carciofaie dopo 4-5 anni dall'impianto, pone il problema della produzione di materiale di propagazione qualificato (esente da patogeni) e possibilmente a basso costo.

– Metodi convenzionali. Il carciofo, normalmente, può essere propagato per via vegetativa (agamica) mediante parti di pianta (ovoli, carducci, zampe). Questo tipo di propagazione favorisce tuttavia la diffusione dei patogeni, creando a volte problemi fitosanitari (Ancora *et al.*, 1987), e determina inoltre una bassa efficienza di moltiplicazione.

Per l'ottenimento di ovoli e carducci di carciofo si ricorre a piante destinate alla normale produzione di capolini, il che consente di utilizzare in misura molto modesta il potenziale di moltiplicazione di questa specie, pari a circa 30 germogli/pianta/anno se si rinuncia alla produzione di capolini (Mauromicale *et al.*, 1986; Micozzi *et al.*, 2004).

La causa del basso tasso di moltiplicazione è da ricercarsi nell'azione inibitrice della dominanza apicale, la quale permette l'accrescimento di germogli laterali soltanto dopo la differenziazione del capolino principale, quando cioè essa inizia progressivamente a regredire. I primi germogli formati esercitano a loro volta una forte azione competitiva nei confronti di quelli che sono in fase di differenziazione, rallentandone i processi di accrescimento e di sviluppo. L'azione della dominanza apicale prima, e della competizione tra i germogli successivamente, determinano anche

sviluppo diverso dei germogli e, di conseguenza, eterogeneità morfologica e fisiologica del materiale di moltiplicazione che si andrà a formare.

La propagazione per seme, utile per il superamento di alcune malattie, costituisce un'interessante possibilità per il futuro della coltura del carciofo (Pécaut *et al.*, 1979). Alcuni aspetti della biologia fiorale (Foury, 1967), tra cui la proterandria, rappresentano degli ostacoli all'uso del seme, comportando elevata eterogeneità nella discendenza di una pianta.

i. Carducci

Si tratta di germogli provenienti da gemme poste sulla parte sotterranea (rizoma) della pianta, sia nella fase di ripresa vegetativa che in quella di crescita; sono capaci di radicare e di dare piante atte alla propagazione. Alla ripresa vegetativa, ogni pianta emette mediamente 8-10 carducci, di cui soltanto 5-6 rispondenti alle caratteristiche fenotipiche idonee per la costituzione di nuove carciofaie e quindi utilizzabili; i rimanenti germogli vengono eliminati lasciandone solo uno che andrà a costituire la parte epigea della nuova pianta.

Per un buon attecchimento, i carducci devono presentare un buon numero di radici, 4-5 foglie, meglio a margine intero in quanto sembra che producano capolini più precoci e numerosi (Miccolis, 1996). Si possono staccare dalla pianta madre poco prima del trapianto, oppure si possono utilizzare quelli posti in precedenza a radicare in vivaio. Questo metodo di propagazione è largamente utilizzato dall'autunno alla primavera e la produzione del primo anno è molto scarsa (Bianco *et al.*, 1990).

ii. Ovoli

Gli ovoli sono rami quiescenti inseriti sul rizoma che non hanno completato lo sviluppo a causa delle temperature elevate e dei deficit idrici; sono muniti di una gemma apicale e di diverse gemme laterali. Hanno una forma cilindrica, con 13-14 cm di altezza e 1,0-3,5 cm di diametro. Il numero di ovoli per pianta può superare le 20 unità, anche se le diverse dimensioni non li rendono tutti prontamente utilizzabili.

L'ovolo viene prelevato dalla pianta madre in riposo tra la fine di luglio e la metà agosto (Miccolis, 1996) e, dopo aver trascorso un periodo di quiescenza abbastanza lungo (circa due mesi), sono disposti in strati di paglia e fatti pregermogliare in ambiente caldo-umido. La scelta deve cadere su quelli posti verso la base del rizoma perché si sono differenziati prima e perciò presentano maggiori dimensioni, dando origine a piante più precoci, più produttive e con foglie meno frequentemente divise (Bianco *et al.*, 1990). Il pregio di questo metodo consiste nell'ottenere una buona

produzione a partire dal primo anno di impianto. Gli ovoli vanno prelevati da carciofaie di un anno di età scegliendo tra piante sane, precoci, produttive e quanto più possibili uniformi per caratteri morfo-biologici.

iii. Zampe

Le ceppaie, in corrispondenza dell'estirpamento della carciofaia, vengono divise in frazioni (dette "zampe"), tali che in ciascuna di esse sia presente, oltre alle radici, anche un congruo numero di gemme da impiegare per un nuovo impianto. Con questo metodo, ormai in disuso, si assiste però ad una notevole disformità di produzione, ad una maturazione più tardiva, ad un elevato polimorfismo fogliare e a problemi fitosanitari (Tesi, 1994).

– Metodi innovativi. Lo sviluppo delle tecniche di colture *in vitro*, ha spinto De Leo e Greco a tentare di mettere a punto, già nel 1973, un metodo di coltura *in vitro* per il carciofo, basato sulla proliferazione di gemme da meristemi apicali per l'ottenimento di carciofaie uniformi e risanate da virus (Saccardo *et al.*, 1985).

Le prime esperienze di moltiplicazione *in vitro* sono state effettuate utilizzando piantine derivate da seme, dal momento che, usando espianti di piante adulte, si è andato incontro a notevoli problemi di contaminazione.

Nella *Tab. 1.1.3* sono sintetizzati i risultati sinora ottenuti in letteratura.

Già nel 1979, dai lavori riguardanti la coltura *in vitro*, sono state messe in evidenza le difficoltà nella formazione delle radici. Questa avveniva in percentuali troppo ridotte per rendere economicamente accettabili le piantine micropropagate. Da allora sono state intraprese molte sperimentazioni per il miglioramento della tecnica di micropropagazione, decisamente migliorata, anche se non del tutto risolta.

Dei laboratori privati sono in grado di immettere oggi sul mercato decine di migliaia di piante di carciofo micropropagate, non solo come pianta madre ma anche per la produzione diretta di capolini.

Lo sviluppo delle tecniche di propagazione *in vitro* che, in Italia, sono state di fatto messe a punto all'inizio degli anni '80, negli anni 2000 e tuttora presso i laboratori dell'ENEA, almeno nel caso delle varietà primaverili (Ancora, 1986; Stamigna *et al.*, 2000; Tavazza *et al.*, 2010), ha reso possibile di propagare materiale risanato, moltiplicare cloni selezionati e disporre di carciofaie uniformi.

Tab.1.1.3 - Risposta dei diversi espianti di carciofo alla coltura *in vitro*.

Tipo di espianto	Risposta <i>in vitro</i>	Referenze
Brattee	Callo	Toponi (1960)
Segmenti fogliari, radici	Callo	Harbaoui (1982)
Ricettacolo	Callo, sviluppo dei fiori	Ancora <i>et al.</i> (1979), Moncousin (1979), Scaramella Petri e Ricci (1979)
Ricettacolo	Callo, radici avventizie	Morone Fortunato <i>et al.</i> (1979), Harbaoui (1982), Devos <i>et al.</i> (1975)
Scapo fiorale	Callo, embrioidi	Scaramella e Ricci (1979)
Tessuti del rizoma	Germogli e radici	Scaramella e Ricci (1979)
Cotiledoni	Callo, radici, strutture verdi globulari	De Leo e Greco (1973)
Semi	Crescita e proliferazione di germogli	De Leo e Greco (1973), Benoit e Ducreux (1981), Boullani <i>et al.</i> (2013)
Meristemi apicali	Crescita e proliferazione di germogli, piantine	Pena-Iglesias e Ayuso-Gonzales (1974, 1980), Harbaoui e Debergh (1980), Harbaoui (1982), Harbaoui <i>et al.</i> (1982), Morone Fortunato <i>et al.</i> (1979), Moncousin (1979, 1981), Ancora <i>et al.</i> (1981), Pecaut <i>et al.</i> (1983), Castiglione <i>et al.</i> (2007), Ruta <i>et al.</i> (2012)
Meristemi apicali "Romaneschi"	Crescita e proliferazione di germogli, piantine	Saccardo ed Ancora (1984), Tavazza <i>et al.</i> (2004)
Meristemi apicali "Cultivar precoci"	Crescita e proliferazione di germogli, piantine	Rossi e De Paoli (1986), Elia <i>et al.</i> (2007), Campanelli <i>et al.</i> (2013)

La disponibilità di piantine micropropagate, di cui tra l'altro presentano un rapido sviluppo in campo, ha consentito l'adozione di una tecnica agronomica che permette di entrare in produzione già nell'anno del trapianto delle piantine stesse (in tal modo è possibile un rapido ammortamento delle spese di impianto della carciofaia) (Saccardo e Ancora, 1984). Al contrario, per le cultivar rifioranti, l'impiego delle tecniche di coltura *in vitro* ha invece determinato la perdita di precocità nei cloni, fenomeno di fatto limitante per la produzione di piantine micropropagate. Questo fenomeno meriterebbe di essere adeguatamente studiato sia per gli aspetti scientifici del problema (meccanismi di regolazione genica alla base della perdita di precocità) che per i vantaggi pratici i quali potrebbero derivare dall'identificazione di condizioni per la propagazione *in vitro*, mantenendo le caratteristiche di precocità.

La produzione di genotipi tardivi *in vitro*, realizzata ormai su scala industriale, ha dimostrato la possibilità di produrre rapidamente grandi quantità di piantine, risolvendo molti dei problemi legati alle tradizionali tecniche di propagazione (ovoli, carducci e divisione di ceppaie). Le piantine ottenute sono omogenee, esenti da patogeni, ad eccezione dei virus per i quali sono necessari interventi aggiuntivi specifici (es. termoterapia *in vitro*), di cui sarebbe possibile coltivare rapidamente genotipi selezionati in un ambiente specifico. Tuttavia è ancora necessario individuare o ottimizzare i substrati per la proliferazione *in vitro* e la radicazione, entrambi specifici per ogni genotipo. Va infine sottolineato che l'elevato costo delle piantine (circa € 1,20 cad.) scoraggia gli agricoltori nell'impiego delle stesse per la costituzione di nuove carciofaie.

Le piantine di carciofo ottenute dalla micropropagazione devono subire una fase di acclimatazione all'interno di vasetti di plastica riempiti per 80% con torba ed il restante 20% con agriperlite. In questa fase bisogna far particolare attenzione all'irrigazione del substrato che deve essere contenuta, essendo il carciofo molto sensibile all'umidità. Al contrario, l'ambiente di coltivazione, nei primi 15-20 giorni, deve avere un'umidità relativa il più possibile vicino al 100%. L'intero ciclo di acclimatazione, di circa 4-5 settimane, è diviso in due momenti, uno iniziale in serra, seguito poi da uno nell'ombraio. Una temperatura elevata, in queste fasi, compromette notevolmente la sopravvivenza delle piante; infatti i momenti migliori per eseguire l'acclimatazione sono a fine inverno, tutta la primavera e fine estate-inizio autunno. Per quanto riguarda la risposta in campo, è presente una certa differenza nella risposta agronomica fra una varietà e l'altra (Rossi *et al.*, 1990).

Tenendo conto di queste problematiche, sono stati avviati degli studi preliminari per la messa a punto di una nuova tecnica di propagazione agamica del carciofo, mediante l'impiego di rizomi e carducci frigoconservati che possano racchiudere i vantaggi della coltura *in vitro* (piante risanate ed uniformi) ma ad un costo meno oneroso per l'agricoltore (Temperini *et al.*, 2001). I primi risultati evidenziano, oltre alla validità di tale tecnica, che è possibile ottenere carducci radicati a basso costo rispetto alla piantina micropropagata; di conseguenza, potrebbe essere conveniente rendere la coltura annuale così come richiesto dalla maggior parte degli agricoltori. Infatti, passando da un ciclo poliennale ad uno annuale si otterrebbero alcuni vantaggi di notevole interesse agronomico ed economico quali, ad esempio, l'eliminazione degli onerosi interventi di scarducciatura e dicioccatura, il miglior inserimento della coltura

nelle rotazioni, il superamento delle problematiche legate alla stanchezza del terreno, la possibilità di eliminare i trattamenti chimici impiegati nella geodisinfestazione.

Le piantine derivate da coltura *in vitro* sono libere da patogeni di tipo fungino e batterico; mentre l'assenza di virus è strettamente legata alla dimensione del meristema utilizzato per la coltura *in vitro* che, secondo Harbaoui (1982), non deve superare gli 0,8 mm.

L'analisi in campo di piante micropropagate ha messo in evidenza che esse hanno un aspetto più vigoroso delle piante propagate con metodi tradizionali, rispetto alle quali appaiono anche più produttive. Infatti le piante trapiantate ad agosto-settembre vegetano fino ad ottobre-novembre rallentando poi la crescita nel periodo di freddo; al risveglio della pianta si osserva un vigoroso aumento vegetativo che la prepara ad una produzione (in aprile-maggio) paragonabile a quella di una pianta di 2-3 anni (Ancora *et al.*, 1987).

Concludendo, due sono gli aspetti più importanti della coltura *in vitro*: il primo consiste nell'uso di piante micropropagate che riduce, almeno al 1° anno, i costi di manodopera non essendo necessario il lavoro per la cura delle piante (spollonatura, pulitura, etc.); il secondo consiste nel fatto che le piante micropropagate (soprattutto cultivar di "Romanesco") consentono già di produrre al 1° anno dal trapianto.

– Propagazione gamica. Tra le innovazioni recentemente proposte per promuovere avanzamenti sostanziali, la propagazione per seme (achenio, sotto il profilo botanico) appare sicuramente quella più idonea sia per il carciofo che per il cardo.

La propagazione gamica del carciofo è basata sulla costituzione di nuovi genotipi (linee *inbred*, ibridi F₁, varietà sintetiche) con struttura genetica ben definita e sostanzialmente differente dai cloni attualmente coltivati, caratterizzati da notevole eterozigosi e quindi elevatissima variabilità morfologica. Le ricerche sulla costituzione di varietà da propagare direttamente per seme, avviata intorno alla metà degli anni 60 in Francia, solo di recente hanno fatto raggiungere progressi significativi ad opera soprattutto di ricercatori israeliani (Mauromicale, 1994). Padre delle varietà israeliane è il breeder Yehuda Basnizki, che ha prodotto una gamma di tipi in grado di accontentare la variegata domanda, soprattutto del mercato italiano (Basnizki *et al.*, 1987).

Da diversi anni sono state messe in commercio cultivar a propagazione per seme: la maggior parte di queste è stata prodotta in Israele e una ("Imperial Star") negli Stati Uniti. La prima cultivar da seme, costituita in ordine di tempo, è stata la "Talpiot", a libera impollinazione, dai capolini globosi, di pezzatura medio-grossa, di colore verde, tardiva e con produzioni medie di circa 7 capolini per pianta. Altre varietà sviluppate

negli anni '80, quali "044", "Giorgio", "Agrinos" erano caratterizzate da epoca di maturazione primaverile, produzioni elevate e contemporaneità di emissione dei capolini, colorazione verde delle brattee (Mauromicale *et al.*, 1989).

Negli anni 2000 si sono costituiti diversi ibridi di carciofo quali "044", "l'H137", "l'H223", "Orlando", "Santa Rosa", con brattee di colore verde, con il capolino allungato e produzioni molto simili a "Talpiot". Altra cultivar ad essere stata registrata è la "271", un ibrido F₁ molto precoce, dalle dimensioni medio-piccole, di forma allungata quasi conica e di un bel colore violetto.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati e in alcuni casi messi in commercio diversi ibridi F₁, di cui i primi a tipologia "Romanesco", quali il "Misa", "Sami" ed il "Romolo", caratterizzati da un capolino viola e di buone dimensione se comparato con altri ibridi commerciali quali "Opal", "Madrigal" e "Concerto" (Saccardo *et al.*, 2012).

Il panorama varietale disponibile ha raggiunto obiettivi ragguardevoli in termini di uniformità (soprattutto nelle cultivar F₁), qualità del prodotto e differenziazione dei tipi.

La riproduzione per seme consentirebbe di superare i problemi legati alla propagazione vegetativa contribuendo alla razionalizzazione delle tecniche colturali, al miglioramento dello stato fitosanitario delle piante e all'incremento delle produzioni unitarie. Il passaggio dalle forme tradizionali di produzione a quella via seme, che rendono annuale la coltura, danno la possibilità di estendere gli ambienti agricoli idonei per la coltura del carciofo e ridurre l'impiego di fertilizzanti e pesticidi. L'utilizzazione di genotipi maschiosterili è però essenziale.

e) Tecnica colturale

L'impianto avviene normalmente tramite la messa a dimora di carducci radicati e non, ovoli, piantine micropropagate e seme. Per facilitare l'attecchimento dei carducci è necessario che il terreno, sia umido nella zona radicale; in ogni caso appena terminata l'operazione di trapianto è necessario irrigare.

Il trapianto viene normalmente effettuato manualmente o meccanicamente (più raro). Nel caso del trapianto meccanizzato, per essere efficiente, l'impianto deve essere eseguito su un terreno con ottimo regime idrico e ben livellato in modo da assicurare una uniforme profondità di trapianto su campi ampi. La densità d'impianto è di 7.000-10.000 piante ad ettaro, con delle distanze d'impianto di 1-1,4 x 0,8-1,2 m. La semina diretta non viene molto effettuata, visto il costo elevato del seme ibrido; pertanto si procede alla semina in contenitori alveolari ed al trapianto dopo 35-50 gg, quando le piantine hanno raggiunto lo stadio di 3-4 foglie vere (Calabrese, 2009).

La gestione delle erbe infestanti è una pratica importante in quanto, nelle prime fasi di accrescimento, la pianta rischia di competere per l'acqua e per gli elementi nutritivi ed avere quindi una riduzione di sviluppo e produzione (Montemurro, 2009). In più alle normali pratiche agricole, quali rotazioni, letame ben maturo, false semine e sistemi irrigui localizzati, il diserbo meccanico o chimico può essere un ulteriore metodo per contenere le erbe infestanti. Il primo viene effettuato solitamente con la fresatrice o con la falciatrice, mentre quello chimico può essere effettuato in pre-ricaccio, in post-ricaccio e, per un nuovo impianto, in pre-trapianto e post-trapianto.

Il carciofo è soggetto a due pratiche di potatura: la scarducciatura e la diciocatura. La prima operazione consiste nell'eliminazione dei carducci superflui; viene eseguita a mano e pertanto risulta essere molto onerosa dal momento che assorbe circa il 30% dei costi di produzione. Il numero delle scarducciature varia da 1 a 3 a seconda delle cultivar, dell'età della pianta e del metodo di propagazione (le cultivar precoci ne emettono di più). Il numero di carducci che viene lasciato per ogni pianta dipende, dalla profondità, dalla fertilità del terreno e dalla tecnica colturale adottata. La scarducciatura comporta una riduzione del numero di capolini per pianta, causata verosimilmente dai danni provocati alla parte ipogea, ma favorisce per contro la precocità di raccolta. Generalmente si effettuano due scarducciature, una autunnale e l'altra a fine inverno-inizio primavera (Bianco *et al.*, 1990).

La diciocatura segue l'entrata in riposo estivo della pianta e consiste nell'eliminazione della parte aerea con un taglio del fusto a 2-4 cm sotto il livello del terreno. Questa operazione viene eseguita sia manualmente, con la zappa, che meccanicamente con il trinciastocchi, di solito nel periodo di giugno, quando la pianta è completamente secca. La profondità del taglio è importante in quanto determina la selezione delle gemme (Barbieri, 1967; Dellacecca *et al.*, 1967). Il taglio non deve essere fatto né troppo alto né troppo basso; nel primo caso si rischia l'emissione di un elevato numero di carducci, con conseguente elevato sfruttamento delle sostanze di riserva della pianta e un maggior impiego di manodopera per le operazioni di scarducciatura; nel secondo caso invece si rischia di compromettere la vitalità della pianta.

Nell'avvicendamento, il carciofo è considerata una pianta da rinnovo perché i residui e le sostanze che lascia nel terreno sono maggiori di quello che preleva durante il suo ciclo. Il posto nella rotazione dipende dalla durata della carciofaia, che può esaurirsi in un anno (come avviene prevalentemente in molte zone della Sardegna e Sicilia), in 3-

4 anni o anche più raramente in 7-8 anni. In generale, la carciofaia si impianta dopo il frumento, meno frequentemente dopo la bietola da zucchero, il pomodoro, la patata, la carota, ecc. La consociazione nelle colture intensive non viene effettuata; solo in qualche zona, in coltura non specializzata, si nota un'associazione con l'olivo e più raramente con piante erbacee (Bianco *et al.*, 1990).

La raccolta costituisce la fase più onerosa dell'intero ciclo colturale del carciofo costituendo il 40% dei costi di produzione. Esiste una grande variabilità tra le cultivar rispetto alla data di raccolta. In particolare, i valori vanno, a iniziare dal momento del risveglio, da un minimo di 78 (cv. autunnali), ad un massimo di 306 giorni (cv. Primaveraili). Le cultivar precoci come il "Violetto di Catania" ed il "Siracusano" portano il capolino principale entro novembre. Le cultivar tardive come il "Romanesco" ed il "Violet de Camargue" producono il capolino principale in maggio. La durata del periodo di raccolta è in media di 50 giorni, compresi tra la raccolta del capolino principale e l'ultimo dei secondari (Miccolis *et al.*, 1989). Per il tipo "Romanesco", i capolini sono pronti per la raccolta dopo circa 7 mesi dal risveglio, mentre, per il tipo "Cataneese", il capolino è pronto dopo 3-5 mesi (secondo il momento del risveglio). La raccolta viene eseguita manualmente; la lunghezza del peduncolo e la presenza di foglie varia con la destinazione del prodotto.

Il periodo di raccolta nelle cultivar precoci va da ottobre fino a maggio per un totale di 20-25 interventi, mentre per quelle più tardive va da marzo a maggio, per cui la produzione si esaurisce in 5-6 raccolte. Per ridurre i costi, sono stati realizzati mezzi che agevolano la raccolta.

La produzione è variabile in base a molti fattori, anche climatici e può oscillare tra 50.000-120.000 capolini ha^{-1} pari a 6-15 t ha^{-1} (Bianco *et al.*, 1990). Si differenzia in 5-8 capolini per pianta nel tipo Romanesco e 10-15 nel tipo rifiorente.

Il Regolamento CE N. 1466/2003 del 19 agosto 2003, stabilisce le norme di qualità per la commercializzazione applicabili al carciofo (modifica il Reg. (CE) N. 963/98). Prevede che i capolini debbano essere di aspetto fresco, sani, interi, puliti, esenti da parassiti, privi di odori e sapori estranei. Sono classificati in tre categorie: Extra, I, II. La trasformazione industriale per la preparazione di carciofini conservati al naturale, sott'aceto e surgelati impone la disponibilità di cultivar con capolini poco fibrosi, di pezzatura medio-piccola ed a maturazione contemporanea per agevolare la raccolta meccanica con la successiva lavorazione tecnologica.

Il cardo è una pianta facile da coltivare, quindi da raccomandare ai piccoli orticoltori ancora poco esperti. Un po' più impegnativo è l'imbianchimento; tuttavia, poiché il cardo si raccoglie nei periodi freddi dell'anno, quando la produzione di ortaggi nell'orto familiare è piuttosto limitata e non c'è molto lavoro, è possibile effettuare anche questa operazione. Il cardo però viene sempre meno richiesto, forse perché è un po' impegnativo da pulire e si conoscono poco i vari modi in cui si può cucinarlo. Il cardo è uno degli ortaggi più pregiati ed il piccolo orticoltore può contribuire in maniera determinante a mantenere la sua presenza nelle tradizioni gastronomiche delle nostre regioni.

f) Avversità da stress biotici

Gli stress sono delle condizioni esterne che influiscono negativamente sulla crescita, sviluppo e produttività della pianta, alterando in alcuni casi l'espressione genica ed il metabolismo cellulare.

Gli stress si dividono in Biotici, quando sono causati da organismi viventi ed abiotici che vengono generati da fattori ambientali avversi alla pianta coltivata. In particolare lo stress biotico è causato da organismi che generano malattie e danni all'ospite di cui fanno parte funghi, batteri, insetti, piante infestanti e virus, anche se sono considerati organismi viventi.

Pur essendo considerato una pianta rustica, il carciofo è soggetto a numerose avversità e malattie.

Tra le malattie che interessano la parte epigea della pianta ricordiamo l'oidio o "mal bianco" (*Leveillula taurica* f.sp. *cynarae*), l'antracnosi (*Ascochyta cynarae*), le macchie fogliari (*Ramularia cynarae*), la peronospora (*Bremia lactucae*) e la muffa grigia o "marciume dei capolini" (*Botrytis cinerea*). L'apparato radicale ed il colletto, sono soggetti agli attacchi di *Verticillium dahliae* e *Verticillium albo-atrum*, di *Sclerotinia* sp., *Sclerotium* sp. e *Rhizoctonia solani* in condizioni di elevata temperatura ed umidità (Marras et al., 2009).

Particolare importanza riveste la lotta contro l'avvizzimento del carciofo (Fig. 1.1.23) causato da *Verticillium dahliae* Kleb. (Cirulli et al., 1984), la cui prima segnalazione sulla specie è stata registrata nel 1928 in Italia (Pulselli, 1928; Curzi, 1930). Questa tracheomicosi è ormai riconosciuta come uno dei maggiori problemi fungini che limitano la resa della coltura di carciofo in diverse aree di coltivazione, in Cile (Fernandez e Bertrand, 1988), in Italia (Cirulli et al., 1994), in California (Bhat et

al., 2003), in Spagna (Cebolla *et al.*, 2004), in Francia ed in Grecia (Jiménez-Díaz *et al.*, 2006), ed infine in Tunisia (Jabnoun -Khiareddine *et al.*, 2008).



Fig. 1.1.23 – Sintomatologia tipica da Verticillium.

Cirulli e Amenduni (2000), oltre ad Amenduni *et al.* (2005), confermano la diffusione della malattia in varie regioni italiane e principalmente in Puglia, soprattutto lungo il litorale adriatico che si estende da Bari a Brindisi, dove genera numerosi danni quali, avvizzimenti, clorosi e arresto della crescita delle piante sensibili. Generalmente le piante colpite da questo patogeno presentano uno sviluppo stentato, una taglia ridotta e una perdita generalizzata di turgore (Ciccarese *et al.*, 1985). Attualmente la lotta si basa sull'accertamento della sanità del terreno, sull'impiego di metodi di propagazione sicuri, quali seme, piante micropropagate oppure carducci derivati da piante madri certificate sane e sull'adozione di lunghe rotazioni con specie non suscettibili (Ciccarese *et al.*, 1985). La strategia per il controllo del patogeno è soprattutto basata sul trapianto in terreno non infetto, nell'impiego di piante seme e di rotazioni con specie non ospiti. L'uso di resistenze genetiche al fungo, ancora non individuate, consentirebbe un controllo economico ed ecologicamente sostenibile (Marras *et al.*, 2009). Questo fungo terricolo rimane nel terreno per lungo tempo ed essendo anche polifago, si moltiplica in altre colture che sono spesso coltivate in rotazione con il carciofo.

La propagazione vegetativa, pratica molto diffusa dai carcioficoltori italiani, facilita notevolmente la diffusione del fungo, generando infezioni sistemiche da un campo all'altro. La maggior parte delle pratiche agronomiche usate per contenere la diffusione del patogeno sono costose ed infruttuose, mentre lo sfruttamento di tolleranze al *Verticillium* potrebbe rappresentare il modo più economico e sostenibile per controllare

il fungo. Purtroppo, nessuna fonte di resistenza è fino ad ora disponibile nel germoplasma di carciofo mondiale.

Numerosi sono i virus isolati nel carciofo (circa 24 specie), trasmessi soprattutto attraverso afidi, nematodi e materiale di propagazione infetto (Gallitelli *et al.*, 2009). Questi virus determinano ingiallimenti fogliari, ma soprattutto possono rimanere anche latenti riducendo la crescita delle piante. Il più pericoloso risulta comunque il virus “dell’arricciamento maculato” (AMCV), che riduce drasticamente la superficie fogliare assimilante (Fig. 1.1.24). I danni non sono stati mai effettivamente quantificati, ma è richiesto un efficiente metodo di controllo a livello del materiale di propagazione.

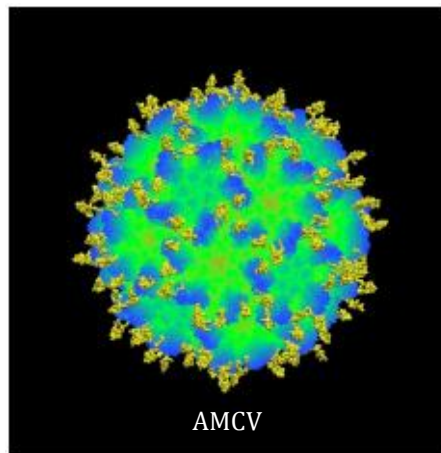


Fig. 1.1.24 – Virus dell’arricciamento maculato.

Altro virus ormai tristemente diffuso in Puglia è il “Virus latente del carciofo” di cui esiste anche un ceppo italiano, isolato anche nel Lazio e Campania in varietà tardive (Gallitelli *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda i parassiti animali, si debbono ricordare i notevoli danni provocati dai topi campagnoli (Arvicola del Savi – *Microtus savi*) e dai molluschi gasteropodi (Delrio, 2009; De Lillo, 2009).

Fra gli insetti che causano maggiori danni ricordiamo gli afidi e soprattutto le larve dei lepidotteri che scavano gallerie nelle foglie e negli steli (*Hydroecia xanthenes* e *Depressaria erinaceella*), provocando gravi danni alla produzione (fino al 55% di perdite). *Gortynia xanthenes* e *Depressaria erinaceella* sono responsabili della perdita di un’importante parte del raccolto nel Sud Italia (Ippolito *et al.*, 1979).

Altri parassiti animali risultano le altiche, le casside, il punteruolo (*Larynus scolymi*), la mosca minatrice fogliare (*Agromyza apfelbecki*) (Delrio, 2009).

Tra le avversità che colpiscono il cardo ci sono: peronospora, mal bianco o oidio, marciume batterico, maculatura anulare, e malattia delle macchie brune. Per quanto riguarda i parassiti, invece, il cardo viene attaccato da afidi, mosca del cardo, dalla nottua, dalla cassida, dal punteruolo, dalla limaccia grigia.

Fra le fisiopatie, bisogna considerare i danni da freddo, l’atrofia dei capolini, i danni da diserbanti (soprattutto quelli di tipo ormonale da 2-4D), gli ingiallimenti fogliari da asfissia radicale conseguente ad un eccesso di umidità nel terreno. Quando la

temperatura si avvicina allo zero e si mantiene a tale livello per poche ore, la prima manifestazione del danno da freddo si ha sulle brattee esterne dei capolini che mostrano l'epidermide leggermente sollevata, mentre all'interno si notano leggere screpolature e compaiono delle macchie brune. Se il freddo è più intenso e prolungato, le brattee si accartocciano, s'imbruniscono e il capolino non è più edule. Quando la temperatura scende a 8-10°C sotto zero, oltre all'apparato fogliare, che è completamente devitalizzato, vengono compromessi anche gli organi ipogei e pertanto si può assistere alla morte della pianta (Bianco *et al.*, 1990).

g) Fisiopatie

L'atrofia del capolino provoca un accrescimento ridotto dell'infiorescenza e spesso gli apici delle brattee imbruniscono e disseccano. Le brattee più esterne a volte continuano a crescere normalmente, per cui la metà superiore del capolino è vuota, tanto che volgarmente vengono detti carciofi "monaci", forse a somiglianza di una cappa indossata dai monaci. Sulle cause che provocano l'insorgere dell'atrofia, sono state formulate numerose ipotesi, non ancora del tutto chiarite. Si è notato però, che un precoce risveglio della carciofaia contribuisce ad aumentare notevolmente la percentuale di capolini atrofici, specialmente se, in corrispondenza della fase di transizione (circa 60 giorni dalla prima irrigazione), si registrano temperature superiori ai 25°C. Infatti sono state trovate delle correlazioni positive fra temperatura media e massima, eliofania del periodo di transizione e di raccolta e percentuale di capolini atrofici.

1.1.8 IMPORTANZA ALIMENTARE

La qualità del carciofo deriva da un insieme di caratteristiche: commerciali, di sicurezza, organolettiche, funzionali, nutrizionali e farmacologiche. Per quanto riguarda le caratteristiche commerciali, esiste il regolamento CEE 58/62 che ne definisce i requisiti minimi e la classificazione nelle categorie Extra, "I" e "II" (Graifenberg, 1999).

Le caratteristiche di sicurezza, data la crescente coscienza salutistica del consumatore, devono costituire il punto di forza per la valorizzazione del carciofo ad esempio Romanesco in quanto esso, nella maggior parte delle aziende, è coltivato senza nessun intervento antiparassitario: questo è possibile, oltre che per la notevole rusticità della varietà, anche perché la coltivazione avviene in un periodo di vuoto sanitario a causa dei bassi livelli termici.

In relazione alle caratteristiche organolettiche, il carciofo Romanesco, destinato prevalentemente al consumo cotto, se raccolto allo stadio giusto, riesce a mantenere le brattee tenere, integre ed un gusto tipico. Le caratteristiche funzionali del carciofo, riguardano essenzialmente l'idoneità alla conservazione. A questo proposito occorre dire che i capolini presentano un'elevata attività respiratoria (a 20°C la CO₂ emessa è 184 mg/kg h⁻¹), perdite di acqua per traspirazione che sono tanto maggiori quanto sono più elevate le temperature e nei capolini raccolti con le foglie (Graifenberg, 1999).

Per quanto riguarda le caratteristiche nutrizionali, riportate nella *Tab. 1.1.4*, il carciofo presenta uno scarso valore calorico (22 Kcal/100 g di sostanza fresca), un basso contenuto di protidi e lipidi, una concentrazione discreta di carboidrati, per lo più costituiti da inulina, un polimero del fruttosio che non viene digerito nell'intestino tenue e quindi può raggiungere l'intestino crasso dove attiva la microflora utile, evitando così fenomeni di stipsi. Contiene inoltre una serie importante di vitamine e di sali minerali (*Tab. 1.1.4*).

Il carciofo, riveste anche un ruolo importante, in quanto ricco di principi con attività biologica, soprattutto ortodifenoli, che hanno un benefico effetto sull'organismo. In uno studio effettuato dall'Università di Pisa, è emerso che qualche clone di carciofo Romanesco contiene elevate quantità di acido clorogenico, un precursore di quei principi come la cinarina, che svolgono attività di tipo preventivo ed anche terapeutico soprattutto nelle malattie del fegato e del sistema cardiocircolatorio. La cinarina abbassa il tasso di colesterolo nel sangue; per questo il carciofo può essere indicato anche in caso di iperlipidemia (www.farmacista33.it).

Tab.1.1.4 – Composizione e valore energetico del carciofo (100 g di sostanza secca).

Parte edibile	34,0%	Sodio	133 mg
Acqua	84,0%	Potassio	376 mg
Proteine	2,7%	Ferro	1,0 mg
Lipidi	0,2%	Calcio	86,0 mg
Glucidi disponibili	2,5%	Fosforo	67,0 mg
Fibra alimentare	5,5%	Niacina	0,5 mg
Energia	22kcal		

Fonte: Istituto Nazionale della Nutrizione (www.Frutilandia.it)

Oltre a costituire la base di alcune pietanze caratteristiche delle nostre regioni, il cardo può essere un ingrediente di primi piatti (sformati, risotti) e fornire uno dei contorni più fini e delicati. Per il suo sapore delicatamente amarognolo, accompagnato da una leggera «presenza dolce», si accosta in modo eccellente a diversi cibi a base di carne, in particolare ai salumi cotti. Il congelamento fa perdere almeno in parte le caratteristiche gustative di questo ortaggio e, per questo, viene di solito sconsigliato.

1.1.9 IMPIEGO INDUSTRIALE E SOTTOPRODOTTI

Di grande interesse sono i risultati conseguiti con le analisi biochimiche effettuate su cultivar italiane e straniere di carciofo, da impiegare nell'industria agroalimentare. Riguardo agli zuccheri più rappresentati, saccarosio e glucosio, le cultivar Violetto di Toscana e Spinoso Sardo risultano quelle con più elevato contenuto (*Tab. 1.1.5*).

Per l'inulina si passa da oltre 6.000 e 4.800 mg/100 g di peso fresco per le cultivar Centofoglie, Bayramasa e Violetto di Provenza, a 1.000 e a 899 mg/100 g rispettivamente per la "Hyerois" e il "Violetto di S. Erasmo".

Le cultivar con il contenuto più elevato potranno riscuotere grandi apprezzamenti per il consumo fresco, quelle con basso livello potrebbero essere proficuamente impiegate dalle industrie di trasformazione per le quali l'elevato contenuto di inulina può però far sorgere problemi tecnologici durante e dopo la preparazione dei prodotti sott'olio, con comparsa di efflorescenza bianca sui "cuori" di carciofo. Così anche la grande variabilità osservata nell'ambito dei polifenoli può costituire un criterio di scelta per l'eventuale impiego di determinate cultivar da destinare alla produzione di capolini per la IV gamma o per ridurre i problemi di imbrunimento che insorgono durante la frigoconservazione.

A tale proposito, le cultivar "Hyerois", "Violet d'Algerie", "Violetto di Provenza" e "Camard", hanno mostrato il più basso contenuto di acidi dicaffeilchinici e perciò sono le più idonee a questo tipo di utilizzazione (Sportelli, 2001), assieme alle cvs Violetto di Provenza e Catanese (*Tab. 1.1.5*).

Tab.1.1.5 - Caratteristiche qualitative di cultivar importanti nel mercato italiano (Enea, 2000).

Carattere	VARIETA'					
	Violetto S. Erasmo	Catanese	Violetto Provenza	Violetto Toscana	Romanesco	Spinoso sardo
Glucosio (mg 100 g ⁻¹ s.f.)	677	520	595	735	682	890
Fruttosio (mg 100 g ⁻¹ s.f.)	199	50	15	55	35	44
Saccarosio (mg 100 g ⁻¹ s.f.)	450	520	740	820	655	605
Inulina (mg 100 g ⁻¹ s.f.)	899	3010	4800	4325	4300	4650
Ac. clorogenico (mg 100 g ⁻¹ s.f.)	169	307	644	511	590	630
Ac. dicaffeilchinici (mg 100 g ⁻¹ s.f.)	1288	663	490	1375	970	780
Apigenina-7 glucoside (mg 100 g ⁻¹ s.f.)	22	13	32	31	43	36
Resa lavoraz. "cuori" (g 100 g ⁻¹)	49	39	37	36	37	35

Numerose ricerche sono state condotte sull'utilizzazione dei sottoprodotti della lavorazione del carciofo. La produzione di capolini in Puglia si aggira sulle 167 mila tonnellate. Circa il 25% della produzione viene destinato all'industria di prodotti in salamoia, al naturale, sott'olio, sottaceto, surgelati. Considerata una resa media del 35%, lo scarto ammonterebbe a 15 mila tonnellate. Tale prodotto (suggerito da Bianco), potrebbe essere utilmente impiegato come materia prima per la produzione di inulina e perossidasi da utilizzarsi industrialmente nei processi di depurazione delle acque reflue e per l'estrazione di principi attivi. L'inulina, in particolare, sostituisce l'amido come polisaccaride di riserva; nell'intestino funziona da ottimo substrato per l'accrescimento di batteri benefici come lattobacilli e bifidobatteri. Inoltre, non essendo assorbita, non modifica il livello degli zuccheri nel sangue, anzi promuove la glicolisi, ed è perciò raccomandata per i diabetici (Sportelli, 2001).

PARTE SPERIMENTALE

2.1 OBIETTIVI GENERALI DELLA RICERCA

Gli obiettivi presi in considerazione nell'ambito di questa ricerca sono molteplici e tendono ad approfondire aspetti mai o poco studiati relativamente al carciofo e al suo antenato, il cardo.

In particolare sono stati individuati tre obiettivi:

- Caratterizzazione citogenetica di cardo e carciofo;
- Selezione di accessioni di cardo resistenti a *V. dahliae*;
- Trasferimento di geni di resistenza a *V. dahliae* da cardo a carciofo mediante:
 - Innesto (obiettivo a breve termine);
 - Incrocio (obiettivo a lungo termine).

In relazione al primo obiettivo è stato effettuato uno studio citologico delle specie oggetto della sperimentazione. Considerando che in letteratura non sono disponibili indicazioni in merito alla morfologia e alla classificazione dei cromosomi di queste specie, la presente attività ha voluto ottenere le prime informazioni sui rispettivi cariotipi, ordinando su base morfologica e mediante analisi FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) i 34 cromosomi che le specie possiedono ed elaborando i primi ideogrammi. Pur essendo invece disponibile in bibliografia il quantitativo di DNA che il carciofo e il cardo contengono, il nostro obiettivo è stato quello di confermare questi dati e determinarne il contenuto, anche nei nostri genotipi.

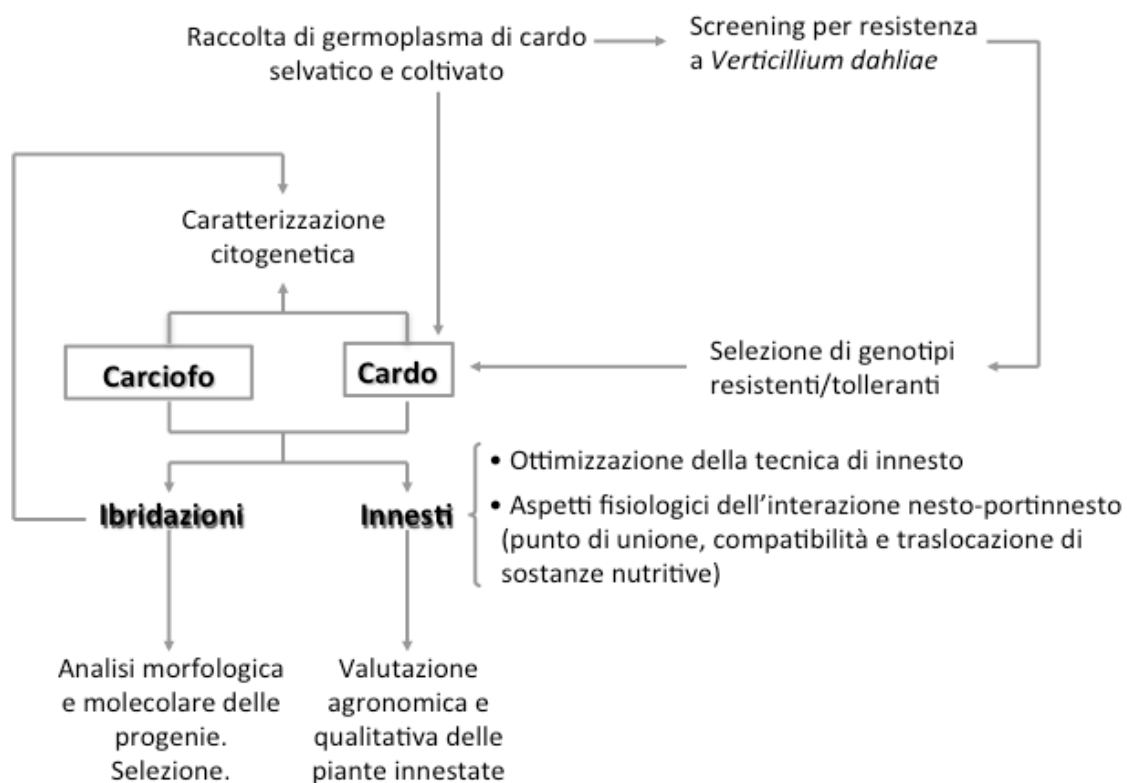
Quindi si è proceduto al reperimento preliminare di un vasto germoplasma di cardo, e alla individuazione e selezione delle accessioni più interessanti per resistenza a *V. dahliae*, un patogeno fungino importante in alcuni ambienti per la coltura del carciofo.

È stato affrontato, come obiettivo a breve termine, quello di utilizzare tali resistenze in programmi d'innesto di cultivar importanti di carciofo su portinnesto di cardo tollerante a *V. dahliae*. Per questo motivo è stato fondamentale mettere a punto la tecnica d'innesto, valutarne l'applicazione ottimale e il periodo migliore in cui effettuarlo. Successivamente i due tipi d'innesto più usati (spacco inglese e spacco in testa) sono stati valutati attraverso uno studio fisiologico ed istologico dettagliato nel punto d'innesto, mediante analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM), necessario per definire la tempistica di attecchimento, le fasi e le strutture che si generano durante la cicatrizzazione della ferita causata dal taglio e dall'unione dei due bionti. È stata quindi valutata la compatibilità dei genotipi utilizzati ad essere innestati e

analizzate le differenze nella traslocazione dei metaboliti secondari in piante innestate e non. Per completare lo studio della pianta innestata è stato anche necessario osservare la risposta agronomica degli individui innestati caratterizzando ogni tipo di combinazione effettuata.

Infine, l'obiettivo nel lungo periodo, riguarda il trasferimento di caratteri interessanti, tra cui le tolleranze a *V. dahliae*, dal cardo al carciofo per mezzo d'ibridazioni. Essendo un'attività che richiede anni di lavoro, anche in considerazione del ciclo biologico delle specie, sono state, per il momento, avviate le attività di breeding valutando la tecnica di incrocio, utilizzando maschiosterili di carciofo impollinato dal cardo ed infine realizzando, ove possibile, la caratterizzazione morfologica degli ibridi cardo x carciofo ottenuti.

Per raggiungere gli obiettivi descritti, è stata applicata la strategia descritta nel seguente schema:



2.2 CARATTERIZZAZIONE CITOGENETICA

2.2.1 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, la variabilità genetica di cardo e carciofo è stata analizzata utilizzando diversi tipi di marcatori molecolari (Sonnante *et al.*, 2002, 2011; Pagnotta *et al.*, 2004; Acquadro *et al.*, 2005; Lanteri *et al.*, 2006; Cravero, 2007; Portis *et al.*, 2009; Scaglione *et al.*, 2012), tuttavia, a differenza di altre specie appartenenti alla famiglia delle *Asteraceae*, quali ad esempio girasole, lattuga e cicoria, l'analisi del genoma e della sua organizzazione, in queste varietà, è rimasta in gran parte inesplorata. Ad eccezione di rari articoli che riportano il contenuto di DNA di carciofo (Dominique Marie e Spencer C. Brown, 1993) e, recentemente, di alcune accessioni di cardo selvatico (Khaldi *et al.*, 2014), studi relativi alla caratterizzazione citogenetica di queste varietà sono totalmente assenti in letteratura. La prima fase nella caratterizzazione citogenetica di una specie consiste nella descrizione, su base morfologica, del suo complemento cromosomico o analisi cariotipica. Tale analisi è effettuata, solitamente, nel momento di maggior condensazione dei cromosomi, ovvero nel corso della metafase mitotica; tuttavia l'asincronia del ciclo cellulare nei tessuti meristematici spesso non consente di disporre di un buon numero di metafasi e, pertanto, si rende necessario l'uso di trattamenti che incrementino il numero di cellule in mitosi. Inoltre, in cardo e carciofo, la ridotta dimensione dei cromosomi rende difficile una chiara identificazione di marcatori morfologici quali la costrizione primaria (centromero) ed eventuali costrizioni secondarie presenti nei cromosomi. La discriminazione e l'identificazione dei singoli cromosomi può essere notevolmente agevolata dall'uso di una tecnica quale l'ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti, denominata FISH, la quale consente la localizzazione simultanea o successiva di uno o più sonde di DNA lungo i cromosomi. La caratterizzazione citogenetica mediante FISH è un approccio informativo, ampiamente utilizzato in pianta, non solo per l'identificazione cromosomica ma anche per lo studio dell'organizzazione genomica, per l'analisi di traslocazioni e riarrangiamenti cromosomici, per la localizzazione fisica di marcatori molecolari e per studi di carattere evolutivo (Cuadrado *et al.* 2008, Figueroa and Bass. 2010).

Il genoma vegetale è costituito per la maggior parte da sequenze ripetute, (Heslop-Harrison e Swarzacher 2011) che differiscono per dimensione, abbondanza e distribuzione a livello cromosomico. Tra queste, i microsatelliti, costituiti da semplici

ripetizioni a *tandem* di pochi nucleotidi (3-5), sono presenti nel genoma di molte piante in migliaia di copie e sono stati ampiamente usati come sonde in indagini FISH, per lo studio del complemento cromosomico di numerose specie (Heslop-Harrison e Swarzacher 2011; Cuadrado *et al.* 2008).

Nel corso del presente dottorato, lo studio del genoma di *C. cardunculus* var. *scolymus* e di *C. cardunculus* var. *atilis* ha avuto inizio con la determinazione del contenuto di DNA totale nelle due varietà, utilizzando un approccio di tipo citofluorimetrico. Successivamente, il complemento cromosomico di cardo e carciofo è stato investigato, mediante l'analisi morfologica dei diversi cromosomi che compongono il loro genoma, analisi che hanno consentito di definire per la prima volta, il cariotipo di ciascuna varietà. Una più approfondita caratterizzazione citogenetica di cardo e carciofo è stata condotta mediante esperimenti d'ibridazione *in situ* (FISH) utilizzando come sonde brevi oligonucleotidi sintetici e fluorescenti corrispondenti a microsatelliti. Il raggiungimento di questi risultati ha richiesto la comparazione di diversi protocolli per la preparazione dei preparati microscopici. Al fine di incrementare il numero di cellule in metafase e di disporre di cromosomi con una morfologia ben definita è stato analizzato l'effetto di vari agenti inibitori del fuso mitotico, sul ciclo cellulare di apici radicali di cardo e carciofo e, infine, sono state valutate due diverse metodologie per l'ottenimento di vetrini contenenti piastre metafasiche abbondanti e prive di citoplasma.

2.2.2 MATERIALI E METODI

a) Materiale vegetale

I semi di carciofo, Romolo ed Istar, e cardo, Sardo e Bianco Avorio, sono stati gentilmente forniti dalla Ditta Sementiera italiana SEMIORTO Sementi (Sarno, Salerno). Le cariossidi di *Zea mays* L. 'CE-777', usate per l'ottenimento dello standard di riferimento nella determinazione del contenuto di DNA, sono state fornite dal Prof. J. Dolezel dell'Istituto Sperimentale di Botanica, Olomouc. (Repubblica Ceca). Tutti i semi, dopo imbibizione in acqua, sono stati fatti germinare al buio su carta bibula, in capsule Petri a 25°C per il tempo necessario ad ottenere radichette di 0,5-1 cm di lunghezza utilizzate poi per le analisi citogenetiche; in alternativa i semi sono stati posti all'interno di un substrato di perlite per lo sviluppo di piantine da cui sono state asportate giovani le foglioline usate per la determinazione del contenuto di DNA.

b) Citometria a flusso

– Isolamento dei nuclei: L'analisi citometrica del contenuto di DNA prevede l'isolamento di nuclei in sospensione. Questi sono stati ottenuti tramite sminuzzamento di tessuto fogliare in tampone di estrazione secondo la procedura descritta da Galbraith *et al.* (1983). Al fine di ottenere una sospensione ricca di nuclei sono stati saggiati diversi tamponi la cui composizione chimica è riportata nella *tabella 2.2.1*. In breve, 40 mg circa di tessuto fogliare giovane sono stati sminuzzati finemente con una lama da bisturi in 1 ml di tampone d'estrazione (Doležel *et al.*, 1989). Allo scopo di rimuovere i residui tissutali, la sospensione è stata filtrata con una siringa da 1 ml munita di filtro da 36 µm. Il DNA nucleare è stato colorato con una soluzione contenente 74,8 µM di Ioduro di Propidio (PI) (Doležel *et al.*, 1992) e l'RNA eventualmente presente, eliminato mediante trattamento con RNAsi (concentrazione 100 µg/ml).

Tab. 2.2.1 – Tamponi utilizzati per l'estrazione di nuclei vegetali.

TAMPONE	COMPOSIZIONE	RIFERIMENTO BIBLIO.
Tris-MgCl ₂	200 mM TRIS, 4 mM MgCl ₂ .6H ₂ O and 0.5% (v/v) Triton X-100; pH 7.5	Otto (1990)
LB01	15 mM TRIS, 2 mM Na ₂ EDTA, 0.5 mM spermine tetrahydrochloride, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 15 β-mercaptoethanol, 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.2	Doležel <i>et al.</i> , (1989)
Otto buffers	Otto I buffer: 100 mM of citric acid monohydrate and 0.5% (v/v) of Tween 20; pH 2.3 Otto II buffer: 400 mM of Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O; pH 8.9	Doležel and Göhde (1995) Pfosser <i>et al.</i> , (1995)

Allo scopo di provare ad incrementare la quantità e qualità dei nuclei in sospensione, nel procedimento di estrazione è stata introdotta una fase di fissazione delle giovani foglie in una soluzione di formaldeide (CH₂O, in soluzione al 36.5%, Sigma F8775) al 3,5% in tampone Tris (Tris 10 mM, Na₂EDTA.2H₂O 10 mM, NaCl 100 mM, 0,1% Triton X-100). Le foglie di cardo e carciofo sono state fissate per 20 minuti a 4°C, quindi la formaldeide è stata rimossa mediante tre lavaggi da 5 minuti in tampone TRIS a 4°C. Infine il materiale è stato finemente tritato in 1 ml di tampone

LB01 con bisturi e pinzette (*Fig. 2.2.1 a*), oppure omogenizzato con ULTRA-TURRAX T25 a velocità 5 per 13 secondi e filtrato come descritto precedentemente (*Fig. 2.2.1 b*).

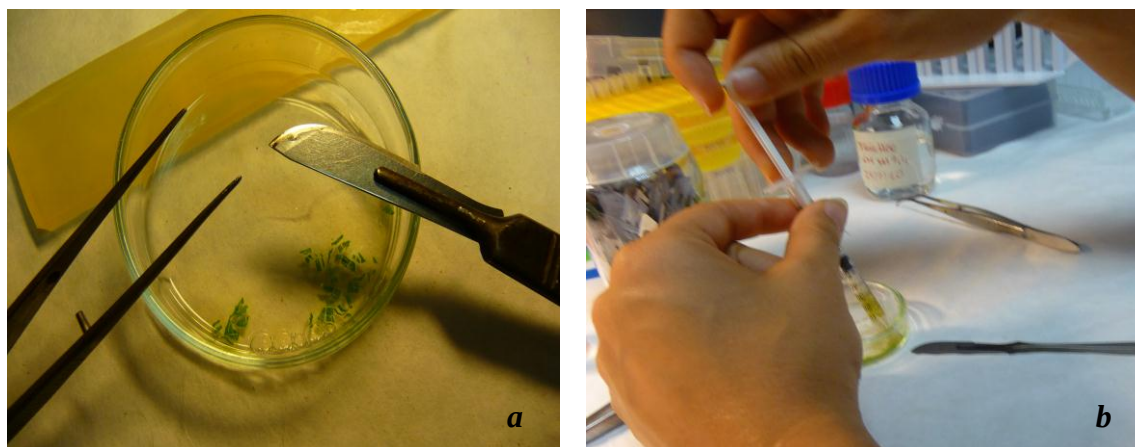


Fig. 2.2.1 – a. Tecnica “Chopping” per la triturazione dei campioni fogliari e *b.* aspirazione con filtro del preparato.

– Analisi al citometro: Le analisi citofluorimetriche sono state effettuate con un citofluorimetro FACS Vantage SE della Becton Dickinson (La Jolla, California, USA) equipaggiato con un laser ad Argon Innova 90/5 UV con emissione a 353+361nm e 200 mW per il DAPI ed a 514nm e 200 mW per il PI (*Fig. 2.2.2*). La fluorescenza è stata raccolta attraverso filtri passa-banda specifici per PI (BP 620/30).

È stato utilizzato un *nozzle* in ceramica da 70 μm e come tampone di trascinamento (“sheath fluid”) una soluzione KCl 25 mM in H_2O filtro sterilizzato a 0.22 μm .

L’allineamento dello strumento è stato effettuato utilizzando nuclei fissati estratti da eritrociti di pollo, conservati a -20°C in etanolo 70% e colorati come i campioni. Lo strumento è stato considerato ben calibrato per le analisi quando, per i CRBC (chicken red blood cells), il coefficiente di variazione (CV) dell’intensità di fluorescenza del picco era calcolata tra 2.5% e 3%. I segnali ottenuti dai campioni sono stati acquisiti e analizzati tramite il software di gestione del FACS Vantage CellQUEST Pro ver. 4.1 (Becton Dickinson, USA) per computer Macintosh.

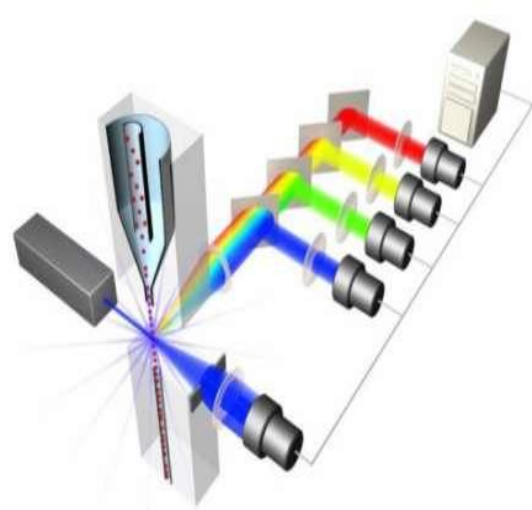


Fig. 2.2.2 – Esempio di Citometro a flusso.

c) Citogenetica

– Pretrattamenti alle radici: Piccole plantule, semi germinati o brevi radici in attiva crescita, sono stati utilizzati in prove di sincronizzazione del ciclo cellulare mediante l'utilizzo di vari inibitori del fuso mitotico quali: amiprofos-metile (APM), 8-idrossichinolina (8HQ), orizalina, α -bromonaphthalene, colchicina, paradichlorobenzene (PPB) e acqua e ghiaccio (0°C). Per alcuni inibitori sono state saggiare differenti concentrazioni e/o diverse durate del trattamento.

Nel trattamento APM, i semi germinati o piccole plantule di cardo e carciofo sono stati immersi, con aereazione forzata, in una soluzione salina (soluzione Hoagland Gamborg 1975) contenente diverse concentrazioni di APM (2,5 μ M, 12 μ M, 32 μ M e 64 μ M), quindi sono stati posti in incubatore a 27°C per 5 ore. Il trattamento a più bassa concentrazione è stato protratto fino a 18 ore. Dopo l'incubazione in APM, i semi sono stati risciacquati con acqua e immersi in essa con ghiaccio, a 4°C, durante tutta la notte (Fig. 2.2.3).

Nel trattamento con 8HQ, radici in attiva crescita sono state tagliate a una lunghezza di 0,5-1 cm e immerse per 3 o 5 ore, a temperatura ambiente (t.a.), in una soluzione 0,002M di 8HQ.

In alternativa le radici sono state immerse in una soluzione satura di α -bromonaphthalene per 2, 4 e 5 ore, a t.a., risciacquate in acqua e lasciate in acqua e ghiaccio a 4°C per tutta la notte (Singh, 2002).

Un ulteriore trattamento è consistito nell'immersione delle radici in una soluzione 30 μM di orizalina per 20 ore a 4°C oppure in acqua e ghiaccio per 18-24 h sempre a 4°C.



Fig. 2.2.3 –a) Trattamento dei semi germinati in APM con aeratore e b) trattamento in ghiaccio delle giovani radici e piantine.

È stata utilizzata anche una soluzione allo 0,5% di colchicina nella quale sono state immerse le radici per 1 o 2 ore a temperatura ambiente.

Infine è stato testato l'effetto di una soluzione 0,1M di paradichlorobenzene (PBB). Il PBB è stato sciolto in acqua lasciando la soluzione in agitazione per una notte a 60°C; una volta raffreddata a temperatura ambiente, nella soluzione sono state immerse le radici per circa 2 ore.

I diversi trattamenti effettuati sono sintetizzati in tabella (*Tab. 2.2.2*)

Tab. 2.2.2 – Pre-trattamenti apici radicali per incremento metafasi mitotiche

AGENTE INIBITORE	CONCENTRAZIONI TESTATE	DURATA DEL TRATTAMENTO	TEMPERATURA
APM	2,5 μM , 12 μM , 32 μM e 64 μM	5 o 18 h	27°C
8HQ	2mM	3 o 5 h	Temperatura ambiente (t.a.)
α -bromonaphthalene	soluzione satura	2,4,o 5 h	(t.a.)
Orizalina	30 μM	20 h	4°C
Paradiclorobenzene	0,1M	2 h	t.a.
Acqua e ghiaccio		24 h	4°C

– Stoccaggio degli apici radicali: Tutti le radici, indipendentemente dal pre-trattamento utilizzato, sono state fissate in etanolo e acido acetico glaciale (rapporto 3:1) (soluzione di Carnoy) e conservate a -20°C per almeno 16 ore, prima di essere utilizzate per la preparazione dei preparati microscopici. È stato fissato in Carnoy anche un campione di controllo non trattato.

– Preparazione dei vetrini: Due diverse metodologie sono state usate per la preparazione dei preparati microscopici. Il primo metodo, sviluppato da Andras *et al.* (1999), e denominato "*Drop spreading*" è stato applicato con qualche piccola modifica, come descritto da Giorgi *et al.* (2012). In breve sono state poste 20-30 radici su un piccolo setaccio di nylon (200 mesh inn), sciacquate inizialmente in acqua corrente e successivamente, per un secondo lavaggio, in acqua distillata. Sono stati quindi asportati gli apici radicali e trasferiti in una capsula di Petri di 5 cm di diametro. Successivamente all'incubazione in HCl 1M a 37°C per 20 min, gli apici sono stati neutralizzati in un tampone TE (10 mM Tris $\pm$ HCl, 1 mM EDTA a pH 8,0), incubati in una miscela enzimatica contenente 4% (w/v) cellulasi Onozuka R10 e 1% (w/v) Y23 pectolyase in tampone citrato (0,01 M acido citrico, 0,01 M citrato di sodio a pH 4,6) e delicatamente sminuzzati con un'asta di ottone. Quindi, dopo l'aggiunta di un'ulteriore quantità di soluzione enzimatica, il preparato è stato incubato per 60 min in una camera umida a 37°C. L'incubazione è stata interrotta mediante diluizione con acqua distillata e il materiale è stato trasferito in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml. Dopo una centrifugazione a 300g per 10 min, il supernatante è stato scartato mentre il pellet è stato risospeso in acqua distillata e centrifugato nuovamente nelle stesse condizioni. Il nuovo pellet è stato risospeso in una piccola quantità di acqua distillata addizionata con una soluzione di Carnoy modificata, contenente metanolo e acido acetico glaciale [rapporto 4:1(v:v)] ed è stato effettuato un ulteriore ciclo di centrifugazione. Infine, il pellet è stato risospeso in 40-50 μ l di Carnoy modificato e piccole aliquote da 8-10 μ l della sospensione risultante sono state lasciate cadere da un'altezza di 10 ± 15 cm su singoli vetrini da microscopio, lasciati poi essiccare all'aria e conservati (fino a 4 settimane a 4°C), in scatole di plastica a tenuta d'aria.

La seconda metodologia utilizzata è stata descritta da Schwarzacher e Heslop - Harrison (2000) e applicata con leggere modifiche. Brevemente, dopo la fissazione in Carnoy, gli apici radicali sono stati digeriti per 50-60 minuti a 37°C in una miscela enzimatica contenente 9% (w/v) di pectinasi (0.15Ug⁻¹SERVA) e 16% di cellulasi (0.8Ug⁻¹SERVA) in un tampone composto da 40% acido citrico 10mM e 60% Tri-

sodio-citrato 10mM pH 4.8. L'apice è stato poi sminuzzato in una goccia di acido acetico al 45% e schiacciato utilizzando un vetrino copri-oggetto. Dopo congelamento dei vetrini in azoto liquido, i copri-oggetto sono stati rimossi e i vetrini lasciati essiccare all'aria. Alcuni dei vetrini preparati con questa procedura, sono stati sottoposti all'azione dell'RNasi ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ in 2XSSC: 300mM cloruro di sodio, 0,3mM citrato trisodico) per 1 ora a 37°C e/o all'azione della pepsina ($1-10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ in 10mM HCl) per 10-15 minuti a 37°C , allo scopo rispettivamente di degradare l'RNA e rimuovere il citoplasma cellulare.

– Colorazione dei cromosomi: Per l'analisi morfologica dei cromosomi, sono state utilizzate due diverse modalità di colorazione del DNA: colorazione con 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) alla concentrazione finale di $2 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$ in tampone Mc Ilvaine (Acido citrico 9mM, Na_2HPO_4 80mM, MgCl_2 2.5mM pH7) secondo Schwarzscher e Heslop Harrison (2000) o, in alternativa, colorazione con reattivo di Schiff attraverso la reazione Feulgen (Kiernan 1999) (Fig. 2.2.4).

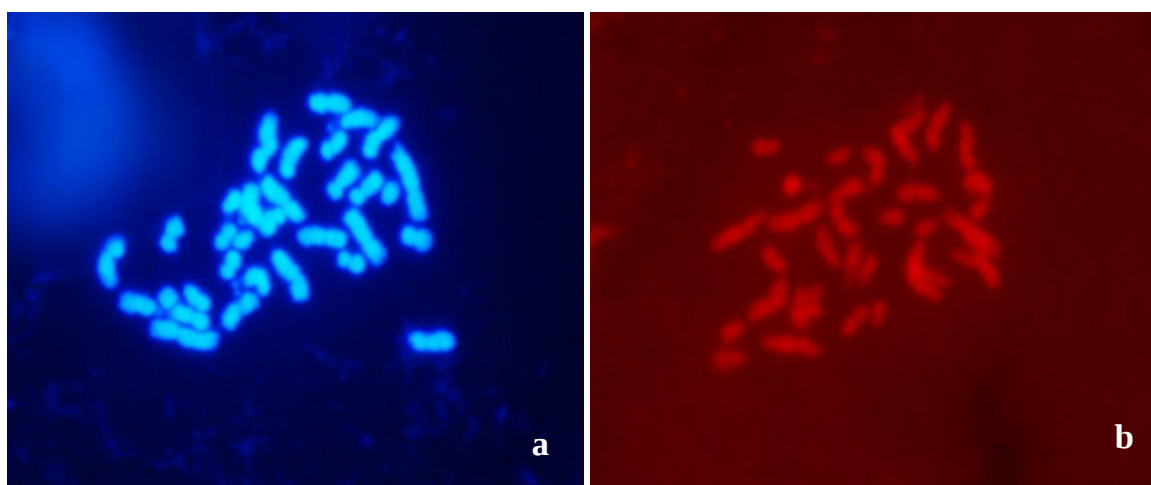


Fig. 2.2.4 – a) Tecnica colorazione DAPI e b) tecnica Feulgen.

d) Ibridazione *in situ* FISH

– Sonde utilizzate: Brevi oligonucleotidi sintetici, a singolo filamento, sintetizzati e marcati con molecole fluorescenti (FITC o Cy3), da Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germania), sono stati utilizzati come sonde negli esperimenti d'ibridazione *in situ*. La loro sequenza è riportata in tabella (Tab. 2.2.3). Inoltre è stato utilizzato come sonda anche il plasmide pTa71 contenente i geni ribosomali 18S-5.8S-26S isolati da *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedbrook, 1979) e marcati con Cy3-dUTP

mediante “*nick-translation*”, utilizzando il kit Nick Translation Mix, Roche e seguendo le istruzioni del produttore.

Tab. 2.2.3 –Elenco oligonucleotidi usati come sonde.

SONDE UTILIZZATE
(AG) ₆ – (AAT) ₇ – (GAA) ₇ – (TTAGGG) ₅ – (AG) ₁₂ – (GACA) ₄ – (AG) ₉
(CAT) ₅ – (ATT) ₈ – (AGG) ₅ – (GA) ₁₀ – (CA) ₁₀ – (AAC) ₅ – (AT) ₇ – (ATC) ₅

– Metodi FISH: L’ibridazione *in situ* su cromosomi di cardo e carciofo è stata condotta utilizzando due diverse procedure in base alla tipologia di sonda impiegata.

La prima, descritta da Andras (*et al.* 1999) è stata applicata, con importanti modifiche, utilizzando gli oligonucleotidi sintetici. Il DNA dei preparati microscopici, ottenuti mediante il metodo “*drop spreading*” descritto in precedenza, è stato denaturato a t.a. per 5 min in una soluzione alcolica al 70% portata a pH 13 mediante aggiunta di NaOH 4N. Le metafasi sono state quindi sottoposte ad un ciclo di disidratazione attraverso immersione dei vetrini in una soluzione di etanolo al 70, 85 e 100%, per 2 minuti ciascuna. Dopo essere stati lasciati asciugare all’aria, su ciascun vetrino sono stati distribuiti 60 µl della miscela d’ibridazione costituita esclusivamente da 100-200 ng di oligonucleotide, diluiti in 2XSSC. L’ibridazione è avvenuta per 1 ora a t.a., ha fatto seguito un lavaggio veloce per 10 min in 4XSSC contenente 0,2% di Tween20 ed infine i campioni sono stati colorati con DAPI , 2 µg ml⁻¹ in tampone Mc Ilvaine (Acido citrico 9mM, Na₂HPO₄ 80mM, MgCl₂ 2.5mM pH7) e montati con una soluzione “antifade” (che ne aumenta la fluorescenza).

La seconda procedura, usata nell’ibridazione con la sonda pTa71 è quella riportata da Schwarzacher e Heslop Harrison (2000). La miscela d’ibridazione, 40 µl per vetrino, è stata preparata aggiungendo 50% (v/v) di formammide, 10% (w/v) di solfato di destrano, 10% (v/v) di 20xSSC e 120-160 ng di sonda per vetrino. Dopo aver distribuito la miscela sui vetrini, questi sono stati posti in un ciclizzatore termico e sottoposti al seguente ciclo di temperature allo scopo di indurre la denaturazione del DNA: 5’ a 75°C, 2’ a 55°C, 30’’ a 50°C, 1’ a 45°C, 2’ a 42°C, 5’ a 40°C e 5’ a 38°C.

L’ibridazione è stata condotta a 37°C per tutta la notte (minimo 6 ore). Al termine i preparati sono stati sottoposti alla seguente serie di lavaggi:

- 1x5' in 2XSSC a 42°C;
- 2x5' in 20% formammide in 0,1xSSC a 42°C;
- 2x5' in 2XSSC a 42°C;
- 2X5' in 2xSSC a t.a.;
- 1x5' in 4XSSC/0,2% Tween20 a t.a..

Infine i campioni sono stati colorati con DAPI e montati con “antifade”

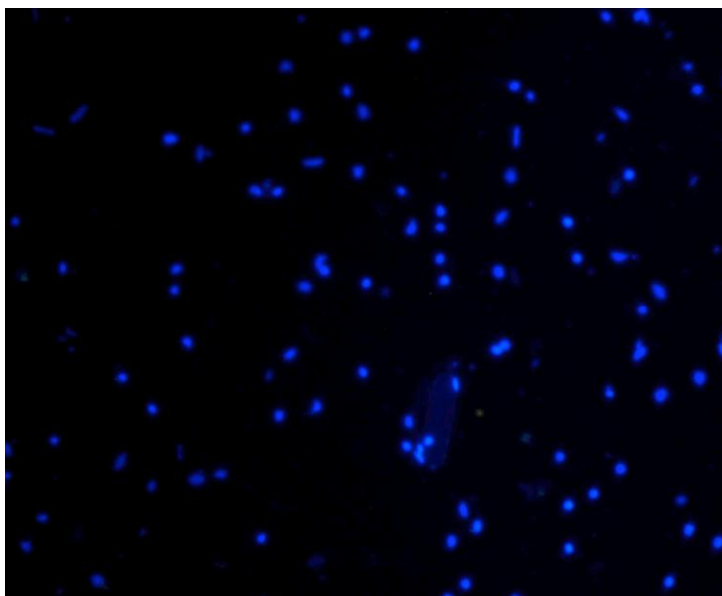
– Microscopia ed analisi delle immagini: I vetrini ibridati sono stati osservati con un microscopio Eclipse TE2000-S rovesciato, dotato di una lampada HB0100 W, un piano Apooil objective 100X ed una apposito set di filtri per DAPI, fluoresceina e fluorescenza Cy3. Le immagini ottenute utilizzando il set di filtri, sono state catturate e digitalizzate utilizzando una fotocamera DXM1200F e il software NIS AR 3.1 (Nikon Instruments SpA, Firenze, Italia). Il passaggio successivo è consistito nel sovrapporre le diverse immagini con fluorescenza diversa; la colorazione è stata ottimizzata modificando il contrasto e ottimizzando la colorazione di base, utilizzando il software gratuito ImageJ v1.46 ([rsbweb.nih.gov / IJ / index.html](http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html)).

Sono stati quindi generati gli ideogrammi di carciofo e cardo utilizzando il plugin di ImageJ Chías IV [36]. La morfologia dei cromosomi: lunghezza assoluta e rapporto bracci, è stata determinata utilizzando invece il plugin di ImageJ LEVAN (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/levan/levan.html>). L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il programma di statistica SPSS versione 15. È stata sviluppata l'analisi univariata con cui è stata determinata la media e il relativo errore standard della media per le lunghezze di ogni cromosoma.

2.2.3 RISULTATI

a) Citometria a flusso

Le varie tecniche di estrazione dei nuclei hanno dato degli effetti diversi nel carciofo e nel cardo, ma soltanto la fissazione di foglie giovani o piccole radici per 20 min con 3,5% di formaldeide in Tris ha permesso di ottenere un isolamento con una concentrazione di nuclei tale da essere analizzata.



La soluzione, prima di essere analizzata, è stata osservata al microscopio per verificare che la concentrazione di nuclei fosse abbastanza elevata e tale da poter essere analizzata al citometro e per valutare la presenza di eventuali residui inerti che potrebbero disturbare l'analisi (Fig. 2.2.5).

Fig. 2.2.5 – Nuclei di Carciofo isolati da foglie a seguito della fissazione in formaldeide ad un ingrandimento 40x (dimensioni nucleo 5µm ca).

La tecnica di frantumazione del materiale vegetale attraverso un frullatore ad una velocità di circa 20.000 rpm per 15 s ha prodotto risultati migliori rispetto allo sminuzzamento con bisturi. Il filtro in rete di nylon da 36µm di diametro/pori è risultato il più indicato per la preparazione della sospensione.

La citofluorimetria a flusso analizza l'intensità di fluorescenza relativa, quindi il contenuto di DNA di un determinato campione può essere stimato solo dopo la comparazione con la fluorescenza emessa da una particella a quantitativo di DNA noto, ossia di un campione standard di riferimento. Il campione di riferimento utilizzato nei nostri esperimenti è stato *Zea mais* cultivar CE-777 il cui contenuto di DNA è pari a 5,43 pg (2C).

L'analisi di particelle fluorescenti al citofluorimetro genera una rappresentazione grafica delle intensità di fluorescenza emesse con due tipici formati, identificati come istogrammi monoparametrici della singola distribuzione di fluorescenza o della doppia combinazione di segnali relativi sia alla fluorescenza emessa che alla grandezza relativa delle particelle analizzate (dot plot, o analisi biparametrica). Nel caso dell'istogramma, i singoli picchi identificano le particelle maggiormente rappresentate nel campione, e quindi per i nuclei, quelli con quantità di DNA (e.g. fluorescenza) simile e distribuita secondo valori dipendenti dalla fasi del ciclo cellulare.

Nella *figura 2.2.6* è presentata la valutazione del contenuto di DNA in una sospensione di nuclei di cardo, carciofo e granturco (standard interno): sono visibili le

tre diverse regioni corrispondenti ai diversi tipi di nuclei (in verde i nuclei di cardo, in rosa quelli di carciofo, in blu quelli di mais).

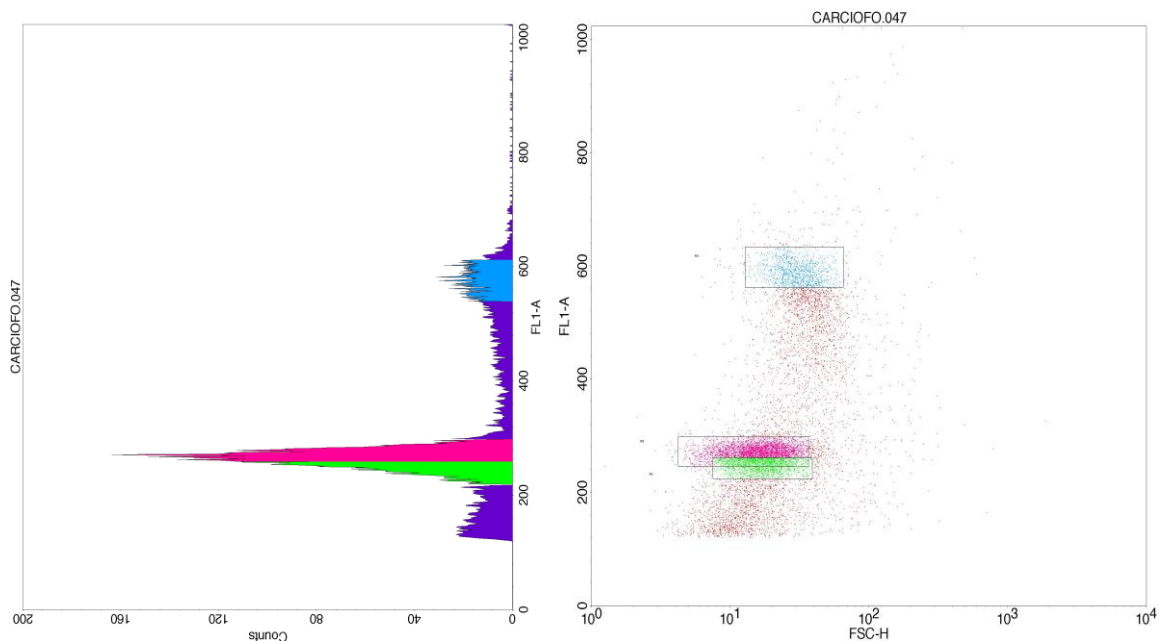


Fig. 2.2.6 – A sinistra, istogramma del contenuto di DNA di un campione costituito da nuclei in sospensione di carciofo, cardo e granturco: le zone colorate si riferiscono ai nuclei delle diverse specie. Nella zona verde sono concentrati nuclei di cardo, nella rossa nuclei di carciofo e nell'azzurra nuclei di mais. A destra, analisi biparametrica dot plot che evidenzia la distribuzione dei diversi nuclei di cardo, carciofo e mais sia in base alla fluorescenza del DNA che alla dimensioni del nucleo.

Nella *tabella 2.2.3* viene indicato il diverso quantitativo di DNA del cardo, carciofo ottenuti applicando la seguente formula:

Contenuto 2C del DNA del campione =

[valore medio del picco di fluorescenza del cardo / valore medio del picco di fluorescenza dello standard] x contenuto 2C del DNA dello standard (pg di DNA)

Contenuto 2C di Carciofo: $(269.91/590,88) \times 5.43 \text{ pg} = \mathbf{2.48 \text{ pg.}}$

Contenuto 2C di Cardo: $(249.19/590,88) \times 5.43 \text{ pg} = \mathbf{2.29 \text{ pg.}}$

Il contenuto di DNA di carciofo determinato nel presente lavoro risulta leggermente superiore rispetto ai dati riportati in precedenti lavori (Dominique., 1993; Khaldi *et al.* 2014,) nei quali sono state utilizzate sempre tecniche di citometria a flusso (Obermayer e Greilhuber, 2005; Eliam *et al.*, 2007) e dove viene sottolineato come il contenuto di DNA sia diverso da quello precedentemente ottenuto (Cremonini *et al.* 1994) attraverso le tecniche densitometriche dopo colorazione Feulgen. Anche riguardo al cardo, è stato misurato nelle nostre varietà un contenuto di DNA leggermente maggiore rispetto a quanto riportato da Khaldi (*et al.* 2014) in popolazioni di cardo selvatiche o in varietà coltivate diffuse in Tunisia.

Nella *tabella 2.2.3* vengono riepilogati il numero degli eventi che indicano la concentrazione dei nuclei all'interno della soluzione, la media dei valori relativi alla fluorescenza rilevata dal laser e infine il quantitativo di DNA nucleare stimato per il cardo e carciofo (2C).

Tab. 2.2.3 – Stima del quantitativo di DNA.

	ANALISI CITOMETRIA A FLUSSO		
Specie	Eventi	Media valori fluorescenza	Contenuto di 2C DNA (pg DNA)
Standard			
<i>Zea mays</i> – cultivar CE-777	1987	590,88	5,43
Cardo			
Sardo – Bianco avorio	4539	249,19	<u>2,29</u>
Carciofo			
Romolo - Istar	1067	269,91	<u>2,48</u>

b) Citogenetica: ottimizzazione protocolli

– Pretrattamenti alle radici: La mancanza in letteratura di informazioni relative all'analisi citogenetica del genere *Cynara* ha richiesto l'ottimizzazione di tutti i protocolli per l'allestimento dei preparati microscopici. Sono state espletate numerose prove al fine di valutare l'effetto di vari agenti inibitori del fuso mitotico sul ciclo cellulare nei meristemi radicali di cardo e carciofo; con particolare riferimento all'incremento del numero di cellule in metafase e alla morfologia dei cromosomi.

L'uso di sostanze quali l'amiprofos-metile (APM), l' α -bromonaphthalene, la colchicina e il paradichlorobenzene (PPB), nelle concentrazioni e nei tempi testati, non hanno dimostrato un effetto significativo sull'innalzamento dell'indice mitotico rispetto al controllo non trattato.

Risultati migliori, sebbene non eclatanti, sono stati ottenuti nei trattamenti in acqua e ghiaccio, in 8-idrossichinolina e in orizalina e, tra questi, la percentuale massima di cellule in mitosi pari al 20% è stata raggiunta con l'incubazione in orizalina 30 μ M per 20 h a 4°C (*Fig. 2.2.7*).

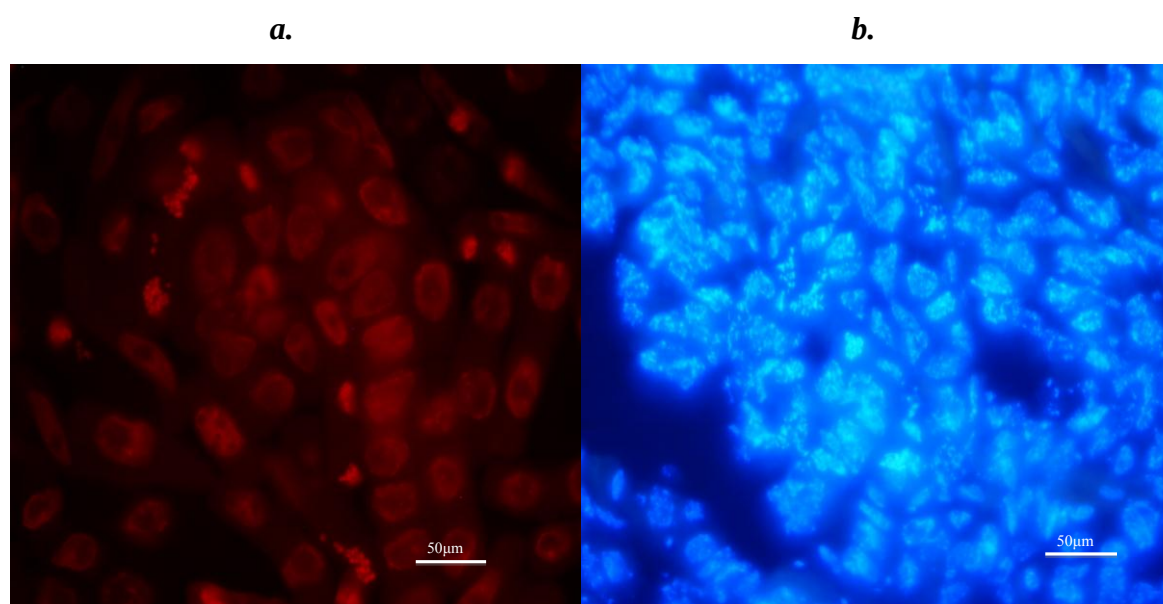


Fig. 2.2.7 – Metafasi di cardo ottenute da apici trattati in: **a.** orizalina (DNA colorato con metodo Feulgen) **b.** ghiaccio (colorazione DNA con DAPI).

Il trattamento in 8-idrossichinolina si è dimostrato il più efficace nella conservazione e definizione della morfologia dei cromosomi, come riportato anche in letteratura (Singh 2003); i cromosomi non sono apparsi eccessivamente condensati ed è stato possibile individuare la posizione del centromero lungo il cromosoma. Al contrario, il trattamento in acqua e ghiaccio ha indotto una notevole condensazione dei cromosomi che ha impedito una chiara definizione della loro morfologia (*Fig. 2.2.8*).

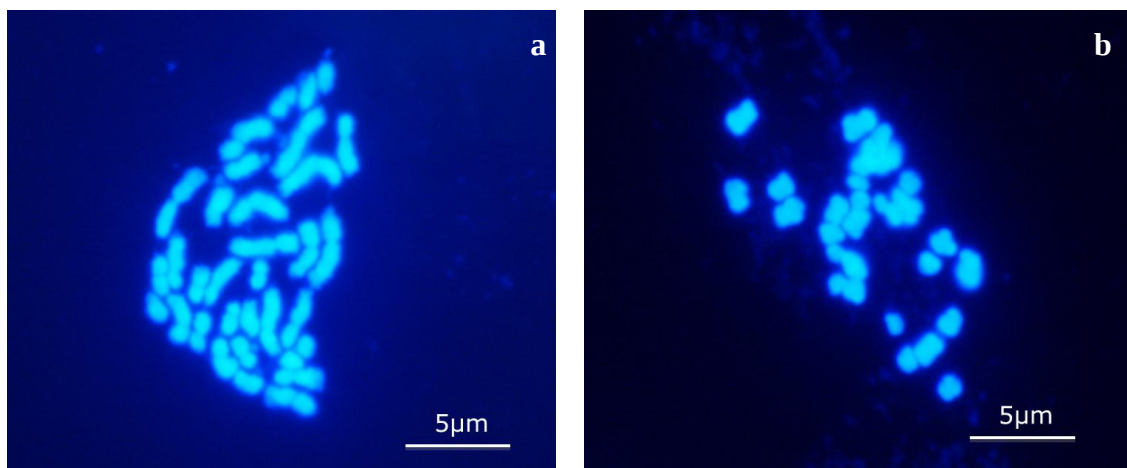


Fig. 2.2.8 – *a.* Metafasi di carciofo ottenute da apici trattati con 8-idrossichinolina in *a.* e con acqua e ghiaccio in *b.*

– Preparazione dei vetrini: Il metodo chiamato "*drop spreading*", sviluppato da Andras *et al.* (1999) e applicato con qualche piccola modifica come descritto da Giorgi *et al.* (2012), ha consentito di ottenere i risultati migliori rispetto al più diffuso metodo riportato da Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), in quanto la miscela enzimatica ha prodotto una buona digestione dei tessuti dell'apice radicale e le modalità di distribuzione delle cellule sul vetrino hanno determinato una buona apertura delle metafasi e una ridotta presenza di citoplasma.

– Metodi FISH: In base alla tipologia di sonda impiegata, sono stati utilizzati due diversi metodi FISH con il conseguimento di risultati interessanti (vedi paragrafi successivi) con entrambe le procedure. L'uso degli oligonucleotidi come sonda ha consentito una notevole semplificazione del metodo descritto da Andras (*et al.* 1998) con particolare riferimento alla durata dell'ibridazione, ridotta da 18 h ad 1 h, e alla riduzione del numero di lavaggi post ibridazione da 2 ad 1, inoltre in assenza di formammide.

– Analisi morfologica e definizione del cariotipo di cardo e carciofo: L'analisi morfologica delle metafasi di cardo e carciofo, effettuata dopo l'acquisizione delle immagini al microscopio utilizzando i software citati in precedenza, ci ha permesso di definire per la prima volta il cariotipo di queste due specie. In particolare, in questa fase, è stato utilizzato il plugin di ImageJ Chías IV, software in grado di generare una sequenza ordinata di cromosomi, dal più grande al più piccolo. Tuttavia tale ordinamento di tipo automatico è attendibile solo in presenza di ottime metafasi, con cromosomi mediamente condensati e che non mostrano alcuna sovrapposizione,

una condizione piuttosto rara; pertanto dopo l'elaborazione automatica, si è reso necessario un lavoro meticoloso di osservazione e individuazione dei cromosomi omologhi per poi procedere al loro appaiamento manuale.

L'analisi FISH (descritta nei paragrafi successiva) è stata d'ausilio in questa fase di discriminazione e riconoscimento degli omologhi. Nelle *figure 2.2.10 a e b* sono rappresentate le 17 coppie ordinate di cromosomi omologhi, rispettivamente, di carciofo *a.* e cardo *b.*

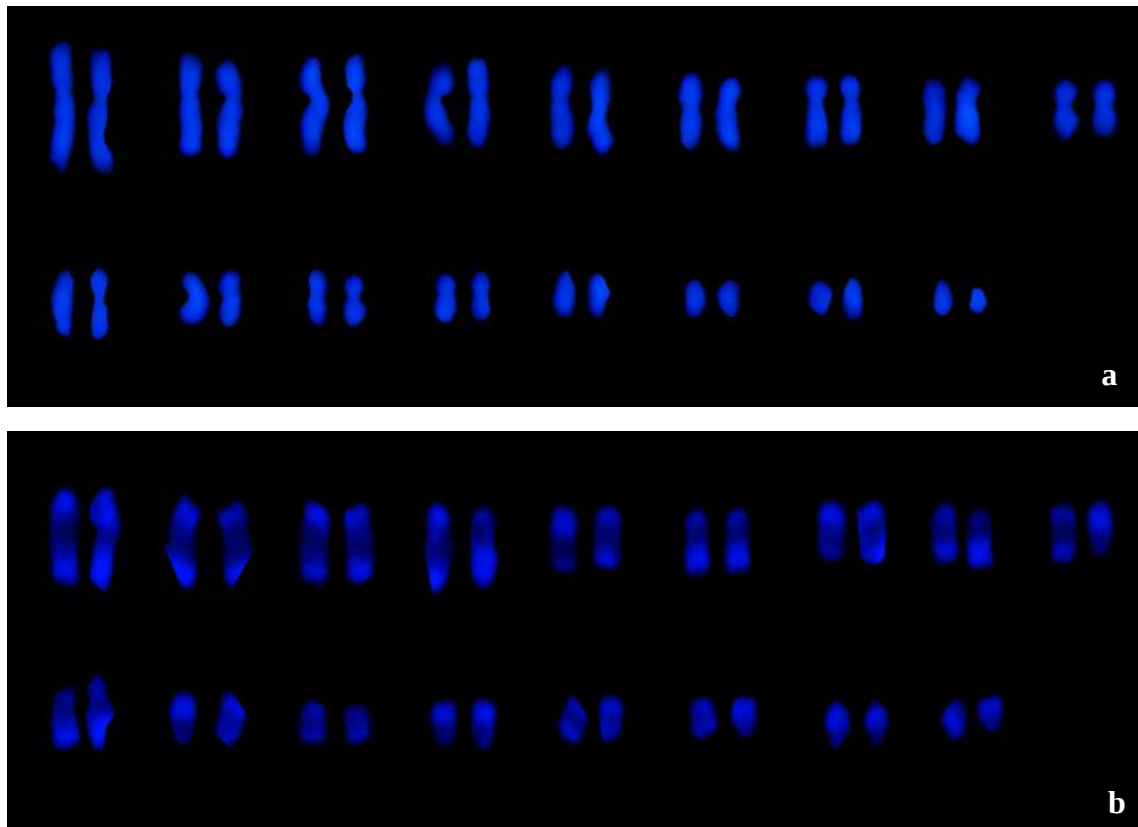
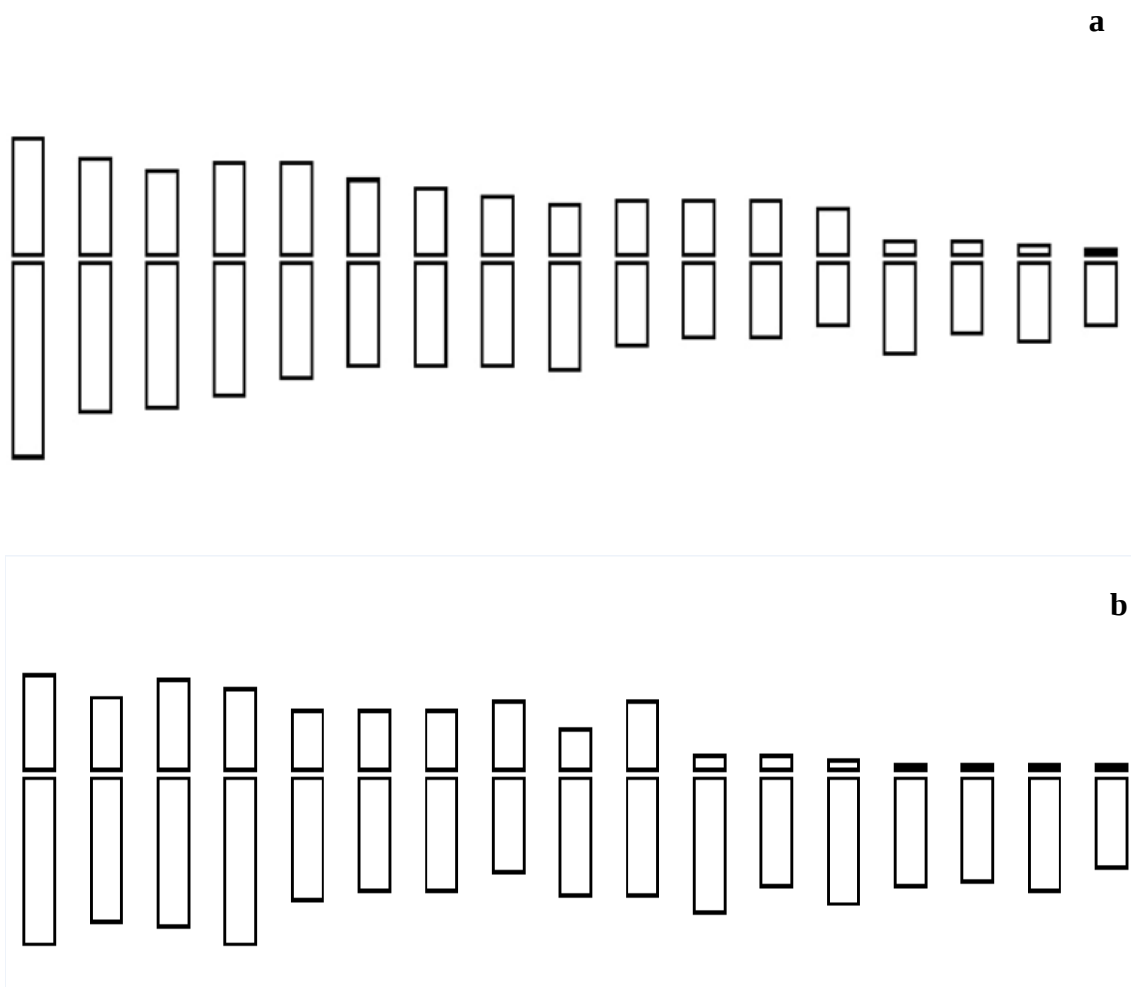


Fig. 2.2.10 – Sequenza ordinata e appaiamento a coppie di omologhi dei 34 cromosomi di carciofo *a* e di cardo *b.*

Nelle *figure 2.2.11 a e b*, invece, sono rappresentati gli ideogrammi che rappresentano i 17 cromosomi del complemento n, rispettivamente di carciofo *a.* e cardo *b.*



*Fig. 2.2.11 – Ideogrammi dei 17 cromosomi del complemento n di carciofo **a**. e di cardo **b**..*

La classificazione su base morfologica dei cromosomi di cardo e carciofo è stata effettuata attraverso la misurazione della lunghezza assoluta e del rapporto bracci dei singoli cromosomi rilevata in almeno 10 metafasi per ciascuna specie e utilizzando il plugin di ImageJ LEVAN (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/levan/levan.html>).

Nelle *Tabelle 2.2.4* e *2.2.5* sottostanti, sono riportati, la lunghezza totale, la lunghezza dei bracci e il rapporto tra i bracci per ciascuno dei 34 cromosomi delle due specie, dati che hanno consentito la loro suddivisione in classi e quindi la loro classificazione secondo i criteri riportati da Levan *et al.* 1964.

Tab. 2.2.4 – Classificazione morfologica dei cromosomi di carciofo.

Cromosoma	Totale ^a (μm)	Braccio (μm)		Rapporto ^b	Classificaz. ^c	Lunghezza (%)
		corto	lungo			
1	5,24 $\pm$ 0,082	2,07 $\pm$ 0,098	3,17 $\pm$ 0,096	1,63 $\pm$ 0,131	sm	5,22
2	5,02 $\pm$ 0,061	1,85 $\pm$ 0,095	3,18 $\pm$ 0,061	1,83 $\pm$ 0,013	sm	5,00
3	4,78 $\pm$ 0,038	1,67 $\pm$ 0,077	3,12 $\pm$ 0,070	1,99 $\pm$ 0,163	sm	4,76
4	4,65 $\pm$ 0,039	1,61 $\pm$ 0,077	3,04 $\pm$ 0,077	2,01 $\pm$ 0,159	sm	4,63
5	4,52 $\pm$ 0,039	1,61 $\pm$ 0,071	2,91 $\pm$ 0,070	1,90 $\pm$ 0,138	sm	4,50
6	4,33 $\pm$ 0,039	1,48 $\pm$ 0,060	2,85 $\pm$ 0,056	2,01 $\pm$ 0,122	sm	4,32
7	4,02 $\pm$ 0,049	1,50 $\pm$ 0,075	2,53 $\pm$ 0,090	1,82 $\pm$ 0,168	sm	4,01
8	3,87 $\pm$ 0,049	1,38 $\pm$ 0,076	2,51 $\pm$ 0,082	1,98 $\pm$ 0,162	sm	3,86
9	3,65 $\pm$ 0,035	1,38 $\pm$ 0,049	2,28 $\pm$ 0,039	1,68 $\pm$ 0,079	sm	3,64
10	3,48 $\pm$ 0,035	1,28 $\pm$ 0,053	2,18 $\pm$ 0,053	1,78 $\pm$ 0,112	sm	3,45
11	3,34 $\pm$ 0,035	1,17 $\pm$ 0,049	2,18 $\pm$ 0,050	1,93 $\pm$ 0,118	sm	3,33
12	3,23 $\pm$ 0,030	1,13 $\pm$ 0,033	2,10 $\pm$ 0,044	1,91 $\pm$ 0,093	sm	3,22
13	3,13 $\pm$ 0,027	1,04 $\pm$ 0,026	2,10 $\pm$ 0,037	2,05 $\pm$ 0,080	sm	3,12
14	3,02 $\pm$ 0,018	1,01 $\pm$ 0,027	2,01 $\pm$ 0,029	2,03 $\pm$ 0,098	sm	3,01
15	2,97 $\pm$ 0,016	1,04 $\pm$ 0,035	1,93 $\pm$ 0,036	1,91 $\pm$ 0,112	sm	2,96
16	2,90 $\pm$ 0,025	0,99 $\pm$ 0,031	1,90 $\pm$ 0,042	1,98 $\pm$ 0,113	sm	2,89
17	2,78 $\pm$ 0,026	0,94 $\pm$ 0,041	1,84 $\pm$ 0,053	2,05 $\pm$ 0,137	sm	2,77
18	2,70 $\pm$ 0,024	0,95 $\pm$ 0,040	1,75 $\pm$ 0,041	1,92 $\pm$ 0,126	sm	2,69
19	2,63 $\pm$ 0,025	0,87 $\pm$ 0,043	1,75 $\pm$ 0,052	2,12 $\pm$ 0,149	sm	2,62
20	2,55 $\pm$ 0,034	0,90 $\pm$ 0,042	1,65 $\pm$ 0,054	1,98 $\pm$ 0,182	sm	2,54
21	2,44 $\pm$ 0,033	0,90 $\pm$ 0,045	1,54 $\pm$ 0,049	1,91 $\pm$ 0,255	sm	2,43
22	2,38 $\pm$ 0,029	0,89 $\pm$ 0,024	1,47 $\pm$ 0,031	1,68 $\pm$ 0,073	sm	2,35
23	2,30 $\pm$ 0,025	0,83 $\pm$ 0,044	1,47 $\pm$ 0,047	1,92 $\pm$ 0,172	sm	2,29
24	2,23 $\pm$ 0,025	0,72 $\pm$ 0,054	1,51 $\pm$ 0,041	2,60 $\pm$ 0,448	sm	2,22
25	2,17 $\pm$ 0,021	0,72 $\pm$ 0,055	1,45 $\pm$ 0,054	2,47 $\pm$ 0,386	sm	2,16
26	2,01 $\pm$ 0,021	0,69 $\pm$ 0,054	1,32 $\pm$ 0,055	2,40 $\pm$ 0,413	sm	2,00
27	2,10 $\pm$ 0,024	0,64 $\pm$ 0,065	1,48 $\pm$ 0,058	3,48 $\pm$ 0,753	st	2,09
28	1,97 $\pm$ 0,025	0,54 $\pm$ 0,053	1,43 $\pm$ 0,050	3,67 $\pm$ 0,661	st	1,96
29	1,87 $\pm$ 0,255	0,53 $\pm$ 0,057	1,34 $\pm$ 0,060	3,38 $\pm$ 0,551	st	1,86
30	1,80 $\pm$ 0,027	0,39 $\pm$ 0,053	1,41 $\pm$ 0,043	5,38 $\pm$ 0,881	st	1,79
31	1,69 $\pm$ 0,027	0,45 $\pm$ 0,049	1,23 $\pm$ 0,050	3,68 $\pm$ 0,550	st	1,68
32	1,58 $\pm$ 0,039	0,34 $\pm$ 0,046	1,22 $\pm$ 0,048	5,48 $\pm$ 1,086	st	1,55
33	1,42 $\pm$ 0,046	0,25 $\pm$ 0,018	1,18 $\pm$ 0,048	5,39 $\pm$ 0,575	st	1,41
34	1,30 $\pm$ 0,060	0,24 $\pm$ 0,020	1,07 $\pm$ 0,050	4,91 $\pm$ 0,410	st	1,29
	100,32	-	-	-	-	99,62

^aValore medio delle coppie (μm).

^bRapporto bracci (long/short)

^cClassificazione: M – metacentrici; SM – submetacentrici; ST – subtelocentrici;

T – telocentrici; A – acrocentrici.

SE – Errore Standard.

Tab. 2.2.5 – Classificazione morfologica dei cromosomi di cardo.

Cromosoma	Totale ^a (μ m)	Braccio (μ m)		Rapporto ^b	Classificaz. ^c	Lunghezza (%)
		corto	lungo			
1	5,08 $\pm$ 0,096	1,79 $\pm$ 0,068	3,30 $\pm$ 0,082	1,90 $\pm$ 0,096	sm	5,08
2	4,79 $\pm$ 0,083	1,75 $\pm$ 0,083	3,04 $\pm$ 0,103	1,85 $\pm$ 0,157	sm	4,79
3	4,59 $\pm$ 0,070	1,67 $\pm$ 0,062	2,92 $\pm$ 0,073	1,81 $\pm$ 0,106	sm	4,59
4	4,38 $\pm$ 0,054	1,61 $\pm$ 0,057	2,77 $\pm$ 0,070	1,79 $\pm$ 0,140	sm	4,38
5	4,28 $\pm$ 0,051	1,55 $\pm$ 0,072	2,71 $\pm$ 0,069	1,85 $\pm$ 0,157	sm	4,28
6	4,10 $\pm$ 0,046	1,48 $\pm$ 0,038	2,63 $\pm$ 0,057	1,83 $\pm$ 0,072	sm	4,10
7	3,92 $\pm$ 0,036	1,38 $\pm$ 0,051	2,53 $\pm$ 0,038	1,89 $\pm$ 0,096	sm	3,92
8	3,63 $\pm$ 0,042	1,27 $\pm$ 0,068	2,37 $\pm$ 0,053	2,13 $\pm$ 0,314	sm	3,63
9	3,51 $\pm$ 0,044	1,31 $\pm$ 0,040	2,19 $\pm$ 0,048	1,71 $\pm$ 0,086	sm	3,51
10	3,38 $\pm$ 0,040	1,15 $\pm$ 0,032	2,23 $\pm$ 0,038	1,98 $\pm$ 0,076	sm	3,38
11	3,29 $\pm$ 0,041	1,18 $\pm$ 0,044	2,13 $\pm$ 0,053	1,88 $\pm$ 0,099	sm	3,29
12	3,21 $\pm$ 0,033	1,07 $\pm$ 0,057	2,13 $\pm$ 0,054	2,18 $\pm$ 0,211	sm	3,21
13	3,14 $\pm$ 0,033	1,10 $\pm$ 0,038	2,04 $\pm$ 0,050	1,91 $\pm$ 0,104	sm	3,14
14	3,05 $\pm$ 0,030	1,05 $\pm$ 0,039	1,99 $\pm$ 0,025	1,94 $\pm$ 0,080	sm	3,05
15	2,97 $\pm$ 0,023	1,03 $\pm$ 0,037	1,94 $\pm$ 0,038	1,94 $\pm$ 0,103	sm	2,97
16	2,90 $\pm$ 0,027	1,05 $\pm$ 0,039	1,88 $\pm$ 0,040	1,84 $\pm$ 0,103	sm	2,90
17	2,84 $\pm$ 0,031	0,98 $\pm$ 0,039	1,85 $\pm$ 0,040	1,95 $\pm$ 0,101	sm	2,84
18	2,78 $\pm$ 0,026	1,03 $\pm$ 0,043	1,72 $\pm$ 0,042	1,74 $\pm$ 0,102	sm	2,78
19	2,67 $\pm$ 0,029	0,94 $\pm$ 0,042	1,72 $\pm$ 0,055	1,92 $\pm$ 0,135	sm	2,67
20	2,59 $\pm$ 0,028	0,75 $\pm$ 0,083	1,84 $\pm$ 0,055	4,11 $\pm$ 1,310	sm	2,59
21	2,52 $\pm$ 0,031	0,80 $\pm$ 0,084	1,72 $\pm$ 0,079	4,01 $\pm$ 1,287	sm	2,52
22	2,45 $\pm$ 0,030	0,88 $\pm$ 0,058	1,59 $\pm$ 0,058	2,37 $\pm$ 0,513	sm	2,45
23	2,39 $\pm$ 0,034	0,77 $\pm$ 0,073	1,62 $\pm$ 0,085	3,11 $\pm$ 0,704	sm	2,39
24	2,34 $\pm$ 0,038	0,70 $\pm$ 0,085	1,63 $\pm$ 0,085	3,18 $\pm$ 0,611	sm	2,34
25	2,24 $\pm$ 0,030	0,55 $\pm$ 0,084	1,69 $\pm$ 0,081	4,98 $\pm$ 1,083	st	2,24
26	2,18 $\pm$ 0,031	0,45 $\pm$ 0,059	1,72 $\pm$ 0,059	5,34 $\pm$ 0,758	st	2,18
27	2,12 $\pm$ 0,034	0,50 $\pm$ 0,083	1,62 $\pm$ 0,084	5,55 $\pm$ 1,228	st	2,12
28	2,01 $\pm$ 0,028	0,38 $\pm$ 0,048	1,65 $\pm$ 0,045	6,71 $\pm$ 1,042	st	2,01
29	1,95 $\pm$ 0,030	0,44 $\pm$ 0,088	1,51 $\pm$ 0,080	6,78 $\pm$ 1,459	st	1,95
30	1,92 $\pm$ 0,035	0,25 $\pm$ 0,037	1,67 $\pm$ 0,048	9,30 $\pm$ 1,389	t	1,92
31	1,83 $\pm$ 0,027	0,23 $\pm$ 0,035	1,60 $\pm$ 0,042	9,97 $\pm$ 1,649	t	1,83
32	1,78 $\pm$ 0,039	0,28 $\pm$ 0,053	1,50 $\pm$ 0,083	11,12 $\pm$ 1,981	t	1,78
33	1,67 $\pm$ 0,037	0,24 $\pm$ 0,045	1,43 $\pm$ 0,048	8,32 $\pm$ 1,013	t	1,67
34	1,58 $\pm$ 0,035	0,24 $\pm$ 0,039	1,32 $\pm$ 0,047	8,61 $\pm$ 1,428	t	1,58
	100,00	-	-	-	-	100,00

^aValore medio delle coppie (μ m).

^bRapporto bracci (long/short)

^cClassificazione: M – metacentrici; SM – submetacentrici; ST – subtelocentrici;

T – telocentrici; A – acrocentrici.

SE – Errore Standard.

Dall'analisi delle tabelle si evince che è preponderante, in entrambe le specie, la presenza di cromosomi di tipo sub-metacentrico, ovvero con centromero in posizione submediana. I restanti cromosomi, per lo più di piccole dimensioni, sono classificati

come sub-telocentrici in carciofo e telocentrici in cardo, ad indicare la preponderanza, nelle dimensioni, di un braccio rispetto all'altro fino alla quasi totale scomparsa di uno dei due bracci nei cromosomi telocentrici.

c) Ibridazione *in situ* FISH

L'elevata percentuale nei genomi vegetali di sequenze ripetute quali satelliti, microsatelliti, elementi trasponibili, etc. e la loro diversa distribuzione in termini di localizzazione e abbondanza relativa (numero di ripetizioni) a livello cromosomico, rende queste sequenze particolarmente utili per la caratterizzazione e discriminazione dei singoli cromosomi che compongono il complemento di una specie.

Per questo, brevi oligonucleotidi sintetici composti da di o tri-nucleotidi ripetuti sono stati utilizzati come sonde in esperimenti FISH allo scopo di analizzare la distribuzione dei corrispondenti microsatelliti nel genoma di cardo e carciofo e caratterizzare i cromosomi che li compongono. Inoltre la sequenza pTa71, corrispondente a rDNA è stata usata al fine di individuare le regioni NOR e localizzare i geni ribosomali.

Le sonde che hanno prodotto risultati interessanti, generando segnali d'ibridazione chiari e ripetibili sui singoli cromosomi, sono: $(GAA)_7$ – $(TTAGGG)_5$ – $(ATT)_8$ – $(GA)_{10}$ – $(CA)_{10}$.

Dalle immagini relative alla FISH sotto riportate, è possibile osservare la tipologia di marcatura che alcune delle sonde hanno generato sulle diverse metafasi.

In *figura 2.2.12* sono rappresentate le metafasi di cardo e carciofo ibridate con la sequenza $(GAA)_7$. Evidenti segnali d'ibridazione sono presenti in entrambe le specie, nelle quali la $(GAA)_7$ genera patterns d'ibridazione simili tra cardo e carciofo, ma differenti per posizione e intensità del segnale tra le diverse coppie di cromosomi. Tale polimorfismo consente una più facile discriminazione tra cromosomi similari, in dimensione e morfologia, facilitando l'appaiamento degli omologhi.

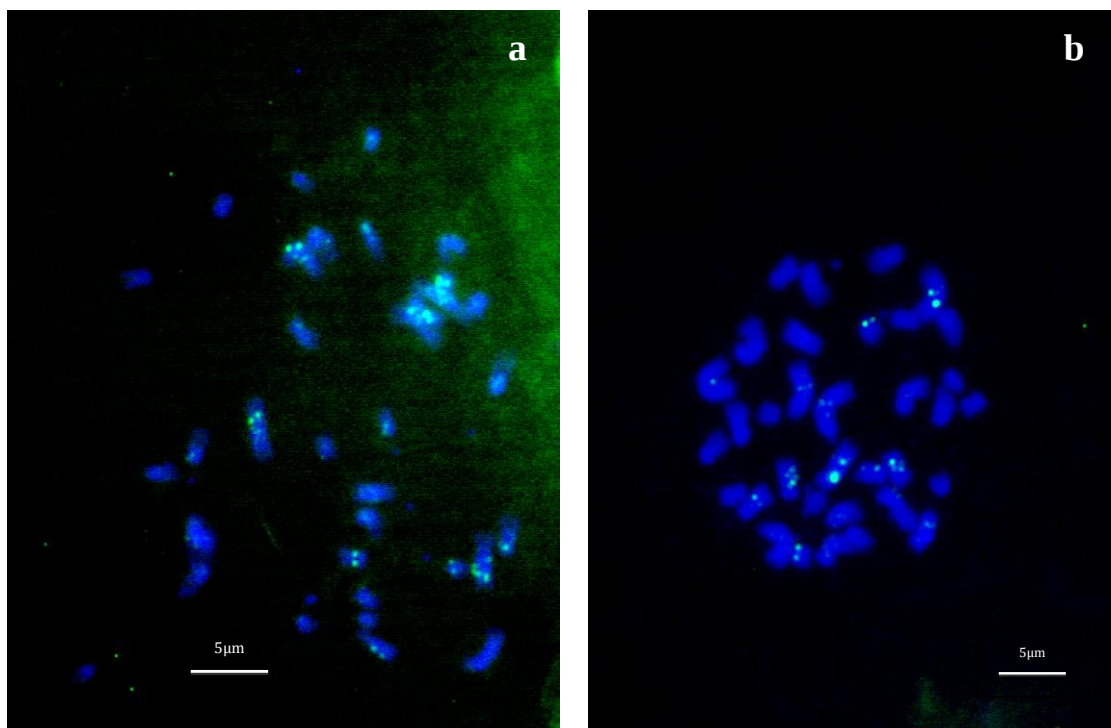


Fig. 2.2.12 – Ibridazione FISH con la sonda $(GAA)_7$, su cromosomi di cardo **a**. e di carciofo **b** colorati con DAPI.

Un esempio di marcatura specifica e di ordinamento dei cromosomi in funzione della marcatura FISH è riportato in *figura 2.2.13*.

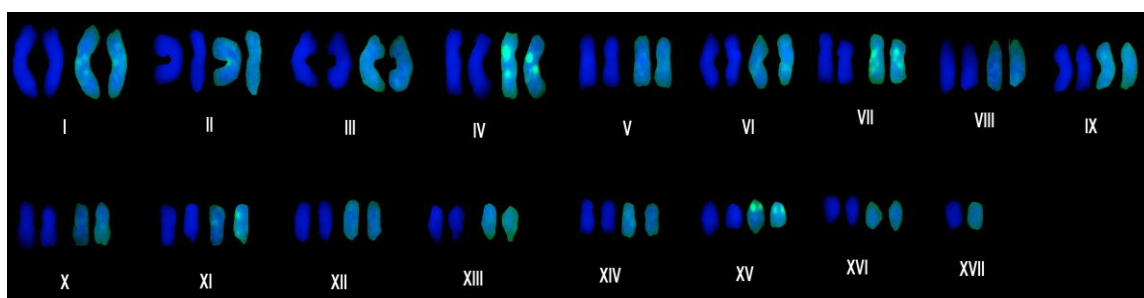


Fig. 2.2.13 – Ordinamento dei cromosomi di carciofo in funzione della grandezza, morfologia e della marcatura FISH con la sonda $(GAA)_7$.

L'analisi FISH utilizzando la sequenza $(TTAGGG)_5$ mostra, come atteso, segnali d'ibridazione su tutti i cromosomi delle specie analizzate in corrispondenza dei telomeri (*figura 2.2.14 a*). Si tratta infatti di una sequenza altamente conservata presente con un elevato numero di copie nei telomeri degli organismi eucarioti ed è stata utilizzata nel presente studio allo scopo di meglio definire la morfologia e valutare l'interesse dei diversi cromosomi. Analoga localizzazione, nella regione telomerica è stata osservata

per le sequenze (GA)₁₀ (figura 2.2.14 b), e (CA)₁₀ (dati non mostrati) che, tuttavia, appaiono più abbondanti rispetto alla sequenza (TTAGGG)₅ e distribuite su una zona più estesa del cromosoma, in entrambe le specie.

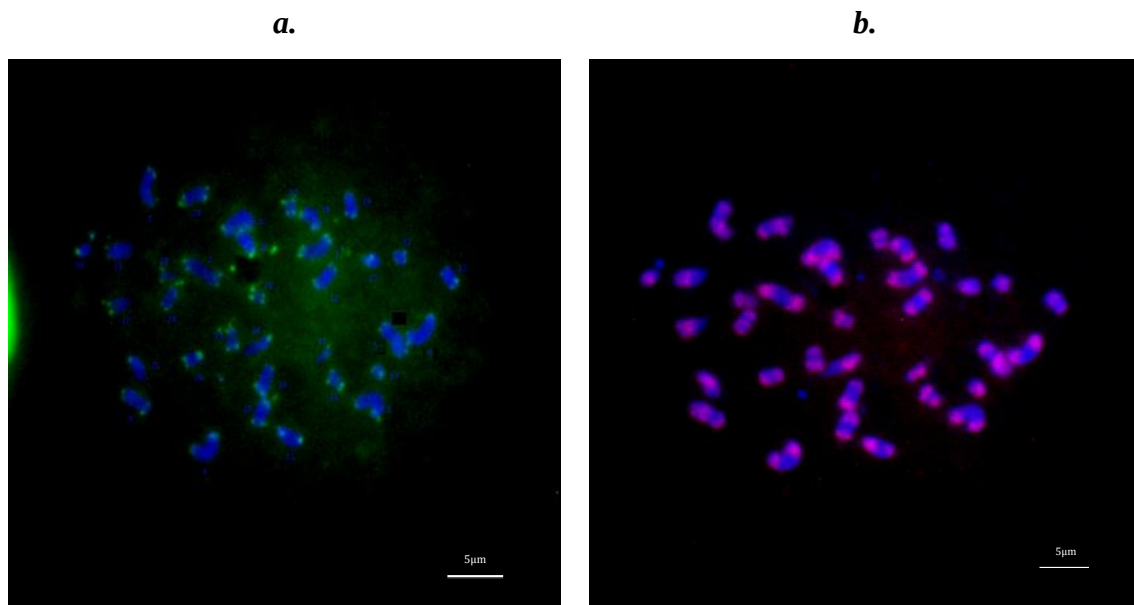
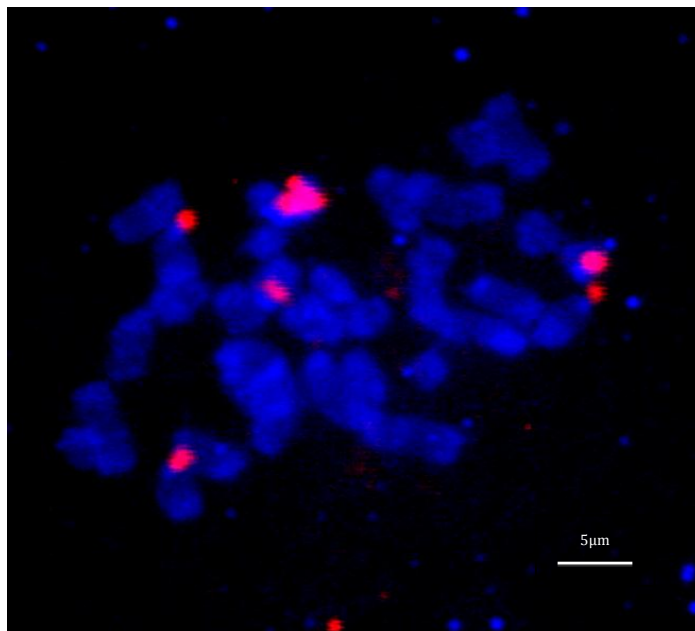


Fig. 2.2.14 – Ibridazione FISH su metafasi di carciofo colorate con DAPI, con la sonda (TTAGGG)₅ FITC **a.** e (GA)₁₀ Cy3, **b.**



Infine, lo studio della localizzazione dei geni ribosomali mediante FISH con la sonda pTa71, è ancora in fase preliminare del lavoro ed è stato effettuato, per il momento, solo in carciofo, dove sono stati rilevati segnali d'ibridazione su 7 dei 34 cromosomi di questa specie (Fig. 2.2.15).

Fig. 2.2.15 – Ibridazione FISH su metafasi di carciofo colorate con DAPI, con la sonda pTa71 Cy3 (rossa).

Si tratta di un risultato preliminare da confermare in carciofo con ulteriori analisi e da valutare in cardo.

2.3 REPERIMENTO DEL GERMOPLASMA E SELEZIONE PER TOLLERANZA A STRESS BIOTICI

2.3.1 INTRODUZIONE

Verticillium dahliae Kleb. è ormai riconosciuto come una delle principali malattie fungine che limitano la resa delle colture di carciofo in alcune regioni italiane e in altri paesi (Arce *et al.*, 2007). Questo fungo terricolo rimane per lungo tempo nel terreno, è anche polifago e si moltiplica in altre colture che sono spesso coltivate in rotazione con il carciofo. Le aree di diffusione del fungo sono Cile (Fernandez *et al.*, 1988), Italia (Cirulli *et al.*, 1994), California (Bhat *et al.*, 2003), Spagna (Cebolla *et al.*, 2004), Francia e Grecia (Jiménez - Díaz *et al.*, 2006), Tunisia (Jabnoun - Khiareddine *et al.*, 2008). Cirulli e Amenduni (2000), oltre ad Amenduni *et al.* (2005), hanno riferito della diffusione del patogeno in varie regioni italiane e principalmente in Puglia, che è la più importante area italiana coltivata a carciofo. Inoltre, Armengol *et al.* (2005) hanno osservato anche, la diffusione della verticillosi nella regione centro-orientale della Spagna, dove è stato raggiunto oltre l'80% di infezione nei campi sia propagati vegetativamente sia da seme. La propagazione vegetativa facilita la diffusione di infezioni sistemiche da un campo all'altro, così determinando avvizzimenti, clorosi e arresto della crescita di piante sensibili alla malattia.

Applicando una combinazione di misure quali l'uso di piantine sane, l'attenta scelta del sito di coltivazione al fine di evitare la semina in terreni ad alto rischio, la riduzione o eliminazione di fattori di inoculo nel terreno e l'uso di cultivar resistenti, può limitare la diffusione del patogeno (Cirulli *et al.*, 2010).

Rispetto alle pratiche agronomiche per il contenimento del patogeno, che risultano costose e spesso infruttuose, l'individuazione nel germoplasma di cardo selvatico e coltivato di resistenze al *Verticillium*, potrebbe rappresentare il modo più economico e sostenibile per controllare il fungo. Purtroppo, ad oggi, non sono ancora disponibili fonti di resistenza al *Verticillium* nel panorama varietale del cardo e del carciofo.

2.3.2 MATERIALI E METODI

a) Reperimento del germoplasma

Il reperimento del germoplasma di cardo è una parte basilare dell'attività che ha permesso di creare il materiale di partenza su cui effettuare lo screening per tolleranza agli stress biotici. Le accessioni di cardo provengono dai principali paesi che lo

coltivano e dove anche il carciofo è conosciuto e coltivato. Nel dettaglio vengono specificati gli istituti di ricerca ed il materiale da essi fornito (Tab. 2.3.1).

Tab. 2.3.1 – Istituti di ricerca che hanno fornito il materiale genetico ed i loro rispettivi referenti.

INSTITUTO TÉCNICO Y DE GESTIÓN GGRICOLAAVDA – Villava (Navarra) Spain (Ref. Juan Ignacio Macua Gonzálezci)		
• Llano Espana Rocalba	• Blanco de Huerva	• Verde Calahorra
• Bianco de Peralta	• Verde Peralta	• Blanko Agon F-34
• Sarramiain	• El Cortijo	• Rofo Agreda
• Tafalla	• NC 072811 Avila	• Lumbier
• Blanco de Valencia	• Terreno (Z-2211)	• Cimbro
• Llano Espana Rocalba	• Blanco de Huerva	• Verde Calahorra
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA – Viterbo (Lazio) Italia (Ref. Prof. Mario Pagnotta)		
• Cardo Selv. Larino Termoli 2007	• 18 1°	• Cim 9 B
• Cardone Fiore Ocean Mist	• Cim 10 pt. 7	• Acc 3 K5 pt 2
• Cardo di Montagna 2007	• Acc 6 K 8 pt 3	• 10 6° 40
• Cardo Bianco Avorio 2007	• Cardo Rosso 2007	• Cim 12 pt 6
AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE, L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE (ENEA) – Roma (Lazio) Italia - (Ref. Dott.ssa Paola Crinò)		
• Cardo MSP 2006	• 32	• Vert de Provence
• Madrid	• 33	• Cardo Sardo – Tip. 1
• Cardo Nizza	• Cerveteri	• Cardo Sardo – Tip. 2
• Cardo Monostelo Selv.	• FS	• Cardo Sardo – Tip. 3
• Cardo Sardo	• Cardo Llano de Espana	• Cardo Sardo – Tip. 4
• Cardo Gigante Inerme	• Cardo Siculo	• Cardo Sardo – Tip. 5
• Bianco Avorio Semiorto	• 2-SA-1	• Cardo Sardo – Tip. 6
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA E AGRO-ALIMENTAR DO ALENTEJO (CEBAL) – Beja, Portugal - (Ref. Dott.ssa Sónia Gonçalves)		
• Portugal 1 Wild	• Portugal 2 Cultivated	• Cardo di Madera

Tutte queste accessioni sono state seminate in contenitori alveolari da 84 fori e messi a germogliare in un ambiente controllato (camera di crescita), ad una temperatura di 24°C ed una umidità relativa pari 60% (Fig. 2.3.1).

Oltre alle accessioni di cardo sono state seminate, come controllo, 5 varietà commerciali di carciofo quali Romolo, Istar, Opal, Cavi e Madrigal.

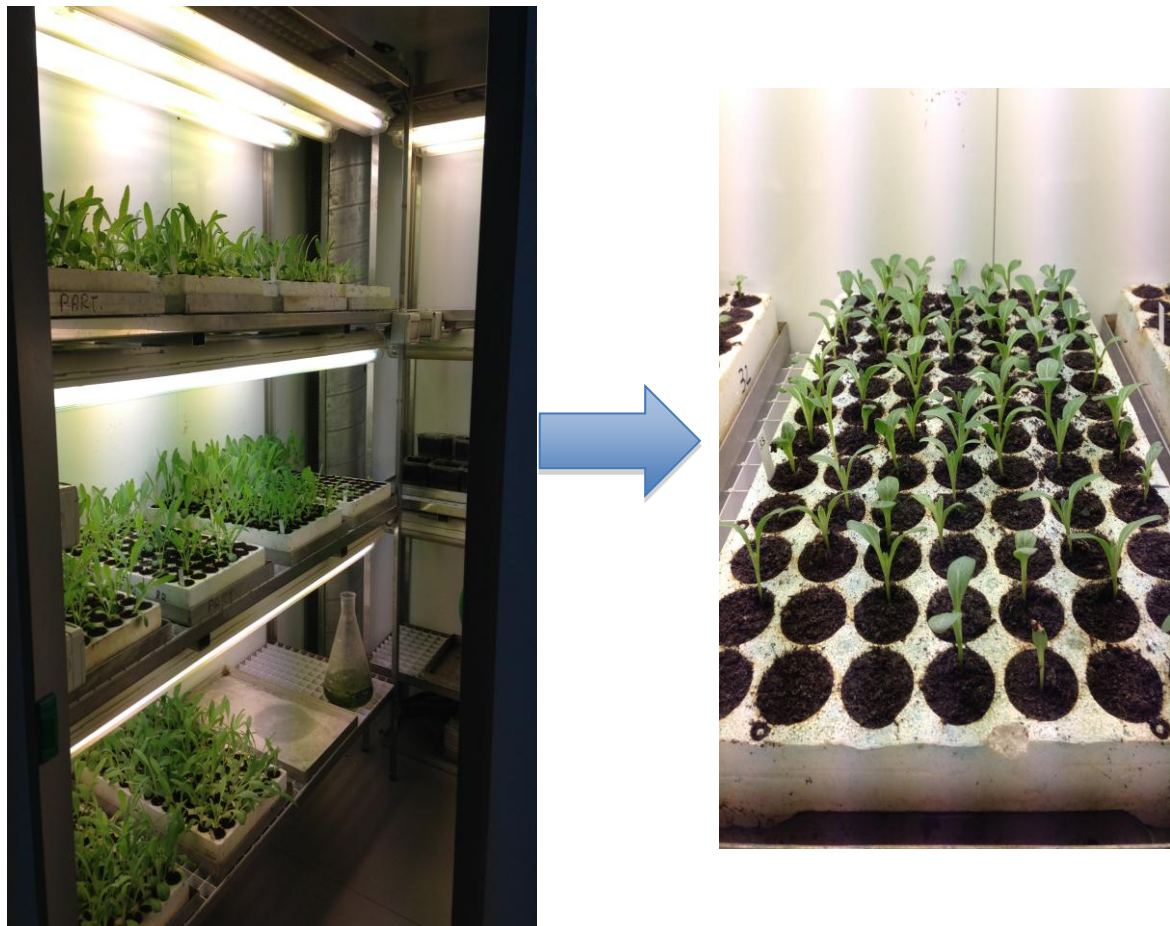


Fig. 2.3.1 – Sviluppo delle piantine in camera di crescita.

Una volta raggiunta la dimensione di 2/3 foglie vere, le piantine hanno raggiunto la dimensione idonea per essere inoculate con il fungo patogeno.

b) Screening per tolleranza a *V. dahliae*

Le cinquantuno accessioni di cardo tra coltivato e selvatico, insieme agli ibridi commerciali di carciofo, sono state inoculate artificialmente in condizioni ambientali controllate di temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) ed umidità (60%).

Una volta ottenuto l'isolato fungino e mantenuto in purezza, dopo il suo riconoscimento attraverso le strutture fruttifere caratteristiche della specie che determinano la disseminazione delle spore (Fig. 2.3.2), è stata effettuata la valutazione della sua patogenicità.

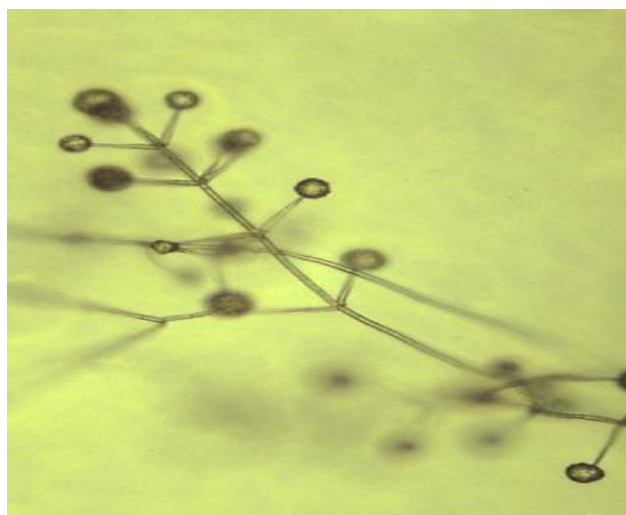


Fig. 2.3.2 – Strutture fruttifere tipiche di *V. dahliae*

La moltiplicazione dell'isolato fungino è avvenuta per almeno due settimane in camera climatica a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, all'interno di capsule contenenti il substrato Czapek Dox Agar (DIFICO) (Fig. 2.3.3).

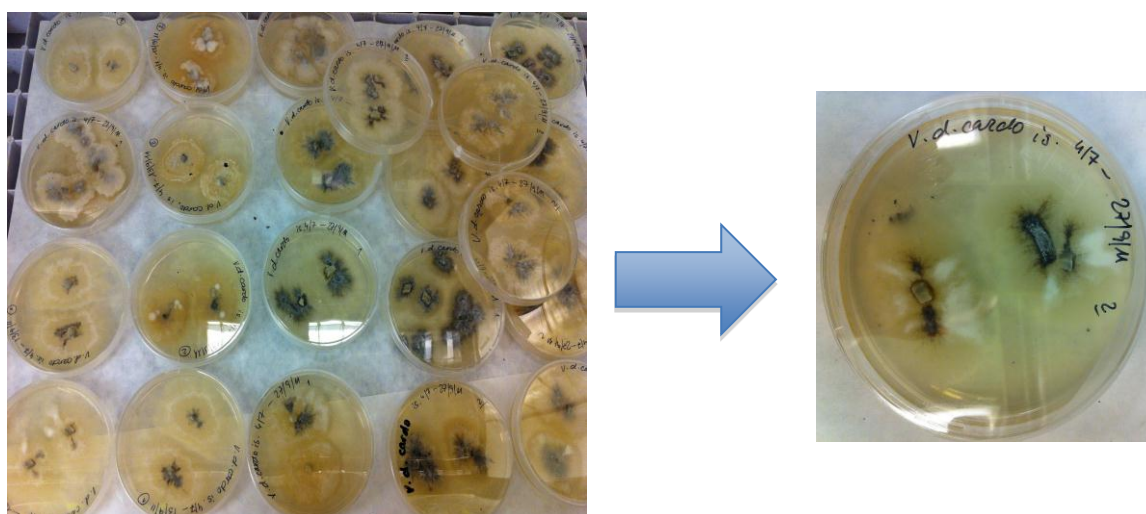


Fig. 2.3.3 – Capsule di coltivazione del fungo.

La preparazione della sospensione fungina è stata effettuata omogenizzando la porzione di substrato in cui è presente la colonia del fungo in acqua distillata per pochi secondi e filtrando il composto ottenuto con 2/3 strati di garza posizionati all'interno di un imbuto. La concentrazione finale di conidi nella sospensione, pari a $5 \times 10^6 \text{ CFU.ml}^{-1}$, è stata stabilita analizzando al microscopio due gocce di inoculo sul contacellule di Thoma (Fig. 2.3.4).



Fig. 2.3.4 – Contacellule di Thoma.

Una volta preparata la sospensione conidica, si è proceduto al lavaggio delle radici in acqua per eliminare tutta la terra e successivamente al taglio di 1-2 cm, così da creare delle ferite che facilitano l'ingresso del fungo all'interno della pianta. Le piantine così preparate sono state immerse per 10-15' nella sospensione e dopo di che trapiantate in contenitori alveolati da 84 fori con terreno nuovo (*Fig. 2.3.5*).

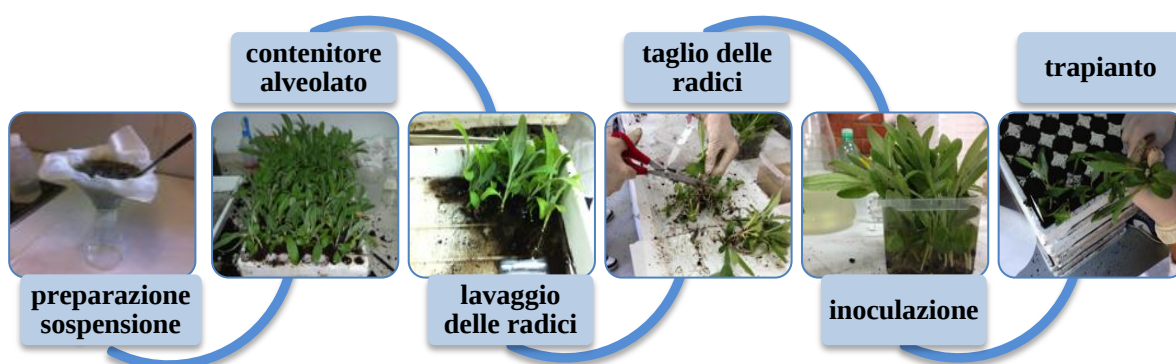


Fig. 2.3.5 – Fasi della tecnica di inoculazione.

Il controllo di ogni genotipo è stato trattato nella stessa maniera delle piante infettate, ma senza il passaggio nella sospensione fungina che è stata sostituita con dell'acqua.

Per ogni accessione, è stata valutata la percentuale delle piante infettate e l'indice di severità dei sintomi della malattia, per lo più ingiallimenti fogliari e avvizzimenti, a cui si attribuisce secondo una scala da 0-4 (Tab. 2.3.2), con 0 che rappresenta le piante senza visibili ingiallimenti e sofferenze e 4 con evidenti ingiallimenti fino alla morte della pianta (Cirulli *et al.*, 1994) (Fig. 2.3.6).



Fig. 2.3.6 – Tipica sintomatologia e danno da *Verticillium dahliae*.

Tab. 2.3.2 – Scala di valutazione dei sintomi fogliari in singole piante di carciofo che stima la gravità del *Verticillium* (Cirulli *et al.*, 1994).

Superficie fogliare infettata (%)	GRADO DI AVVIZZIMENTO		
	Nessuno o molto leggero	Moderato	Grave
0	0		
1-9	1	2	3
10-24	2	3	4
25-50	3	4	4
>50	4	4	4
Piante morte	5	5	5

Dal momento che il genotipo selvatico proveniente dalla Sardegna e denominato “Sardo”, ha manifestato una grande eterogeneità e presenza di tipologie molto diverse in seguito alla caratterizzazione morfologica effettuata in campo, queste sono state analizzate separatamente.

2.3.3 RISULTATI

Come atteso, le popolazioni di cardo hanno manifestato un’ampia variabilità nella risposta al parassita, confermando che le tipologie selvatiche hanno una capacità maggiore nel sopportare lo stress.

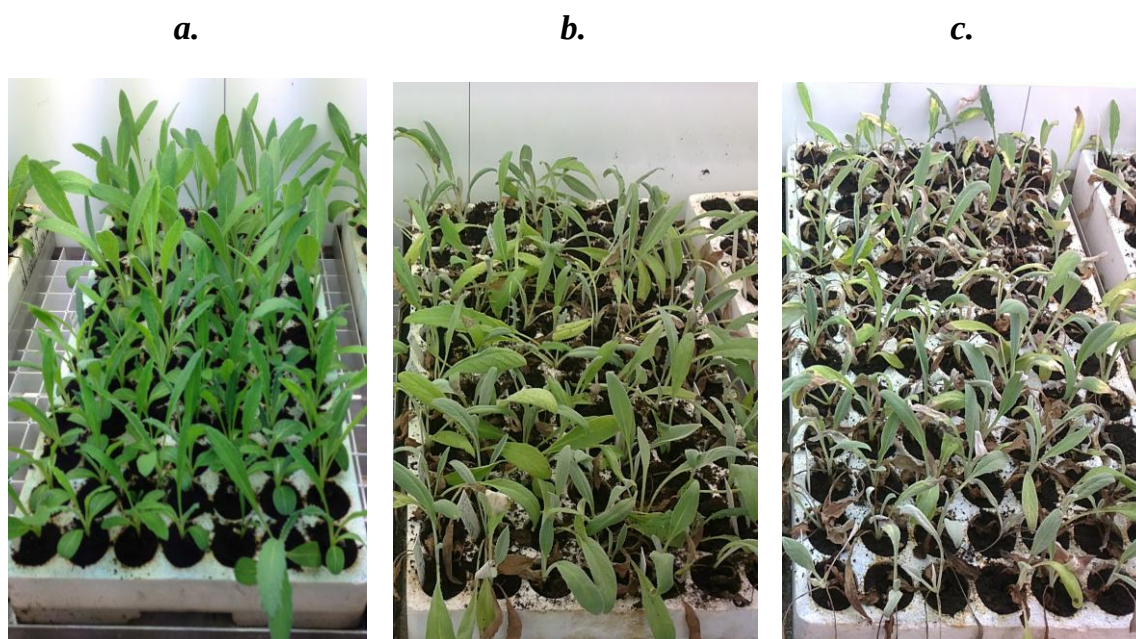


Fig. 2.3.7 – a. controlli non inoculati; b. accessioni tolleranti al fungo; c. accessioni suscettibili al fungo.

La *Figura 2.3.7* mostra le differenze fra i controlli (**a**), le accessioni tolleranti (**b**) ed infine quelle suscettibili (**c**). Delle cinquantuno accessioni di cardo analizzate sono stati individuati 9 genotipi tolleranti al *V. dahliae*.

Nella *Figura 2.3.8* sono evidenziati in rosso le accessioni risultate tolleranti durante le tre diverse inoculazioni effettuate. Alcune di esse confermano il risultato ottenuto nella prima prova, come il cardo Sardo, il 18 1°, il 10 6° 40 ed il Cardo Monostelo Selv.; mentre altre sono materiale genetico nuovo reperito nel corso dell’attività di dottorato, quali FS, 33, 32 e Portugal 1 wild.

per *V. dahliae*, sono state inoculate anche singolarmente queste 6 tipologie fatte crescere e trattate come precedentemente dettagliato.



Tipologia 1

Cardo di taglia bassa e contenuta, presenta molte spine su tutta la pianta e le foglie sono tipiche delle specie selvatiche.



Tipologia 2

Cardo di taglia bassa come il selvatico, presenza di spine solo sul capolino, mentre le foglie richiamano il cardo coltivato.



Tipologia 3

Cardo di alta taglia, vigoroso, poche spine, molti capolini e del tutto simile ai genotipi coltivati.



Tipologia 4

Cardo di media taglia, senza spine e con foglie molto simili a quella del carciofo, più carnosa ed espansa.



Tipologia 5

Cardo di alta taglia, poco produttivo, molto spinoso, infatti ricorda il tipo selvatico, ma più vigoroso.

Tipologia 6

Cardo di taglia media, produttivo, con poche spine e con foglie molto cerosi tendenti al bianco/grigiastro.

Fig. 2.3.9 – Le diverse Tipologie di cardo “Sardo” selezionate.

La tipologia 4 è quella che ha infine manifestato più tolleranza nei confronti del patogeno.

Una volta selezionate le accessioni di cardo resistenti a *V. dahliae*, il lavoro della tesi è consistito nella loro utilizzazione in programmi d’innesto, per un’immediata utilizzazione e valorizzazione dei genotipi di carciofo usate come nesto, e in programmi di ibridazioni, per l’introgressione a lungo termine delle resistenze dal cardo in carciofo.

2.4 OBIETTIVO A BREVE TERMINE: INNESTO

2.4.1 INTRODUZIONE

Innestare una varietà agronomicamente interessante su un portainnesto tollerante ad uno stress permette di ottenere piante in grado di controllare lo stesso stress. Questa tecnica colturale viene ormai applicata per diversi ortaggi; riduce l'incidenza delle malattie terricole e permette di tollerare anche gli stress abiotici, migliorando l'assorbimento dei nutrienti e quindi la qualità dei frutti per il mercato fresco.

Anche se l'innesto è una procedura semplice, richiede una selezione oculata del portainnesto e delle date di semina assieme ad uno sviluppo ottimale della tecnica. La compatibilità nesto-portainnesto dipende da variabili anatomiche, fisiologiche e genetiche (Andrews *et al.*, 1993; Edelstein *et al.*, 2004), ma i meccanismi fisiologici e molecolari che entrano in gioco nella formazione del punto di unione e nella cicatrizzazione dell'innesto sono ancora ampiamente sconosciuti (Yin *et al.*, 2012). Sono molto pochi i dati bibliografici disponibili sulla formazione dell'unione dell'innesto in alcune specie agrarie quali il pomodoro (Fernandez - Garcia *et al.*, 2004), la canna da zucchero (Botha *et al.*, 2004) e il melone (Martínez – Ballesta *et al.*, 2010), ma si tratta solo di informazioni parziali. Nulla è stato riportato sinora in relazione all'innesto in carciofo (Ciccarese *et al.*, 1994; Trinchera *et al.*, 2013; Temperini *et al.*, 2013). Sembra plausibile considerare il cardo come un valido donatore di resistenze a malattie del carciofo, ma la tecnica ottimale di innesto, le relazioni di compatibilità/incompatibilità, il meccanismo d'innesto sono del tutto da studiare. Per quanto riguarda la sequenza e le fasi fisiologiche che portano alla saldatura dell'innesto, sia nelle piante legnose che erbacee, come prima fase, nel caso di compatibilità, i tessuti tagliati del nesto e del portainnesto entrano in contatto intimo formando cellule parenchimatiche (callo) capaci di bloccarli insieme; nella seconda fase, la differenziazione cellulare avviene con formazione di una connessione cambiale continua tra portainnesto e marza. Infine, nella terza fase, la connessione vascolare tra nesto e portainnesto viene ripristinata con la formazione di nuovo tessuto cambiale nei ponti che attraversano il callo (Moore *et al.*, 1981; Tiedemann, 1989; Hartmann *et al.*, 2002). Pina *et al.* (2012) hanno verificato la proliferazione del callo, in entrambe le combinazioni, compatibili e incompatibili, ad appena una settimana dopo l'innesto, definendolo un indice di buon attecchimento e sviluppo.

Su questa base, l'obiettivo della ricerca, una volta selezionate le accessioni di cardo resistenti a *V. dahliae*, è in primo luogo incentrato nella loro utilizzazione in programmi

di innesto attraverso la messa a punto della tecnica e lo studio mediante SEM (Microscopio Elettronico a Scansione) dei cambiamenti anatomico-fisiologici avvenuti nei tessuti vegetali nesso/portainnesto in corrispondenza del punto di unione. Tale studio è stato esteso sia applicando la tecnica dello spacco inglese, in periodi stagionali diversi dell'anno, sia confrontandola con quella dello spacco in testa, per rilevare eventuali differenze atte a scegliere quella migliore.

2.4.2 MATERIALI E METODI

a) Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Sono state ottenute delle immagini SEM utilizzando il microscopio EVO[®]-MA 10 (Carl Zeiss AG, Oberkochen – Germania) in modalità a pressione variabile (VP) (*Fig. 2.4.1*). Lavorare in tale modalità VP [a 20 kV elettroni ad alta tensione (EHT)/25 Pa di pressione della camera] impedisce danneggiamenti della superficie dei campioni biologici, di solito molto delicati, ed allo stesso tempo garantisce rapidamente l'ottenimento di immagini ad alta risoluzione e qualità.



Fig. 2.4.1 – Microscopio elettronico a scansione ZEISS EVO MA10 (LaB₆ lamp).

Con questa strumentazione in modalità VP è quindi possibile lavorare direttamente su campioni freschi. L'assenza di pretrattamenti e particolari metodi di preparazione dei campioni da analizzare, permette un risparmio di tempo ed evita possibili alterazioni

introdotte dai trattamenti iniziali.

Il microscopio a scansione elettronica è implementato dalla tecnologia a “manicotto fascio”, in grado di estendere la colonna sotto vuoto fino a 2 mm del campione al fine di migliorare il contrasto e la precisione analitica. È stata utilizzata una sorgente di elettroni LaB₆, ad elevata brillantezza, per mantenere immagini ad alta risoluzione, necessarie per le analisi ad elevati ingrandimenti.

Ciascuna porzione di tessuto corrispondente a ± 5 mm dal punto di innesto, sezionata per una lunghezza di 10 mm, è stata posizionata su un disco (*stub*) coperto da un sottile strato adesivo di polvere di carbone (*Fig. 2.4.2*).

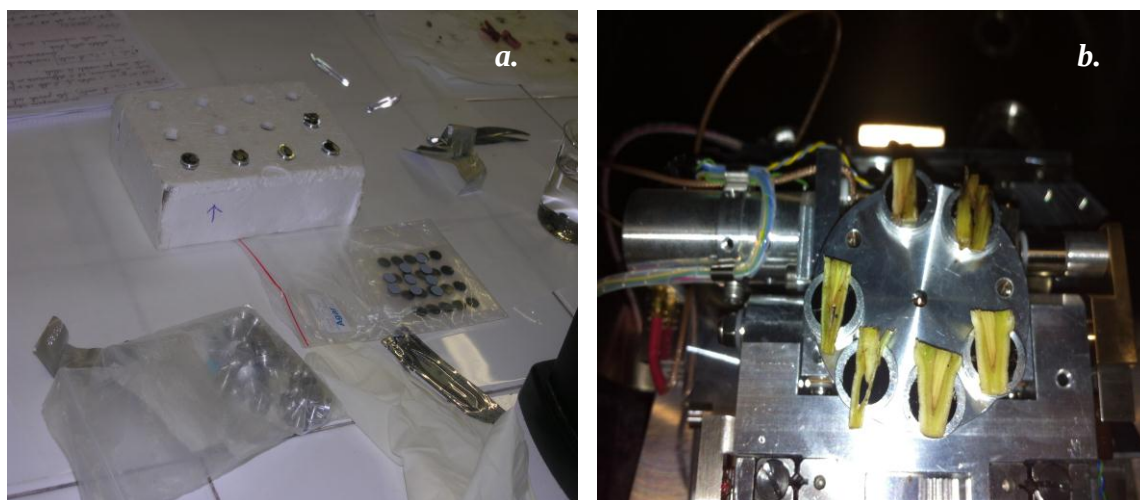


Fig. 2.4.2 – Preparazione dei campioni per l’analisi all’interno del SEM **a.** materiali necessari; **b.** campioni posizionati sugli *stub* nell’aurocampionatore.

Come metodi di rilevazione per l’ottenimento delle immagini, sono stati utilizzati sia il rilevatore ad elettroni secondari (SE-VP) che quello in “back-scattered” (BSE-VP). Il primo ha fornito informazioni sulla topografia di superficie dei tessuti dell’innesto, con una risoluzione abbastanza alta da permettere la visualizzazione di alcune tipiche microstrutture biologiche. Il secondo rivelatore si basa sulla possibilità di differenziare i materiali in relazione al contrasto della luce, riconoscendo le variazioni di peso atomico medio; la stessa infine, tecnica può fornire informazioni sulla composizione dei materiali biologici in esame. La sorgente di elettroni LaB₆ garantisce un’elevata brillantezza ed ottimizza le prestazioni del microscopio BSE.

b) Materiale vegetale e condizioni colturali

Dopo lo screening di base per identificare accessioni di cardo resistenti a *V. dahliae* (Ciccarese *et al.*, 2012; Trinchera *et al.*, 2013), i genotipi "Belgio" (cardo coltivato, CC), e "Sardo" (cardo selvatico, WC), sono stati selezionati per essere utilizzati come portainnesti in combinazioni di innesto con l’ibrido di carciofo Romolo (SEED TOP,

Salerno - Italia), usato come nesto. La scelta di questi genotipi è stata fatta sia in funzione della tolleranza individuata al patogeno, ma anche in funzione della necessità di valutare le differenze tra un innesto effettuato utilizzando come portainnesto un cardo coltivato ed uno selvatico, innestati sulla stessa varietà di carciofo Romanesco.

Prima dell'innesto, le piantine di carciofo e cardo sono state fatte germinare in contenitori alveolati da 48 fori riempiti con terriccio commerciale a base di torba media all'85% (v/v) e perlite, quest'ultimo utilizzato come materiale inerte al 15% (v/v), terriccio tipico per le piantine da vivaio in crescita (Gebr. Brill substrato GMBH & Co. KG, Geotec s.r.l., Rovigo - Italia). L'ambiente dove crescono le piantine e in cui vengono preparate per l'innesto, svolge un ruolo estremamente importante. La piantina ottimale, sia per il nesto che per il portainnesto, è quella in cui l'ipocotile si è allungato sufficientemente da poter permettere il taglio ed il successivo assemblaggio dei due bionti.

Nella *figura 2.4.3 a e b* è possibile vedere il diverso allungamento dell'ipocotile in piantine di cardo e carciofo; il cardo tende a svilupparsi in minor misura rispetto al genotipo di carciofo.



Fig. 2.4.3 – a. Pianta di cardo con l'ipocotile poco allungato; *b.* Piantina di carciofo con l'ipocotile più sviluppato.

Per tale motivo sono state fatte diverse prove sulla regolazione dei giorni di buio

necessari a far allungare l'ipocotile e sull'ambiente ottimale per l'attecchimento dell'innesto. Per l'individuazione della lunghezza ottimale del periodo di buio ed ottenere un sufficiente allungamento dell'ipocotile delle piantine, sono state scelte 3 diverse tesi sperimentali:

- semina e mantenimento del materiale sempre alla luce per 15 giorni;
- semina e mantenimento del materiale sempre al buio per 15 giorni;
- semina e mantenimento del materiale per una settimana alla luce ed una al buio.

Il buio totale è stato ottenuto con teli neri ombreggianti (75%) abbastanza spessi e posizionati in maniera doppia sopra dei cassoni dove le piantine, all'interno dei contenitori alveolati, sono state messe a germinare (*Fig. 2.4.4*).



Fig. 2.4.4 – Ombreggiamento del cassone.

Oltre alla necessità di avere un ipocotile abbastanza allungato, è molto importante che le piantine del nesto e del portainnesto arrivino al momento ottimale per l'innesto (stadio di 2/3 foglie vere) tutte con un diametro dello stelo di uguale dimensione. Questo permette una maggiore adesione dei due bionti al momento della loro unione e del posizionamento della molletta, evitando scivolamenti e problemi di incompatibilità meccanica. Per far in modo che avvenga tutto ciò, abbiamo provveduto a valutare il seme in nostro possesso in funzione dei parametri standard che definiscono una normale semente: percentuale di germinazione, tempo medio di emergenza e velocità di emergenza. Il seme dell'ibrido di carciofo, pur essendo certificato dalla ditta sementiera in base a questi parametri già noti, è stato comunque testato nelle nostre condizioni di sviluppo. Nel caso dei cardi, invece, sono state fatte diverse prove di germinazione e di

valutazione della velocità di emergenza, dato che soprattutto le tipologie selvatiche presentano una discreta scalarità di germinazione.

La fase di attecchimento dell'innesto è estremamente delicata in quanto i due bionti appena uniti sono molto soggetti a disidratazione, avvizzimenti e malattie fungine. Per questo motivo abbiamo effettuato diverse prove in ambienti protetti quali, camera di crescita (*Fig. 2.4.5 a*), serra all'interno di un cassone con riscaldamento basale (*Fig. 2.4.5 b*) e in piccole serre tunnel opportunamente adattate (*Fig. 2.4.5 c*), in cui comunque, tutti i parametri ambientali sono stati opportunamente controllati e verificati.

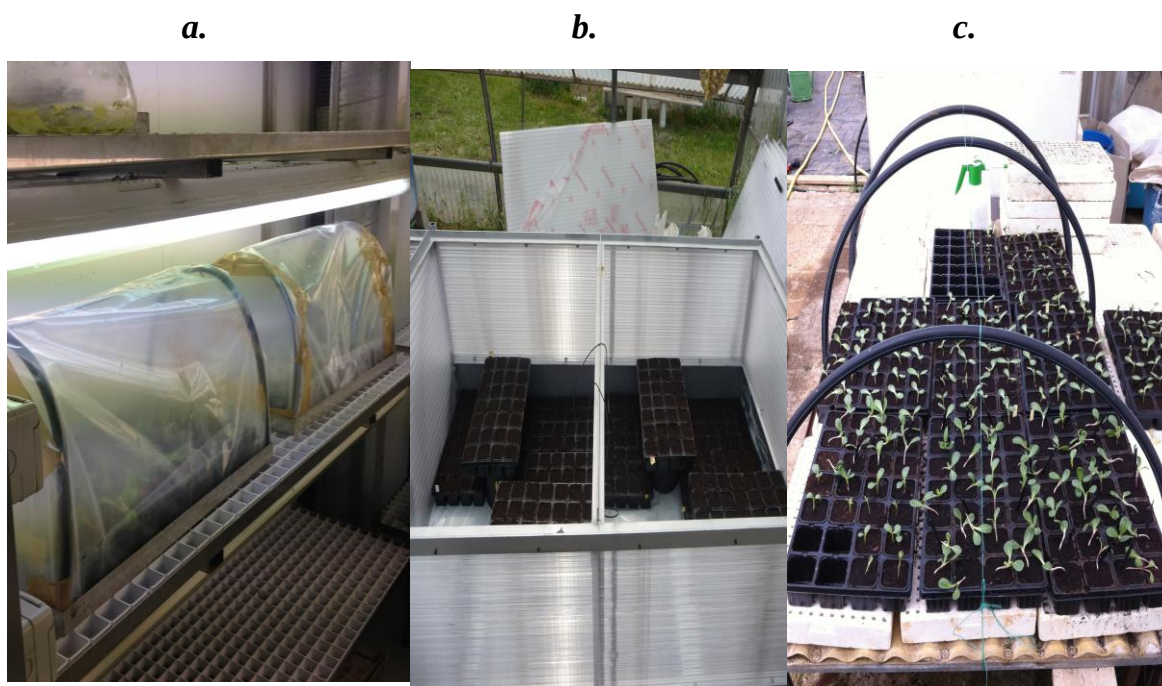


Fig. 2.4.5 – a. Camera di crescita, b. cassone e c. tunnel in serra.

I parametri tenuti in considerazione sono stati la temperatura giorno/notte a 25/18°C, l'umidità relativa 60%, l'illuminazione con 4.000 lux e il fotoperiodo con 16 ore di luce e 8 ore di buio. All'interno della camera di crescita, la luce è stata fornita, in maniera costante e diretta per ogni ripiano, da una serie di tubi fluorescenti e lampade ad alogenuri metallici (neon). In serra, la luminosità non è stata un problema se non per un eccesso; infatti nel periodo estivo siamo ricorsi ad un ombreggiamento dei vetri, effettuato con della calce spruzzata sui vetri.

Per far accrescere e mantenere in buono stato le piantine, è stata effettuata anche una concimazione utilizzando come acqua di irrigazione una soluzione nutritiva standard quale l'Hoagland a base di KH_2PO_4 (0,136 g l⁻¹), KNO_3 (0,505 g l⁻¹), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,181 g l⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,493 g l⁻¹).

c) Tecnica di innesto

– Esperimenti primaverile ed autunnale: l'esperimento è stato ripetuto due volte in periodi diversi: in primavera, dalla fine di aprile fino all'inizio di giugno 2012, ed in autunno, da ottobre a gennaio 2012. La scelta dei due periodi, autunnale e primaverile, per eseguire le prove è stata fatta al fine di verificare l'effetto del clima (umidità/luce/temperatura/acqua) sulle condizioni di attecchimento e di saldatura durante tutta la durata del processo di innesto.

Le combinazioni di innesto considerate in entrambi gli esperimenti sono state le seguenti: "Romolo/Romolo" (R/R) come controllo di innesto, "Romolo/Belgio" (R/CC) e "Romolo/Sardo" (R/WC). La combinazione "Romolo/Romolo" (R/R) è stata effettuata per valutare le condizioni ottimali per effettuare un innesto, visto che la compatibilità dei due bionti dovrebbe essere elevata.

Dopo il 28° giorno di crescita, le piantine di carciofo sono state innestate su piante di cardo, utilizzando la tecnica di innesto a spacco inglese, come descritto da Lee *et al.* (2010). Questa tecnica consiste nel praticare un taglio obliquo eseguito nello stesso modo sia sul portainnesto che sul nesto e l'unione delle due marze è avvenuta mediante l'uso di una piccola molletta (Fig. 2.4.6). È stata scelta questa metodica d'innesto in quanto è una delle tecniche più utilizzate in orticoltura. L'innesto è stato effettuato sotto i cotiledoni del portainnesto, al fine di evitare l'emissione di germogli dal portainnesto del cardo.

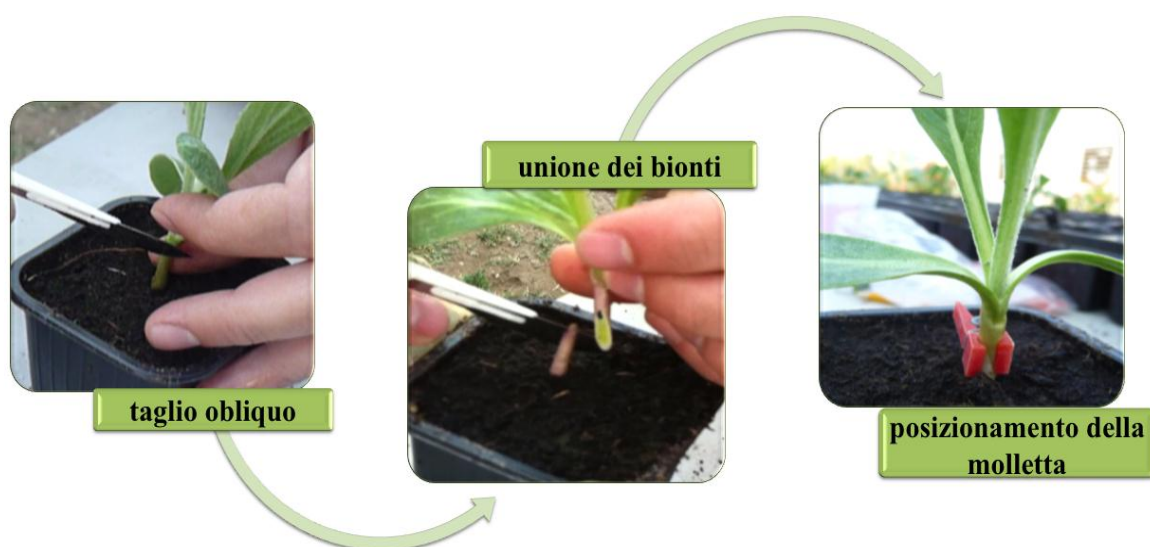


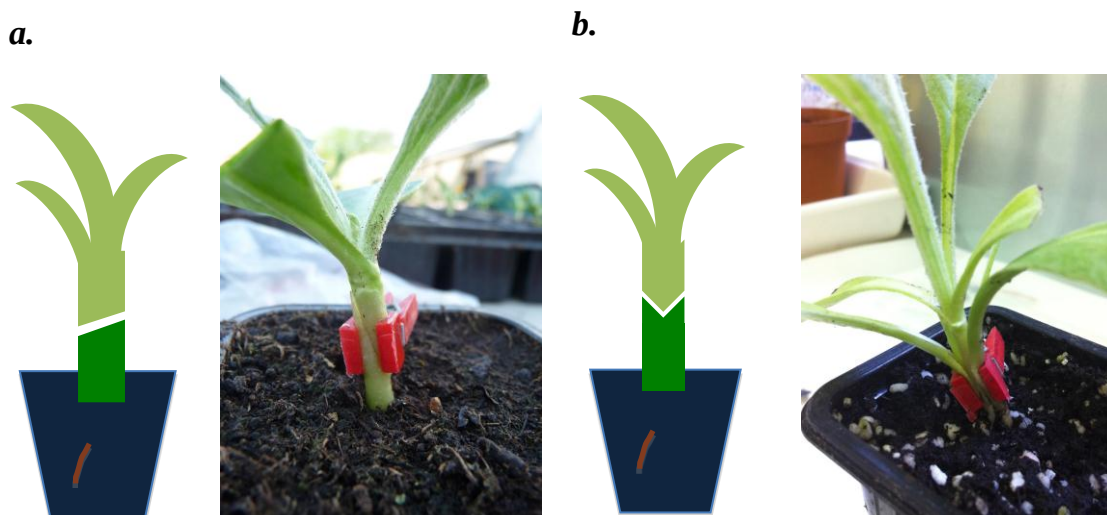
Fig. 2.4.6 – Tecnica di innesto a spacco inglese.

Le piante innestate sono state collocate all'interno delle strutture precedentemente descritte (cassoni), come durante gli altri esperimenti. È stata garantita elevata umidità

(~100%) posizionando dei contenitori di acqua all'interno dei cassoni vista l'alta sensibilità delle piante alla disidratazione, in particolare della marza che non ha il proprio apparato radicale e la formazione dei nuovi fasci vascolari. Le temperature all'interno dei cassoni o dei tunnel riscaldati erano di 20-30°C durante l'esperimento in primavera e di 18-24°C durante l'esperimento in autunno. Il fotoperiodo naturale era 14 ore luce/10 ore di buio nell'esperimento primaverile e di 11 ore di luce/13 ore di buio nell'esperimento autunnale.

– Confronto tra le tecniche: l'esperimento è stato eseguito da ottobre fino a gennaio 2012, utilizzando due tecniche d'innesto, lo spacco inglese e lo spacco in testa, allo scopo di verificare le diverse prestazioni nella cicatrizzazione dell'innesto e tra i bionti. Nell'esperimento sono state testate tre combinazioni d'innesto: Romolo/Romolo (A/A, come controllo), Romolo/Belgio (A/CC) e Romolo/Sardo (A/WC). Dopo 28 giorni di crescita, le piante di carciofo sono state innestate su quelle di cardo applicando le tecniche sia d'innesto a spacco inglese che a spacco in testa, come descritto da Lee *et al.* (2010). Nel caso dell'innesto a spacco inglese, è stato eseguito un taglio obliquo nello stesso modo sia sul portainnesto che sul nesto (*Fig. 2.4.7 a*) e l'unione delle due marze è stata effettuata mediante l'uso della classica molletta da innesto (Trinchera *et al.*, 2013). Al contrario, nell'innesto a spacco in testa è stato praticato un taglio netto, all'altezza dei cotiledoni e poi lungo il centro dello stelo del portainnesto. Il nesto invece è stato preparato facendo due tagli inclinati alla base dello stelo e formando un cuneo che è stato inserito saldamente nel taglio del portainnesto (*Fig. 2.4.7 b*). A garantire l'unione dei due bionti, prevenire la disidratazione e limitare il movimento del nesto, è stata utilizzata una molletta da innesto. Entrambi i metodi di innesto sono stati applicati sotto i cotiledoni, onde evitare emissioni indesiderate di germogli dal portainnesto di cardo.

Con entrambe le tecniche d'innesto, le piante innestate sono state poste in dei cassoni di plexiglass riscaldati, collocati all'interno di una serra, come precedentemente descritto. Durante l'attecchimento dell'innesto, essendo le piante veramente sensibili alla disidratazione, in particolare il nesto perché privo di radici, all'interno del cassone è stata garantita un'alta umidità (~100%) posizionando alcuni contenitori di acqua. Le temperature assicurate all'interno dei cassonetti riscaldati sono state comprese tra 18 e 24°C ed il fotoperiodo era assicurato dalla luce naturale con un ciclo di 11 ore luce/13 ore buio durante l'intero periodo di sperimentazione.



*Fig. 2.4.7 – Tecniche d’innesto **a.** a spacco inglese, **b.** a spacco in testa.*

d) Studi anatomici

– Esperimenti primaverile ed autunnale: nella fase di saldatura del punto di unione tra portinnesto e nesto, per entrambi gli esperimenti primaverile ed autunnale, sono state condotte diverse indagini anatomiche, mediante microscopio a scansione elettronica (SEM), sulle variazioni intervenute nei tessuti vegetali implicati.

Le piantine innestate sono state asportate dai contenitori alveolati e da queste è stata tagliata la porzione di 10 mm di lunghezza, corrispondente a ± 5 mm dal punto di innesto (portainnesto/nesto), per mezzo di una lama da rasoio su una base rigida per ottenere un taglio netto e preciso; senza altri trattamenti i campioni freschi sono stati osservati al microscopio. Il taglio è stato eseguito longitudinalmente rispetto alla pianta e trasversalmente rispetto alla giunzione di innesto, come mostrato in *Figura 2.4.8*. Le indagini sono state ripetute per tutte le combinazioni di innesto considerate, al fine di rilevare accuratamente l'affinità di tessuto tra tutte le diverse combinazioni ed al variare del tempo. La combinazione R/R è stata usata come test di riferimento visto il fatto che, essendo il genotipo innestato su se stesso, dovrebbe manifestare la massima affinità e compatibilità.

Le analisi microscopiche condotte sulle porzioni di innesto sono state effettuate al 3°, 6°, 10° e 12° giorno dopo l'innesto, per studiare l'evoluzione della saldatura e la formazione dei diversi tessuti nel punto di unione parte area nesto/rizoma portainnesto. Le analisi al SEM sono state prolungate al 30° giorno dall'innesto, solo nel caso dell'esperimento autunnale, tenendo conto del possibile rallentamento nel processo di unione e cicatrizzazione causato della stagione fredda. Per verificare la ripetibilità dei

risultati, i controlli visivi al microscopio sono stati effettuati su tre repliche per ogni combinazione.

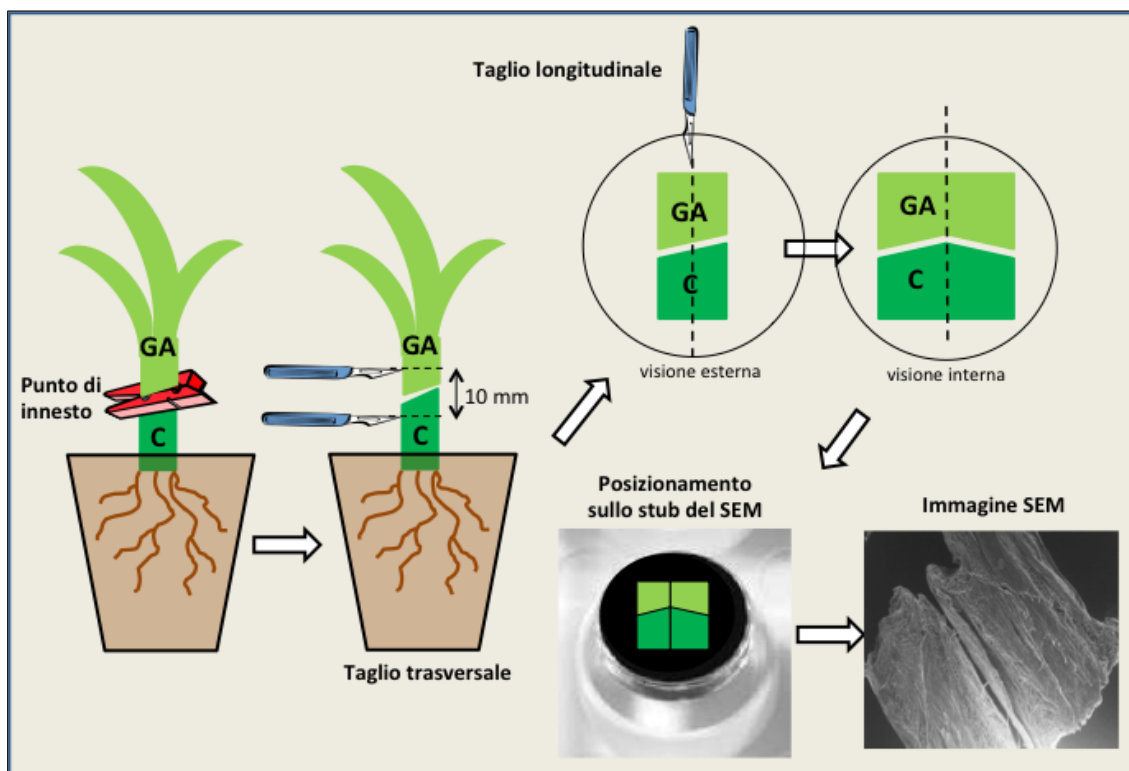


Fig. 2.4.8 – Procedura di taglio portainnesto/nesto e posizionamento dei campioni per le analisi al SEM.

– Confronto tra le tecniche dal punto di vista fisiologico: anche in questo esperimento sono state effettuate delle indagini anatomico-fisiologiche nel punto d'innesto durante la cicatrizzazione. L'analisi ha mirato a individuare le variazioni avvenute nei tessuti vegetali tra le diverse tipologie d'innesto, a spacco inglese e a spacco in testa, attraverso il microscopio elettronico a scansione (SEM) e sulle tre combinazioni d'innesto considerate.

La preparazione dei campioni per l'analisi al SEM è stata la stessa dell'esperimento autunnale/primaverile, così come i tagli effettuati sui campioni freschi (Fig. 2.4.9). Le analisi microscopiche sono state condotte sulle porzioni tagliate al 4°, 6°, 10°, 30° e 60° giorno dopo l'innesto, per uno studio a lungo termine sull'evoluzione nella saldatura nesto/portainnesto, distinguendo le diverse tecniche d'innesto. Per verificare la ripetibilità dei risultati, anche in questo caso, i controlli visivi sono stati effettuati su tre repliche per combinazione. Le immagini al SEM sono state ottenute con lo stesso microscopio descritto precedentemente in modalità a pressione variabile.

Nella figura 2.4.9 sono ben evidenziate tutte le differenze nella preparazione dei

campioni da analizzare tra le due diverse tecniche applicate, inclusi i tagli che sono stati ad essi effettuati e la loro sistemazione negli *stub* per l'inserimento nella camera a pressione del SEM.

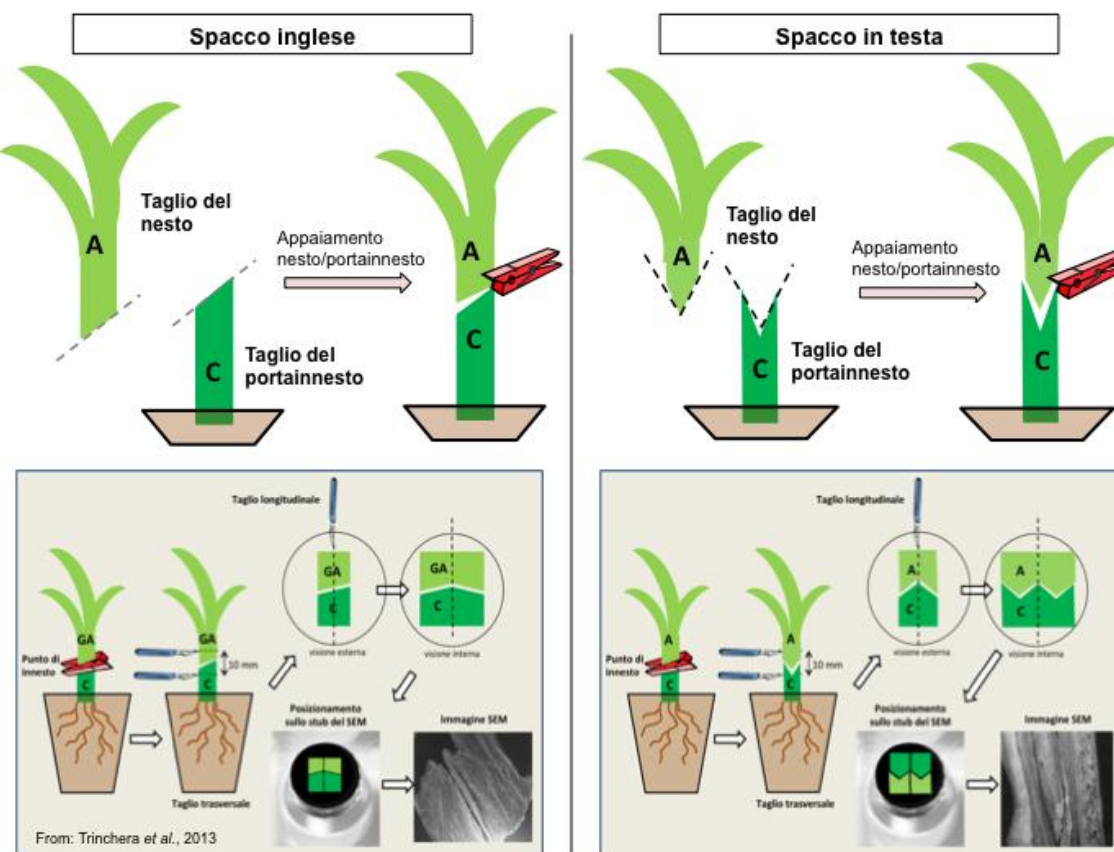


Fig. 2.4.9 – Procedura di taglio portainnesto/nesto e posizionamento dei campioni per le analisi al SEM.

Anche in questo caso l'uso degli elettroni secondari (VPSE) è stato in grado di fornire informazioni sulla topografia della superficie dei tessuti innesto, con una risoluzione così elevata da permettere la visualizzazione di alcuni tipi della microstruttura biologica.

e) Valutazione della compatibilità

Il successo dell'innesto dipende dall'individuazione di un portainnesto compatibile, che promuove la formazione veloce di connessioni vascolari tra i due bionti ed anche una ripresa della crescita sia radicale che apicale. Diversi studi valutano la compatibilità ed incompatibilità di diversi portainnesti nei confronti di diverse varietà commerciali, per identificare i fattori fisiologici e biochimici nell'interfaccia nastro/portainnesto (Aloni *et al.*, 2008).

I genotipi utilizzati per l'esperimento sono stati un cardo coltivato (Belgio), un cardo selvatico (Sardo) e l'ibrido Romolo di carciofo. Le combinazioni di innesto valutate sono state Romolo/Romolo, Romolo/Belgio e Romolo/Sardo.

Le piante sono state fatte germinare ed innestate rispettando i metodi e le condizioni ambientali precedentemente descritti nel paragrafo, "Materiale vegetale e condizioni colturali". Al 26° giorno dall'innesto, le piantine sono state analizzate praticando un taglio alla base ed immergendole per almeno 2 ore in due diverse soluzioni coloranti quali Safranina allo 0,5% e Blu di Metilene allo 0,1%, entrambe diluite in acqua (*Fig. 2.4.10*).



Fig. 2.4.10 – Materiali e coloranti utilizzati, blu di metilene a sinistra e safranina a destra.

Una volta trascorso il tempo necessario per l'assorbimento del colorante da parte del campione, con una lama di rasoio è stato praticato un primo taglio trasversale della porzione del punto d'innesto (circa 1 cm) ed un secondo longitudinale lungo lo stelo per prepararlo all'analisi anatomica allo stereomicroscopio. Oltre all'analisi del punto d'innesto che ci ha permesso di valutare la compatibilità e la velocità di ripristino delle connessioni vascolari tra nesto e portainnesto, è stata anche verificata la diversa distribuzione dei fasci vascolari all'interno dello stelo tra i diversi genotipi utilizzati nelle combinazioni innestate. Le sezioni sono state ottenute posizionando il fusto della piantina di carciofo da tagliare all'interno di due pezzetti di polistirolo allo scopo di bloccare il campione e permettere un taglio sottile e netto fatto con una lama da bisturi (*Fig. 2.4.11*).

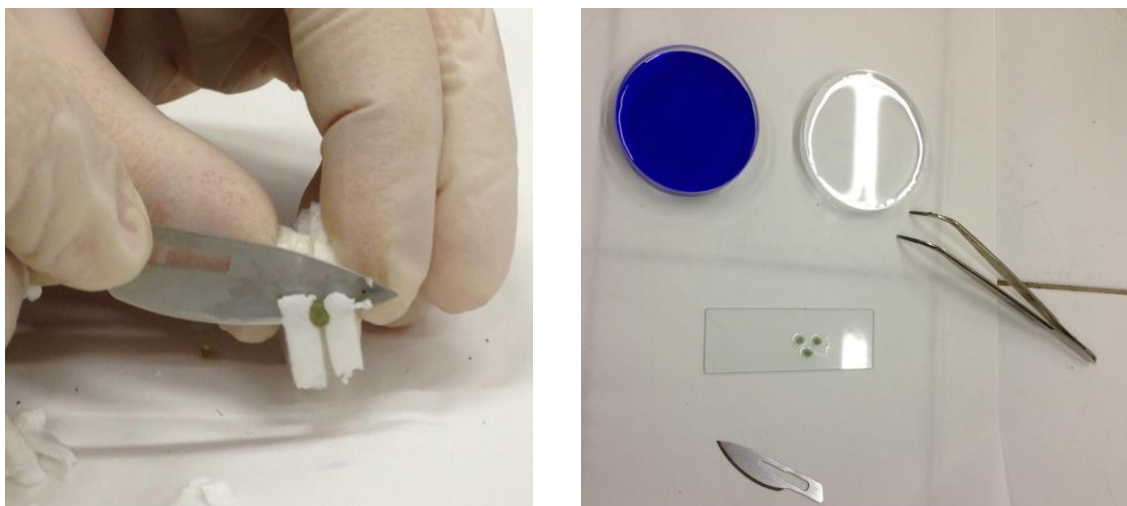


Fig. 2.4.11 – Taglio delle sezioni, colorazione e posizionamento dei campioni sui vetrini.

Tutto il materiale preparato è stato esaminato con uno stereomicroscopio (Leica Wild M420) dotato di una fotocamera digitale ad alta risoluzione (Nikon Coolpix 995).

f) Analisi qualitativa

Oltre ad aver valutato gli innesti in base alla diversa percentuale di attecchimento ed a studi anatomico/fisiologici, sono stati anche studiati alcuni aspetti della composizione qualitativa del capolino tra piante innestate e non. Nello specifico, sono stati analizzati il contenuto di micro e macro-elementi, l'attività antiossidante ed il contenuto di fenoli totali.

Il materiale impiegato per le analisi è stato prelevato dal campo sperimentale sito presso l'Azienda Sperimentale ARSIAL di Tarquinia, dove sono state trapiantate e coltivate tutte le tipologie d'innesto realizzate. In particolare, il materiale vegetale è stato prelevato dalle seguenti combinazioni d'innesto:

- Romolo ed Opal non innestati, come controlli;
- Romolo/Belgio-Sardo-Siena e Versi;
- Opal/Belgio-Sardo-Siena e Versi.

L'asportazione del materiale vegetale si è concretizzata con il prelevamento di diversi capolini, sia principali che secondari, per combinazione di innesto. Per ciascun campione, le analisi sono state condotte sulla porzione di carciofo costituita da cuore e gambo (di 10 cm circa). Il contenuto di micro e macro-elementi è stato determinato mediante lo spettrofotometro di massa simultaneo a emissione al plasma (ICP-OES), dopo incenerimento a 400°C per 24 h di ogni campione essiccato. Per la determinazione

del contenuto di polifenoli e dell'attività antiossidante, una parte dei campioni è stata congelata a -20°C fino al momento dell'estrazione.

- Preparazione dell'estratto: è stata effettuata prelevando $\cong 15$ g di peso fresco da ogni campione, ripartito in due contenitori Falcon, dove sono stati aggiunti 45 ml di etanolo 80% ottenendo un rapporto di estrazione 1:3 p/v. Ogni campione è stato quindi omogeneizzato per mezzo di un frullatore a velocità 3 e per 3 minuti, quindi centrifugato a 5000 rpm per 15 minuti (Fig. 2.4.12).



Fig. 2.4.12 – Omogeneizzazione dei campioni, centrifugazione e separazione del sopranatante.

Una volta separato il sopranatante, si è proceduto ad effettuare una seconda estrazione, questa volta con un minor quantitativo di etanolo (30 ml), in modo da ottenere un rapporto di estrazione 1:2 rispetto al peso iniziale, ripetendo la centrifugazione. I due sopranatanti sono stati uniti in modo da ottenere un estratto con un rapporto di 1:5 v/v che è stato diluito a 1:10 v/v necessario per l'analisi. La conservazione è stata effettuata in congelatore a -20°C fino al momento dell'analisi.

- Determinazione dell'attività antiossidante: si basa sulla capacità del campione estratto di neutralizzare il radicale DPPH trasformandolo nella forma ridotta. Viene effettuata sull'estratto etanologico diluito 1:5 v/v. Il DPPH viene sciolto in etanolo assoluto alla concentrazione di 0,15 mM e va mantenuto al buio fino al momento dell'uso.

Per ogni campione, sono state prelevate aliquote crescenti dell'estratto etanologico che corrispondono a concentrazioni crescenti di estratto, espresso in mg di materiale

fresco per ml di soluzione finale. Il volume finale è stato quindi portato a 500 µl aggiungendo etanolo assoluto (Kukic *et al.*, 2008; Hanato *et al.*, 1988).

Le aliquote dell'estratto considerate erano:

- 15µl + 485µl etanolo pari a 0,4 mg p.f./ml;
- 30µl + 470µl etanolo pari a 0,8 mg p.f./ml;
- 45µl + 455µl etanolo pari a 1,2 mg p.f./ml;
- 60µl + 440µl etanolo pari a 1,6 mg p.f./ml;
- 75µl + 425µl etanolo pari a 2,0 mg p.f./ml.

A ciascun campione, è stato aggiunto 1 ml di DPPH 0,15 mM per un volume finale di 1500 µl (Fig. 2.4.13).

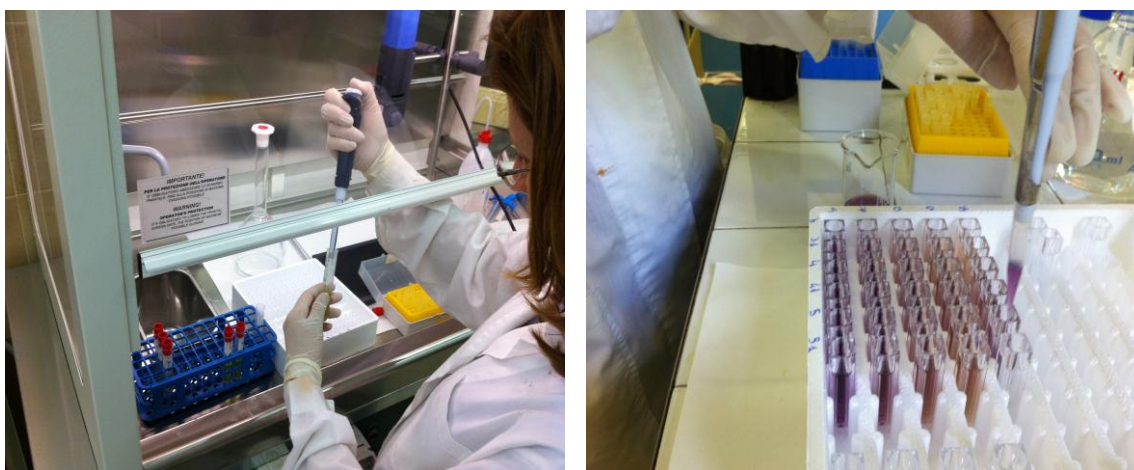


Fig. 2.4.13 – Preparazione e diluizione di ogni campione.

È stato preparato anche un controllo senza estratto, costituito da 500 µl di etanolo assoluto e 1 ml di DPPH. Per ciascun campione sono state effettuate tre repliche. L'assorbanza è stata misurata allo spettrofotometro a 517 nm dopo 30 min di incubazione al buio. Per ogni volume di estratto, la percentuale di attività antiossidante viene calcolata secondo la seguente formula:

$$(\text{Abs } 0_{(517)} - \text{Abs } C_{(517)}) / \text{Abs } 0_{(517)} * 100$$

dove Abs 0 è l'assorbanza del controllo senza estratto e Abs C è quella del campione considerato.

- Determinazione del contenuto di fenoli totali: il contenuto totale di polifenoli è stato determinato utilizzando il metodo del reattivo Folin Ciocalteu su estratto diluito 1:10 v/v. È stata preparata una curva di taratura utilizzando acido gallico come standard a diverse concentrazioni (0-40-80-120 mg/l), effettuando tre repliche. Per ogni campione, 150 µL dell'estratto diluito 1:10 sono stati messi a reagire con 750

μl di reagente di Folin Ciocalteu 10%. Dopo 5 min, sono stati aggiunti 600 μl di soluzione Na₂CO₃ 7,5% per ottenere un volume finale di 1,5 ml; il tutto è stato lasciato in incubazione per 1 h al buio. Tutte le prove sono state effettuate in tre repliche. Il bianco è stato preparato mettendo 150 μL di etanolo 80% in sostituzione dell'estratto, aggiungendo i reattivi come per i campioni (Falleh *et al.*, 2008; Singleton *et al.*, 1965).

Le misure sono state effettuate allo spettrofotometro a 760 nm, tenendo conto della retta di taratura precedentemente determinata. Il contenuto totale in polifenoli è stato espresso in equivalenti di acido gallico (GAE) corrispondenti a milligrammi di acido gallico per grammo di materiale fresco.

g) Caratterizzazione agronomica

L'attività sull'innesto si è conclusa con la valutazione in campo delle combinazioni d'innesto per definire l'effetto agronomico. Le combinazioni d'innesto sono state ottenute dall'impiego di due carciofi, Romolo ed Opal (nesti), due cardi coltivati, Versi e Belgio e due cardi selvatici Sardo e Siena (portainnesti). Tutte queste piante innestate sono state trapiantate nei campi sperimentali di Tarquinia, presso l'azienda dimostrativa di ARSIAL, a Tarquinia (Viterbo), in due anni consecutivi sempre verso la fine di agosto del 2011 e del 2012. Sono state costituite parcelle singole, anche in funzione del numero di piantine disponibili, in cui sono stati applicati i seguenti parametri di coltivazione: distanza tra le file 1 m; distanza sulla file 0.80 m; distanza tra le parcelle 2 m. La tipologia del terreno era a medio impasto. L'irrigazione era effettuata a goccia con manichetta forata. Inoltre sono state effettuate fresature per il controllo delle erbe infestanti.

All'interno di ogni parcella sono state valutate le tre piante centrali che possedevano le caratteristiche ottimali per l'attendibilità dei rilievi. Queste sono state caratterizzate da un punto di vista morfologico secondo i descrittori UPOV definiti da Crinò *et al.* (2008), Ciancolini *et al.* (2012) e riportati in *Fig. 2.4.14* per il carciofo. Per quanto riguarda il cardo non sono stati ancora pubblicati ufficialmente i descrittori in grado di caratterizzare morfologicamente i genotipi. Per questo sono stati effettuati dei rilievi secondo i parametri proposti da Bravi *et al.* (com. personale) di cui i più importanti sono: 1) intensità dei lobi fogliari, 2) lunghezza della costolatura della foglia dalla base al punto in cui diventa larga 2 cm, 3) larghezza della costolatura fogliare a 5 cm ed 4) a 35 cm, 5) spessore della costolatura a 35 cm, 6) profilo della costolatura e 7) presenza di spine sulle costole della foglia.

FARM/LOCATION: _____ ACCESSION: _____ REP: _____ PLANT: _____ DATE: _____
MAIN HEAD: _____ SECOND HEAD(S): _____

PLANT 1. HEIGHT (EXCLUDING CENTRAL FLOWER HEAD) *** cm:		10. NUMBER OF LOBES number:		18. LEAF BLADE BLISTERING *** Absent or very weak 1 ☐ Weak 3 ☐ Medium 5 ☐ Strong 7 ☐ Very strong 9 ☐		25. TIME OF APPEARANCE *** date:		31. WIDTH OF BASE (fig. 35, 36, 37) cm:		41. MICRON (fig. 45) Absent 1 ☐ Present 9 ☐	
2. NUMBER OF LATERAL SHOOTS ON MAIN STEM number:		11. LOBE SHAPE OF TIP (EXCLUDING TERMINAL LOBE) (fig. 13) Acute 1 ☐ Nearly right angle 2 ☐ Obtuse 3 ☐		19. ANTHOCYANIN COLORATION AT BASE Absent or very weak 1 ☐ Weak 3 ☐ Medium 5 ☐ Strong 7 ☐ Very strong 9 ☐		26. ANTHOCYANIN COLORATION OF INNER BRACTS Absent or very weak 1 ☐ Weak 3 ☐ Medium 5 ☐ Strong 7 ☐ Very strong 9 ☐		33. THICKNESS AT BASE (fig. 35, 36, 37) cm:		42. DIAMETER (fig. 48, 49, 50) cm:	
MAIN STEM 3. HEIGHT (EXCLUDING CENTRAL FLOWER HEAD) *** cm:		12. LOBE NUMBER OF SECONDARY LOBES (fig. 14, 15) number:		PETIOLE 19. ANTHOCYANIN COLORATION AT BASE Absent or very weak 1 ☐ Weak 3 ☐ Medium 5 ☐ Strong 7 ☐ Very strong 9 ☐		27. DENSITY OF INNER BRACTS (fig. 47) Sparse 3 ☐ Medium 5 ☐ Dense 7 ☐		34. MAIN SHAPE *** Broader than long 1 ☐ As broad as long 2 ☐ Longer than broad 3 ☐		43. THICKNESS (fig. 48, 49, 50) cm:	
4. DISTANCE BETWEEN THE CENTRAL FLOWER HEAD AND THE YOUNGEST WELL DEVELOPED LEAF (fig. 13, 14) cm:		13. LOBE SHAPE OF TIP IN SECONDARY LOBES (fig. 14, 15) Acuminate 1 ☐ Acute 2 ☐ Rounded 3 ☐		CENTRAL FLOWER HEAD 20. LENGTH cm:		FIRST FLOWER HEAD ON LATERAL SHOOT 28. LENGTH cm:		35. SHAPE OF APEX *** Acute 1 ☐ Flat 2 ☐ Emarginate 3 ☐		44. SHAPE IN LONGITUDINAL SECTION (fig. 48, 49, 50) Flat 1 ☐ Slightly depressed 2 ☐ Strongly depressed 3 ☐	
5. DIAMETER (AT ABOUT 10 CM BELOW CENTRAL FLOWER HEAD) cm:		LEAF BLADE 14. INTENSITY OF GREEN COLOR (UPPER SIDE) Light 3 ☐ Medium 5 ☐ Dark 7 ☐		21. DIAMETER cm:		29. DIAMETER cm:		36. DEPTH OF EMARGINATION *** Shallow 3 ☐ Medium 5 ☐ Deep 7 ☐		45. WEIGHT OF THE CENTRAL FLOWER HEAD g:	
LEAF 6. ATTITUDE *** Erect 1 ☐ Semierect 2 ☐ Horizontal 3 ☐		15. HUE OF GREEN COLOR *** Absent 1 ☐ Yellowish 2 ☐ Greyish 3 ☐		22. SIZE *** cm:		30. SHAPE IN LONGITUDINAL SECTION (fig. 26, 33) Circular 1 ☐ Broad elliptic 2 ☐ Oval 3 ☐ Triangular 4 ☐ Transverse Broad Elliptic 5 ☐		37. COLOR (EXTERNAL SIDE) *** Green 1 ☐ Green striped with violet 2 ☐ Violet striped with green 3 ☐ Mainly violet 4 ☐ Entirely violet 5 ☐		46. WEIGHT OF THE SECONDARY FLOWER HEADS g:	
7. LONG SPINES *** Absent 0 ☐ Present 1 ☐		16. INTENSITY OF GREY HUE Weak 3 ☐ Medium 5 ☐ Strong 7 ☐		23. SHAPE IN LONGITUDINAL SECTION (fig. 26, 33) Circular 1 ☐ Broad elliptic 2 ☐ Oval 3 ☐ Triangular 4 ☐ Transverse Broad Elliptic 5 ☐		38. HUE OF SECONDARY COLOR *** Absent 3 ☐ Bronze 5 ☐ Grey 7 ☐		47. HARVESTING DATE OF THE SECONDARY FLOWER HEADS date:		48. TOTAL NUMBER OF FLOWER HEADS number:	
8. LENGTH cm:		17. INTENSITY OF HARRISNESS ON UPPER SIDE *** Absent or very weak 1 ☐ Weak 3 ☐ Medium 5 ☐ Strong 7 ☐ Very strong 9 ☐		24. SHAPE OF TIP *** Acute 1 ☐ Rounded 2 ☐ Flat 3 ☐ Depressed 4 ☐		OUTER BRACT 1st Head 31. LENGTH OF BASE (fig. 35, 36, 37) cm:		39. REFLEXING OF TIP Absent 0 ☐ Present 1 ☐		49. TOTAL WEIGHT OF FLOWER HEADS excluding central and secondary heads g:	
9. LOBBING/ETCHINGS *** Absent 0 ☐ Present 1 ☐											

NB: THE SAMPLE MUST BE TAKEN FROM FIVE PLANTS OF EACH ACCESSION WHEN THE FLOWER HEAD IS RIPE

Fig. 2.4.14 – Scheda utilizzata per la caratterizzazione del carciofo estratta da “Protocol of Globe Artichoke” – European Union CPVO (2004).

Tutti i parametri di valutazione del cardo saranno ben dettagliati nel capitolo “Obiettivo a lungo termine: Ibridazioni - 2.5.2 Materiali e metodi - b. Caratterizzazione parentali”.

2.4.3 RISULTATI

a) Tecnica ottimale

I risultati ottenuti nella preparazione del materiale vegetale ottimale per un buon innesto e quindi un ipocotile ben allungato sono stati illustrati dalla *tabella 2.4.1*.

Tab. 2.4.1 – Giorni intercorrenti dalla semina all’ottenimento di un buon sviluppo dell’ipocotile.

Genotipi	Giorni dalla semina
Istar	8,3 b
Romolo	5,1 a
Cardo coltivato	8,1 b
Cardo selvatico	12,3 c
A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti per P = 0,05 (Test di Duncan)	

L'identificazione della tecnica d'innesto migliore da applicare su carciofo/cardo per il controllo della tracheomicosi è uno dei punti fondamentali del lavoro. La tecnica a spacco inglese, nel carciofo, ha assicurato innesti ben riusciti perché il taglio è stato realizzato sotto i cotiledoni in modo da ridurre l'emissione di germogli secondari dal rizoma del cardo. Ciò ha evitato l'esigenza di eliminare i germogli secondari, pratica agronomica abbastanza costosa.

La problematica dell'emissione di germogli laterali provenienti dal portainnesto è invece uno svantaggio constatato nell'innesto a spacco in testa. Il germoglio che nasce alla base del cotiledone del cardo ha di solito una vigoria maggiore rispetto al nastro attecchito, portando di solito questo alla sua morte oppure impedendo l'attecchimento dell'innesto mediante una riduzione dell'adesione fra i due bionti (*Fig. 2.4.15*).



Fig. 2.4.15 – Emissione di germogli laterali dal portainnesto.

Allo stesso tempo l'innesto a spacco inglese non è del tutto privo di problematiche in quanto, anche se non presenta il problema dell'emissione dei germogli, è estremamente delicato e più soggetto a disidratazione. Oltre a questo, in alcuni casi è stato riscontrato il problema dell'affrancamento del nastro. L'affrancamento consiste nell'emissione di radici da parte del nastro, annullando in tal modo l'effetto dell'innesto e generando una pianta normale (*Fig. 2.4.16*).

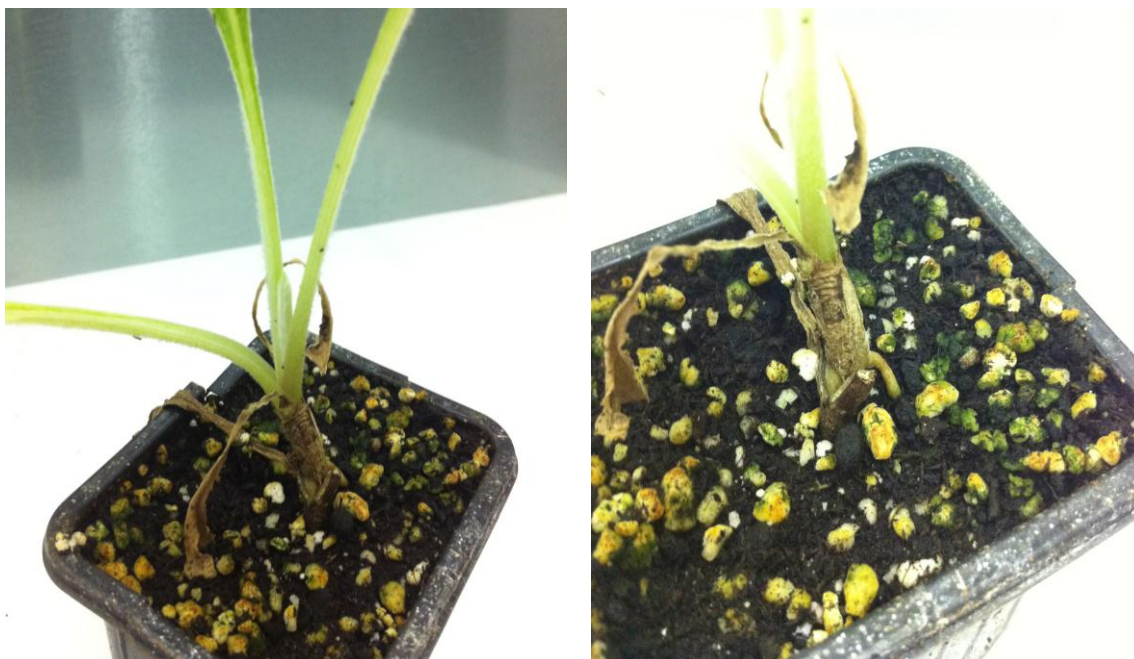


Fig. 2.4.16 – Affrancamento del nesto ed emissione di radici.

La percentuale di attecchimento medie sono dell'80% nel caso dell'Istar e del 75% del Romolo, percentuali paragonabili a quella ottenuta in esperimenti precedenti (Temperini *et al.*, 2009).

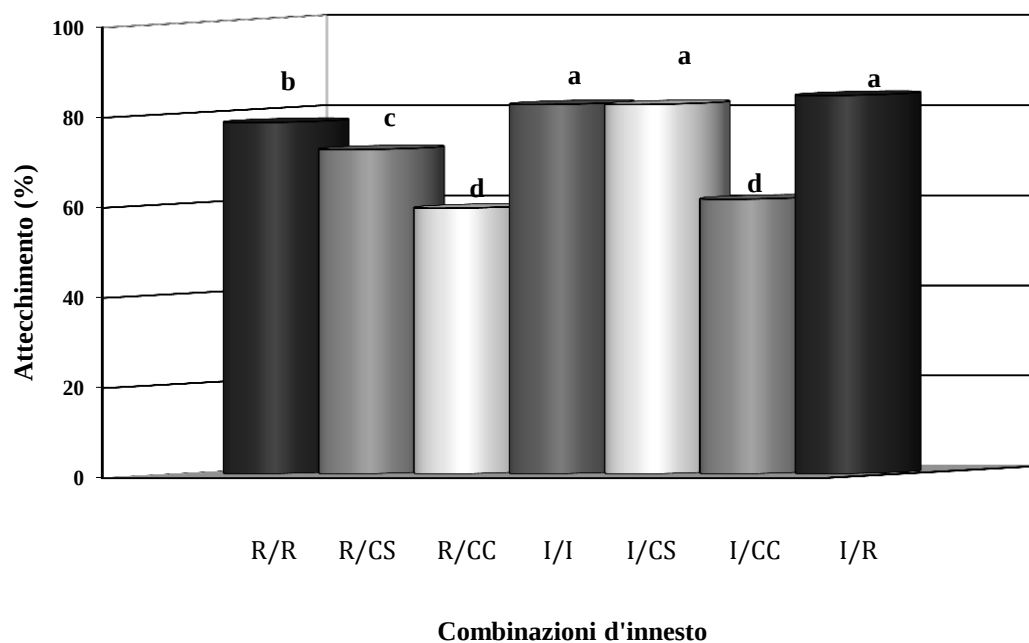


Fig. 2.4.17 – Percentuali di attecchimento delle diverse combinazioni d'innesto.

Non sono state osservate differenze significative tra le due diverse tipologie d'innesto e tra le due combinazioni considerate (I/WC e I/CC).

Il cardo coltivato è risultato più efficace nell'adattamento d'innesto (75%) rispetto al cardo selvatico (60%), probabilmente a causa delle dimensioni gambo simile a quella della cultivar commerciale carciofo. Al contrario, il cardo selvatico è stato caratterizzato da un fusto più piccolo che ha creato maggiori problemi al momento dell'unione tra i due bionti. Anticipando di una settimana la semina del portinnesto selvatico Sardo (WC), rispetto a quella dell'Istar, del Romolo (A) e del Bianco gigante inerme (portainnesto coltivato CC), si risolve questo problema, ottenendo piantine delle stesse dimensioni e quindi ottimali per ottenere un buon innesto (*Fig. 2.4.17*).

b) Esperimento primaverile ed autunnale

Le immagini al SEM riportano gli stessi risultati ottenuti per le tre repliche effettuate e per ciascuna combinazione. Come già descritto, le immagini del microscopio a scansione di elettroni secondari sono state eseguite a pressione variabile e alle seguenti condizioni: EHT: 20 kV; pressione: 25.0 Pa; WD: 25-15 mm.

- Esperimento primaverile: in *figura 2.4.18* sono riportati i risultati delle analisi al SEM in modalità SE-VP ottenuti durante la formazione dell'unione tra i due bionti fino al dodicesimo giorno dall'innesto, per confrontare la compatibilità nelle combinazioni studiate R/R, R/CC e R/WC.

La cicatrizzazione dell'innesto sembra essere influenzata dalla tipologia della combinazione nesto/portinnesto. A questo proposito, come prevedibile, la combinazione utilizzata come controllo R/R ha mostrato la più alta affinità tra i tessuti dei due bionti. Questo è stato confermato dalla comparsa di ponti orizzontali (hb), strutture trasversali che collegano e nesto/portainnesto favorendo il loro avvicinamento, già a soli 3 giorni dopo l'innesto (*Fig. 2.4.18 A e B*).

Il successivo riarrangiamento dei tessuti che porta alla formazione di un callo parenchimatico cicatrizzale (c) e ad una unione finale nesto/portainnesto (gj), corrisponde all'unione longitudinale completa dei tessuti che ha avuto luogo 10-12 giorni dopo l'innesto (*Fig. 2.4.18 C e D*).

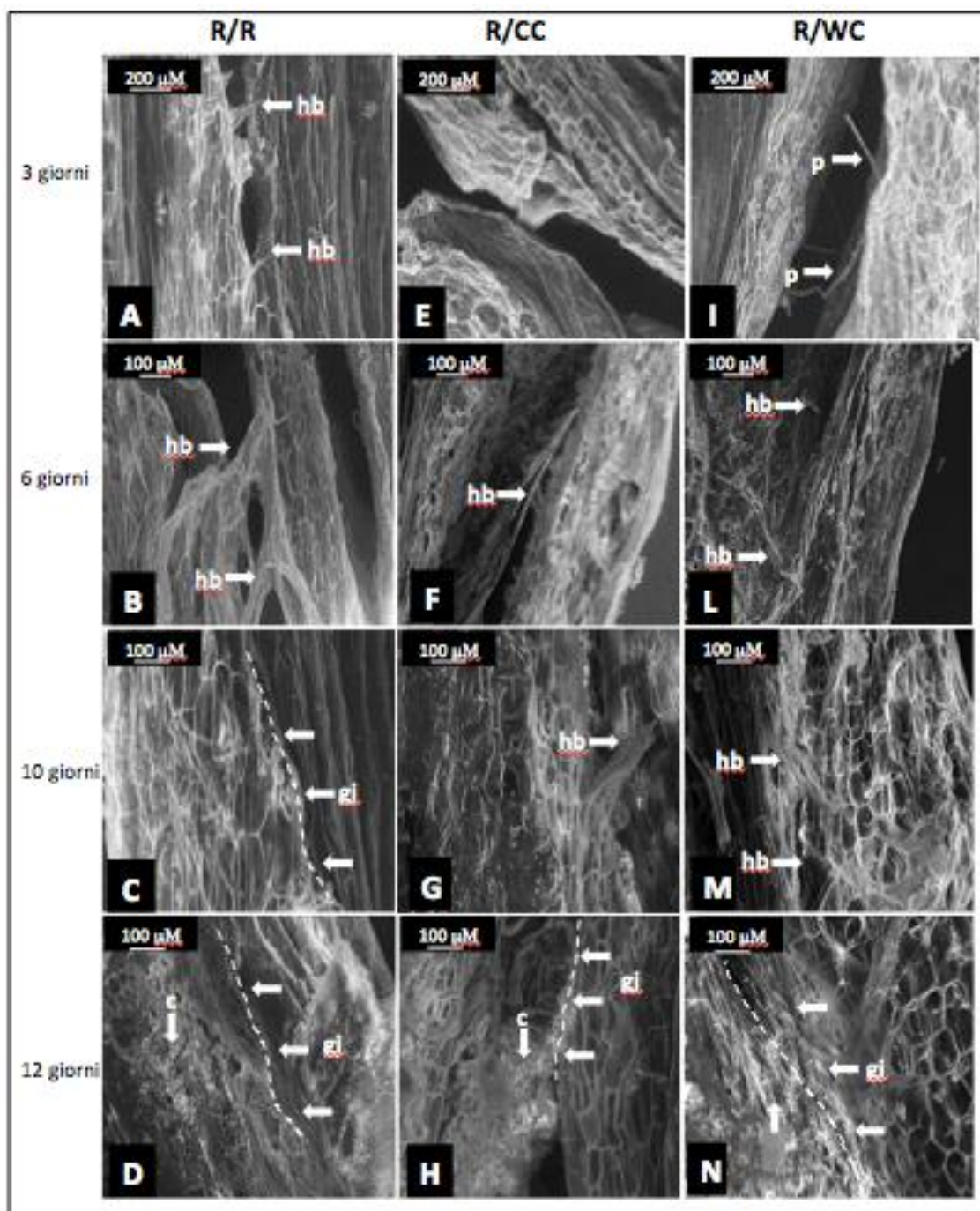


Fig. 2.4.18 – Formazione dell'unione d'innesto tra R/R (A-D), R/CC (E-H) e R/WC (I-N) al 3°, 6° 10° e 12° giorno dell'esperimento primaverile.

La combinazione d'innesto R/CC ha manifestato un'affinità leggermente ridotta. Infatti a 3 giorni dall'innesto, non sono stati rilevati plasmodesmi (*Fig. 2.4.18 E*) e la formazione di ponti orizzontali strutturati è stata osservata solo al sesto ed al decimo giorno dopo l'innesto (*Fig. 2.4.18 G*). Al 12° giorno si è ottenuta solo una parziale unione d'innesto (*Fig. 2.4.18 H*).

Nella combinazione R/WC è stata riscontrata un'alta affinità tra il nesto ed il portainnesto. Già dal 3° giorno dopo l'innesto sono ben visibili alcune connessioni filamentose tra i due bionti (*Fig. 2.4.18 I*) che al 6° giorno si evolvono a formare il primo hb (*Fig. 2.4.18 L*). Al 10° giorno sono stati creati ulteriori hb (*Fig. 2.4.18 M*) in corrispondenza del punto di unione nesto/portainnesto, oltre anche alla proliferazione di callo tra tessuti adiacenti coinvolti nell'innesto. La differenziazione dei tessuti nel punto di unione è stata osservata al 12° giorno dall'innesto, quando è avvenuta la completa saldatura dei bionti (*Fig. 2.4.18 N*).

Nell'esperimento primaverile, a 3-6 giorni dall'innesto, sono state osservate alcune strutture filamentose tra il cardo (portinnesto) ed il carciofo (nesto A), prima della formazione dei ponti e del callo, allo scopo di generare un primo contatto tra i diversi tessuti (*Fig. 2.4.19*).

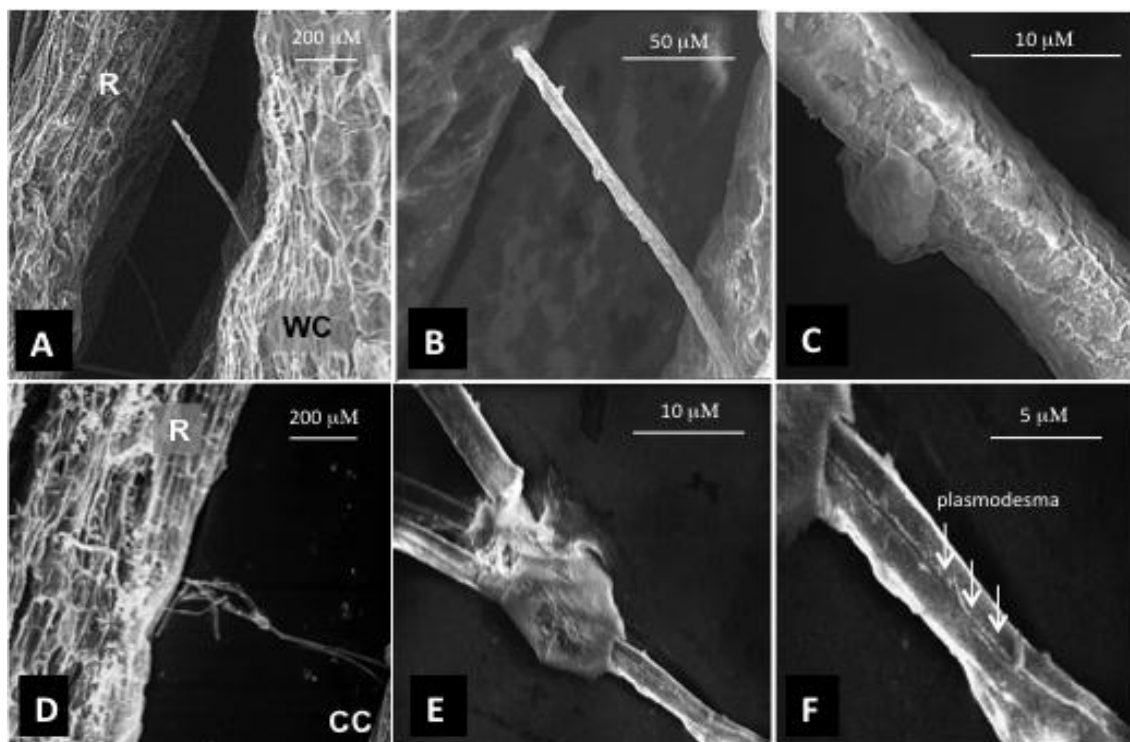


Fig. 2.4.19 – SEM (SE-VP) immagini di interconnessioni tra portinnesto e nesto nelle combinazioni R/WC (A-C) e R/CC (D-F) dopo 3 giorni dall'innesto. L'ingrandimento mostra le caratteristiche strutturali delle interconnessioni filamentose e la presenza di materiali lipidici/cerosi sulla loro superficie.

È interessante notare che queste strutture filamentose isolate sono state riscontrate solo nelle combinazioni R/WC (*Fig. 2.4.19 A-C*) e R/CC (*Fig. 2.4.19 D-F*) e non nella combinazione R/R. Questo è probabilmente dovuto al fatto che, nella combinazione R/R, gli hb si sono formati così velocemente da impedire la loro visione.

La maggior parte degli autori considerano che un innesto può essere attecchito completamente solo quando la vascolarizzazione floematica e xilematica vengono ripristinate attraverso l'interfaccia dell'innesto, tramite le connessioni cellulari e citoplasmatiche denominate plasmodesmi. La loro formazione è stata documentata in diversi sistemi vegetali e da svariate ricerche (Kollmann e Glockmann 1985 e 1991, Botha e Van Bel 1992, Roberts e Oparka 2003, Aloni *et al.* 2008 e Martínez- Ballesta *et al.* 2010). In termini generali, i plasmodesmi sono implicati nel trasporto simplastico di materiali tra cellule nelle piante viventi. Durante il processo d'innesto, la proliferazione del callo, massa amorfa indifferenziata costituita da cellule parenchimatiche a parete sottile, precede la formazione di plasmodesmi al suo interno per consentire il trasporto simplastico (Botha e Van Bel 1992 e Pina *et al.* 2009). Le cellule complesse della parete, che rappresentano l'interfaccia dell'innesto, sono pareti non in divisione che in origine consistevano delle pareti appartenenti a cellule opposte e poi fuse. Alcuni autori riportano che la metà dei plasmodesmi è in grado di penetrare nella complessa e spessa parete preesistente da un lato o da entrambi della cellula attraverso un meccanismo enzimatico ancora non ben compreso (Yang e Glockmann, 1985). Kollmann e Glockmann (1991) hanno riscontrato che le cellule dei plasmodesmi di interconnessione attraverso i composti delle pareti si sarebbero formate secondariamente, dopo la proliferazione del callo nei tessuti di unione, ma allo stesso modo di come si creano le connessioni cellulari primarie. Pina *et al.* (2009) hanno evidenziato il ruolo funzionale dei plasmodesmi nell'interfaccia dell'innesto che indica una forte affinità tra le specie e le differenze relative allo sviluppo nella conducibilità del plasmodesma.

In realtà i plasmodesmi sembrano agire come fattori iniziali di controllo della connettività che raggiunge l'altro bionte dell'innesto e promuovono la sua capacità di comunicazione. Tuttavia la maggior parte degli studi esistenti non hanno evidenziato quanto accade nella fase iniziale dell'innesto, cioè prima della formazione del callo. Studiare le trasformazioni anatomiche nell'interfaccia nesto/portainnesto già 3 giorni dopo l'innesto ha permesso di osservare in anticipo la formazione dei plasmodesmi. Durante questa fase, i tessuti dei due bionti sono ancora ben distinguibili e la compatibilità tra i partner d'innesto deve ancora essere testata. In *Prunus* spp. la formazione del callo è avvenuta indipendentemente dalla compatibilità nesto/portainnesto in quanto è stata ripristinata la comunicazione cellula-cellula attraverso la formazione di nuovi plasmodesmi, che garantiscono chiaramente la compatibilità dei tessuti (Pina *et al.*, 2012).

Normalmente i plasmodesmi di piante secondarie, che compaiono durante l'estensione della parete cellulare, hanno un diametro tra 20 e 100 μm . Nel nostro esperimento le strutture filamentose formate tra cardo (portinnesto) e carciofo (nesto) avevano un diametro di circa 3-8 μm (*Fig. 2.4.19 A, B, D, ed E*). Queste prime interconnessioni cellulari, con una forma tubolare simile a proiezioni della parete cellulare, svolgono un ruolo attivo nel promuovere il riconoscimento cellulare dell'opposto tessuto cambiale (Miller e Barnett, 1993). Più precisamente sono dei desmotubuli, strutture interne ai plasmodesmi che gli forniscono stabilità e rigidità, conferendogli un diametro fisso e regolando la dimensione dei pori del canale del plasmodesma come farebbe una struttura fissa (citoscheletro). White (1994) ha trovato una rete actinica-miosinica associata ai plasmodesmi, mentre Overall e Blackman (1996) hanno verificato che questa rete proteica avvolge tutto intorno i desmotubuli conferendogli una stabilità strutturale, che di conseguenza è trasmessa all'intero del plasmodesma. Sorprendentemente nel nostro esperimento d'innesto la comparsa di queste strutture di grande diametro suggerisce che sono state formate nuove proiezioni dalla parete cellulare (macrotubuli esterni), già a 3 giorni dopo l'innesto, per promuovere il contatto iniziale e forse lo scambio di sostanze tra le membrane cellulari. Questo meccanismo di prime interconnessioni tra portainnesto e nests, che anticipano la formazione del callo, potrebbe essere dovuto alla necessità di cellule adiacenti di consentire il flusso dell'acqua e dei nutrienti, ma molto probabilmente anche a favorire lo scambio di molecole di segnalazione per la verifica della compatibilità dell'innesto. La presenza di un canale di diametro inferiore a 100 μm , localizzata in questa macrostruttura tubolare e derivante da proiezioni della parete cellulare (*Fig. 2.4.19 F*), suggerisce che questo materiale probabilmente esercita una funzione stabilizzante delle stesse strutture, da considerare quindi, come i putativi precursori dei plasmodesmi (Jeffree e Yeoman, 1983).

L'ingrandimento delle interconnessioni riscontrate tra portinnesto e nests ha anche mostrato un accumulo di materiale apparentemente lipidico o ceroso sulla loro superficie (*Fig. 2.4.19 C*), che si suppone possa agire come una custodia protettiva per resistere alle sollecitazioni meccaniche.

Considerando come affinità di riferimento quella della combinazione d'innesto R/R, dai risultati emerge che R/WC dovrebbe essere la combinazione d'innesto più promettente, avendo un'affinità innesto molto simile a quella osservata per R/R.

- Esperimento autunnale: sulla base dei precedenti risultati primaverili, l'esperimento d'innesto è stato ripetuto in autunno sulle stesse combinazioni per determinare se le condizioni climatiche possono influenzare i tempi di cicatrizzazione dell'innesto.

Anche in questo esperimento (*Fig. 2.4.20*), la combinazione R/R ha mostrato la prima formazione di ponti orizzontali appena dopo 3 giorni e una giunzione a 6 giorni dopo l'innesto (*Fig. 2.4. 20 A e B*). L'aspetto interessante dell'abbondante proliferazione di callo sui tessuti adiacenti al punto di unione dell'innesto garantisce un processo completo di collegamento tra nesto e portainnesto (*Fig. 2.4. 20 D*). Riguardo alla combinazione d'innesto R/CC, anche in questo caso le strutture di interconnessione sono apparse al 3° giorno dopo l'innesto (*Fig. 2.4. 20 E*), sebbene la giunzione sia risultata ben formata solo dopo 10 giorni dell'esperimento (*Fig. 2.4. 20 G*). Una situazione simile è stata riscontrata anche per la combinazione R/WC che ha mostrato una buona affinità tra portinnesto e nesto. La formazione della giunzione è stata completata dopo 10 giorni (*Fig. 2.4. 20 M*) e la proliferazione del callo nei tessuti adiacenti (*Fig. 2.4. 20 N*) è stata più abbondante rispetto a quella prodotta nella combinazione R/CC (*Fig. 2.4. 20 H*).

L'esperimento autunnale ha confermato quanto era già stato rilevato nell'esperimento primaverile. L'affinità tra Romolo e cardo coltivato - selvatico è simile, anche se una leggera preferenza per i genotipi WC si potrebbe supporre a causa della maggiore proliferazione di callo nel punto d'unione dell'innesto.

- Comparazione degli esperimenti: guardando l'interfaccia di unione tra i due bionti mediante analisi SEM ed attraverso i rivelatori BSE-VP e SE-VP, tra gli eventi cellulari iniziali rivelati durante i primi giorni dall'innesto, alla fine dell'esperimento primaverile e solo per la combinazione R/WC, troviamo che il parenchima calloso formato era coperto da uno strato non uniforme di tante piccole gocce di una sostanza opalescente (*Fig. 2.4.21*).

Alcuni studi hanno rivelato che, nelle piante superiori, l'adesione delle cellule tra nesto e portinnesto è favorita dall'attivazione di dictiosomi dell'apparato del Golgi delle cellule coinvolte nel processo d'innesto e capaci di secernere un mix di pectine, carboidrati e proteine all'interfaccia dell'innesto (Moore e Walker, 1981).

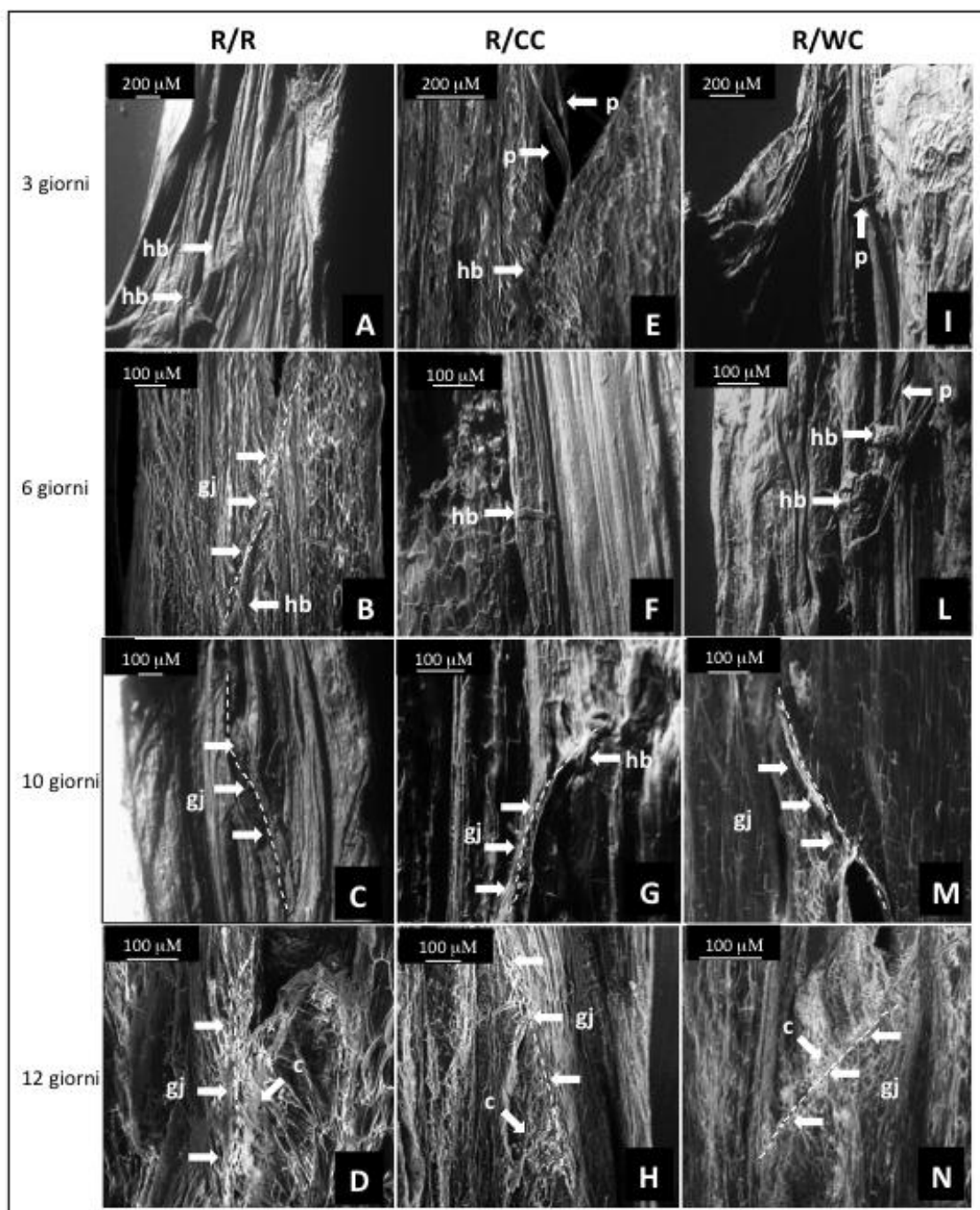


Fig. 2.4. 20 – Formazione dell'unione d'innesto tra le combinazioni R/R (A-D), R/CC (E-H) e R/WC (I-N) al 3°, 6°, 10° e 12° giorno dell'esperimento autunnale.

L'accumulo di sostanze pectiche sulla parete cellulare dei tessuti opposti, durante la prima settimana dopo l'innesto, è stata anche visualizzata tramite colorazione con rosso rutenio (ruthenium) (Pina *et al.*, 2012). In *figura 2.4.21 A e B*, viene mostrata la matrice gelatinosa colloidale del materiale depositato sul callo la cui possibile composizione chimica è costituita da pectine e carboidrati.

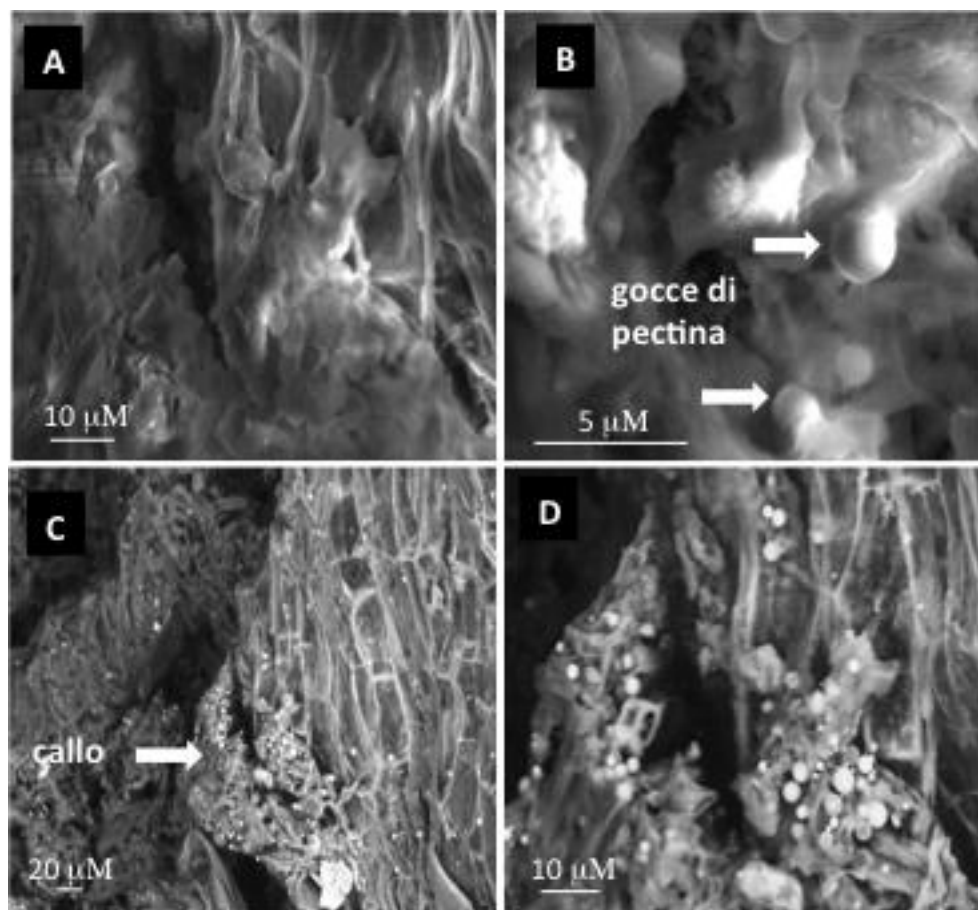


Fig. 2.4.21 – Immagini ottenute con elettroni secondari (SE-VP, A e B) e “back-scattered” (BSE-VP, C e D) della combinazione R/WC a 12 giorni dall’innesto della prova primaverile.

Inoltre, la microscopia BSE-VP ha evidenziato una composizione diversa delle gocce rispetto al callo sottostante. In *figura 2.4.21 C e D*, i campi scuri indicano la presenza di sostanze complesse ad alto peso atomico mentre i segmenti luminosi vengono generalmente assegnati prevalentemente a sostanze con basso peso atomico. Il colore bianco osservato nelle gocce sulla superficie callosa suggerisce che esse sono costituite da specie atomiche riconducibili a componenti organici principali di carboidrati e composti ad essi vicini.

La presenza di gocce colloidali sull’interfaccia dell’innesto è stata osservata solo nella combinazione R/WC e solo nell’esperimento primaverile. Questo ha dimostrato il ruolo che svolgono le condizioni climatiche nel processo d’innesto che è stato influenzato da una serie di temperature elevate e un fotoperiodo leggermente diverso da quello naturale. In realtà, confrontando lo sviluppo dell’innesto nei due esperimenti (*Figg. 2.4.18 e 2.4.20*), è stato notato che:

- in autunno le strutture a ponte orizzontale tra A e CC si sono formate già dopo 3 giorni dall'innesto mentre, nell'esperimento primaverile, sono state riscontrate solo dopo 6 giorni per entrambe le combinazioni carciofo/cardo;

- in primavera, l'unione dell'innesto A/WC non si è verificata prima di 12 giorni dando origine ad un abbondante callo indifferenziato che ha tenuto insieme i tessuti delle cellule dei due bionti. Invece in autunno, la nuova differenziazione cambiale, è iniziata dopo appena 10 giorni dall'innesto, con una riduzione evidente della proliferazione di callo nel punto di innesto. Questo ci ha dimostrato un'elevata affinità tra A e WC, espressa in condizioni ambientali ottimali.

In termini generali, possiamo dire che la formazione dell'unione d'innesto tra carciofo e cardo è stata favorita dalle condizioni ambientali autunnali. Questi risultati sono stati confermati anche da una diversa percentuale di successo nell'attecchimento, che è stata di circa il 68% nell'esperimento primaverile, contro circa l'87% ottenuto nell'esperimento autunnale (Trinchera *et al.*, 2013; Temperini *et al.*, 2013).

Una sintesi schematica delle fasi individuate nel processo d'innesto carciofo su cardo coltivato o selvatico è riportata in *figura 2.4.21*. In primo luogo, durante i primi 3 giorni, il nesto e portinnesto hanno iniziato un avvicinamento tra loro attraverso l'emissione di proiezioni tubolari (i "macrotubuli").

Nell'interfaccia d'innesto, è quindi avvenuto, per mezzo di queste strutture, un riconoscimento reciproco delle cellule dei due bionti. Questa fase ha permesso la riduzione della distanza tra i tessuti opposti e, probabilmente, ha promosso lo scambio di molecole di segnalazione. La presenza di un canale interno alle strutture macrotubolari, di diametro inferiore a 100 μm (simile ad un plasmodesma, *fig. 2.4.19 F*), sembra sostenere questa ipotesi che dovrà però, essere confermata da ulteriori indagini.

Durante il 3° e 10° giorno dopo l'innesto, la connessione iniziale tra portainnesto e nesto è avvenuta con la formazione di diversi ponti orizzontali (*Fig. 2.4.22*) che rappresentano il primo scheletro delle cellule indifferenziate del callo sviluppato in risposta alla ferita.

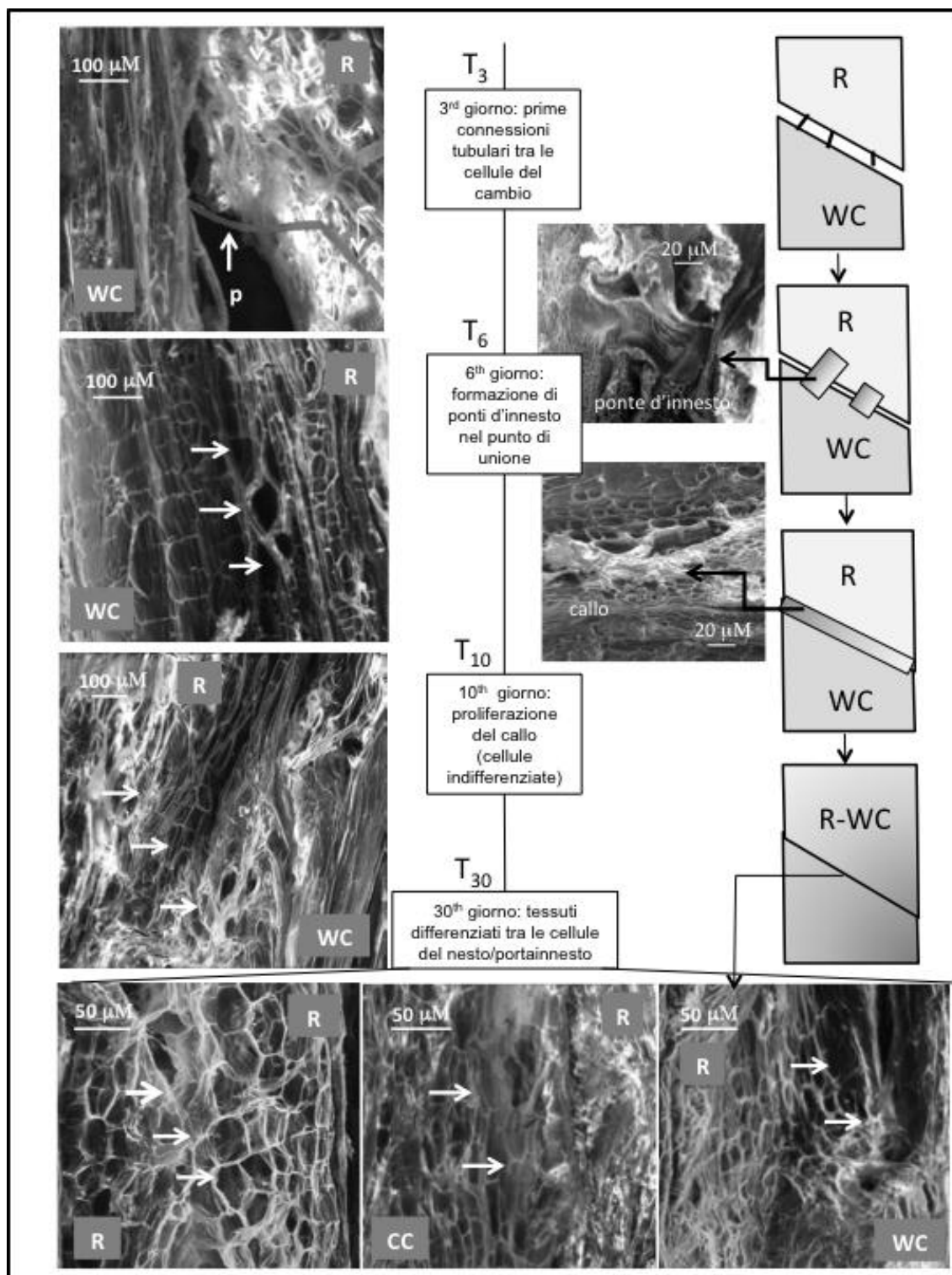


Fig. 2.4.22 – Rappresentazione schematica della cicatrizzazione dell'innesto tra carciofo e cardo selvatico e le immagini correlate al SEM delle combinazioni R/R, R/CC e R/WC. Le immagini del T₃₀ sono legate all'esperimento autunnale.

Tra il 10° e il 12° giorno, la proliferazione del callo è avvenuta senza un riarrangiamento istologico ordinato delle cellule nesto/portinnesto. Va notato che l'adesione e la successiva proliferazione di callo durante le prime due settimane

d'innesto, non ha garantito la compatibilità tra le diverse combinazioni; infatti questi processi potrebbero verificarsi anche tra partner incompatibili all'innesto (Pina *et al.*, 2012).

Per valutare correttamente e stabilmente la cicatrizzazione dell'innesto, dovrebbe essere verificata la formazione di un nuovo tessuto cambiale derivante dal callo nell'interfaccia necto/portainnesto. La costituzione della comunicazione cellula/cellula attraverso la connettività dei plasmodesmi è comunque generalmente ritardata nelle unioni incompatibili. Dopo 30 giorni, la differenziazione cellulare del callo e una buona ridistribuzione del tessuto è indice di combinazioni compatibili. Il ripristino della vascolarizzazione e la formazione di nuovo tessuto cambiale garantiscono il flusso d'acqua/nutrienti e la comunicazione tra le cellule dei due bionti. Tutte queste caratteristiche sono indice di una cicatrizzazione avvenuta con successo.

Nel nostro esperimento, il callo si è sviluppato in un tessuto cambiale più ordinato solo per le combinazioni R/R e R/WC; mentre per la combinazione R/CC, dopo 30 giorni in corrispondenza del punto d'innesto, è stato osservato un accumulo di cellule indifferenziate (*Fig. 2.4.22*).

c) Confronto tra le tecniche

È stata seguita l'evoluzione dell'innesto a spacco inglese fino alla formazione dell'unione nelle combinazioni A/A, A/CC e A/WC per i 60 giorni successivi. Nella *figura 2.4.23*, le immagini al SEM dimostrano la formazione di giunzioni d'innesto (gj) già durante i primi 30 giorni. Nella combinazione A/A, dopo quattro giorni dall'innesto, si genera un efficace avvicinamento tra portinnesto e necto ed i tessuti sembrano parzialmente fusi insieme (*Fig. 2.4.23 a*). Nessun plasmodesma (Trinchera *et al.*, 2013) è stato riscontrato durante questa prima fase d'innesto, in quanto evidentemente la formazione dell'unione (gj) è avvenuta così velocemente da impedire il rilevamento di tali strutture filamentose intermedie. Come precedentemente riportato, i plasmodesmi sono coinvolti nel trasporto simplastico di materiali tra le cellule nelle piante viventi.

Normalmente, durante il processo d'innesto, la formazione del callo (massa amorfa indifferenziata costituita da cellule parenchimatiche a parete sottile) precede quella dei plasmodesmi, interni al tessuto calloso, per promuovere il trasporto simplastico (Botha e Van Bel, 1992; Pina *et al.*, 2009).

Come riportato da Trinchera *et al.* (2013), la comparsa di plasmodesmi, come prime interconnessioni tra i due bionti, è stata rilevata in anticipo rispetto al riarrangiamento dei tessuti vascolari e allo sviluppo del callo nella formazione

dell'unione d'innesto nelle diverse combinazioni cardo/carciofo. Probabilmente la formazione dei plasmodesmi (p) non è stata facilmente identificabile nella combinazione A/A, data l'elevata affinità aspettata e verificata tra nesto e portainnesto. Dopo 6 giorni dall'innesto (*Fig. 2.4.23 b*), è stato riscontrato un completo incastro tra i tessuti nel punto di giunzione (gj) e la formazione di una cicatrice senza la presenza di callo (c). Anche dopo 10 giorni (*Fig. 2.4.23 c*), è stata osservata una regolare interconnessione tra le cellule parenchimatiche e un'assenza di proliferazione di callo sulla ferita; la creazione di connessioni cellulari primarie è stata completamente raggiunta solo dopo 30 giorni dall'innesto (*Fig. 2.4.23 d*).

Nelle combinazioni A/CC e A/WC, i plasmodesmi (p) sono apparsi dopo 4 e 6 giorni nell'innesto a spacco inglese (*Fig. 2.4.23 e, i e l*), mostrando quindi un'affinità leggermente ridotta tra i portinnesti ed i nesti.

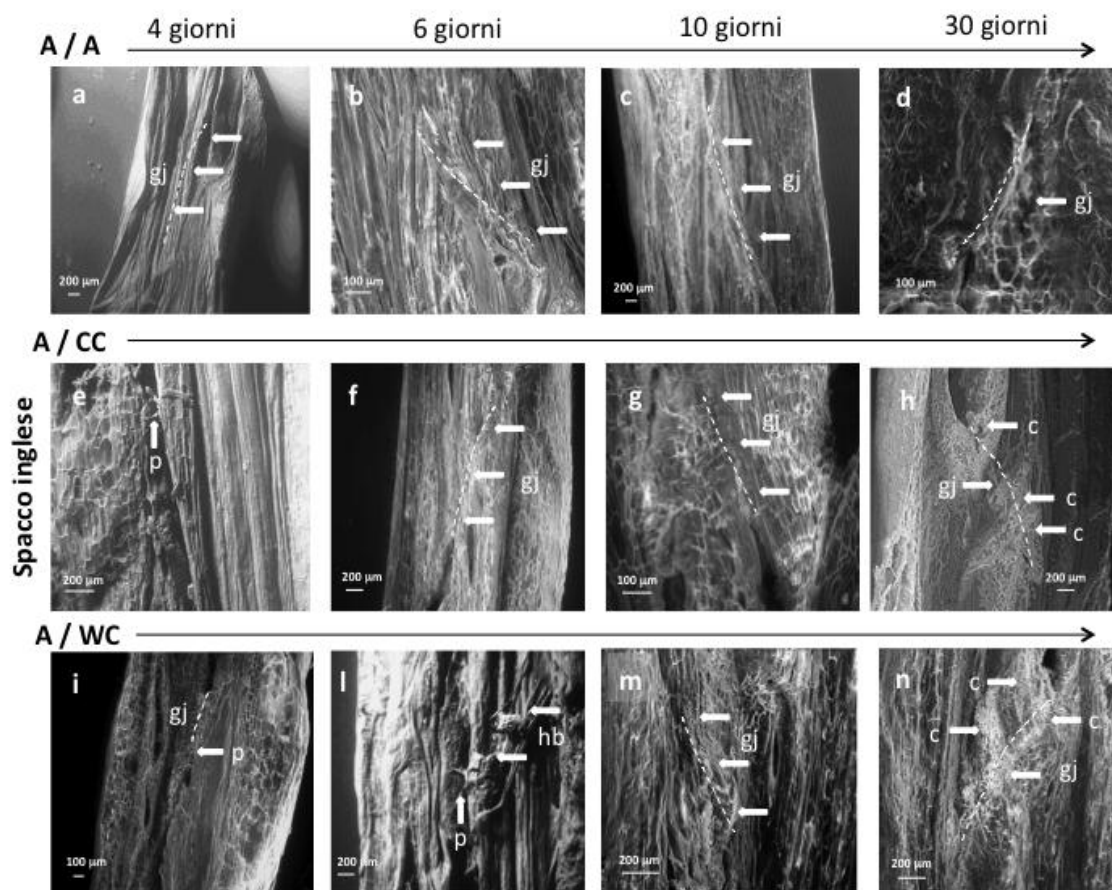


Fig. 2.4.23 – Formazione dell'unione d'innesto a spacco inglese tra le combinazioni A/A (a-d), A/CC (e-h) e A/WC (i-n) al 4°, 6°, 10° e 30° giorno.

Questo ha avuto un ruolo anche nella formazione dell'unione innesto (gj) che è avvenuta dopo 6 giorni nel caso del portainnesto cardo coltivato (*Fig. 2.4.23 f*) e dopo 10 giorni (*Fig. 2.4.23 m*) con il cardo selvatico.

Anche la comparsa di alcuni ponti orizzontali (hb), rilevati in A/WC dopo 6 giorni sulla porzione dei tessuti innestati (*Fig. 2.4.23 l*), attesta che il processo d'innesto è stato meno efficace e veloce in questa combinazione rispetto a quella A/A. Inoltre, in entrambe le combinazioni A/CC e A/WC, in corrispondenza della giunzione d'innesto (gj), c'è stata una notevole proliferazione di callo (c), essendo questa anche visibilmente abbondante sui tessuti dopo 30 giorni dall'innesto (*Fig. 2.4.23 h e n*).

Nell'innesto a spacco in testa della combinazione A/A, la formazione dei primi ponti orizzontali e l'unione parziale tra i due bionti sono stati osservati appena dopo 3 giorni (*Fig. 2.4.24 a*). Allo stesso tempo, l'unione d'innesto è stata completata dopo 6 giorni (*Fig. 2.4.24 b*) mostrando una continuità chiara dei tessuti riscontrata dopo 10 giorni (*Fig. 2.4.24 c*) ed il successivo ripristino delle connessioni vascolari ottenuto al 30° giorno dall'innesto (*Fig. 2.4.24 d*).

Nella combinazione A/CC, dopo 3 giorni, non sono stati rilevati né plasmodesmi né ponti orizzontali (*Fig. 2.4.24 e*); dopo 6 giorni, è stata invece realizzata una quasi completa unione d'innesto (*Fig. 2.4.24 f*). È interessante notare che in entrambi i tessuti del portainnesto e nesto, dopo 10 giorni, è stata individuata una piccola quantità di callo parenchimatoso nel punto unione (*Fig. 2.4.24 g*). Comunque dei ponti orizzontali e una certa interconnessione vascolare è avvenuta dopo 30 giorni dall'innesto anche nella combinazione carciofo/cardo coltivato (*Fig. 2.4.24 h*), a conferma di una buona affinità tra questi genotipi.

Analizzando l'innesto A/WC, è stato notato che il processo tende ad essere più veloce dal momento che, già dopo 3 giorni, sono stati riscontrati i primi ponti orizzontali. Subito dopo c'è stata una parziale formazione della giunzione d'innesto (*Fig. 2.4.24 i*), del tutto simile a quanto accaduto nella combinazione A/A. La formazione dei ponti orizzontali è continuata anche dopo 6 giorni (*Fig. 2.4.24 l*), ma la completa unione dei bionti c'è stata solo dopo il 10° giorno (*Fig. 2.4.24 m*) con la comparsa di una piccola quantità di callo sui tessuti dell'innesto. Al 30° giorno d'innesto, erano ancora rilevabili i ponti orizzontali e la proliferazione del parenchima calloso era aumentata.

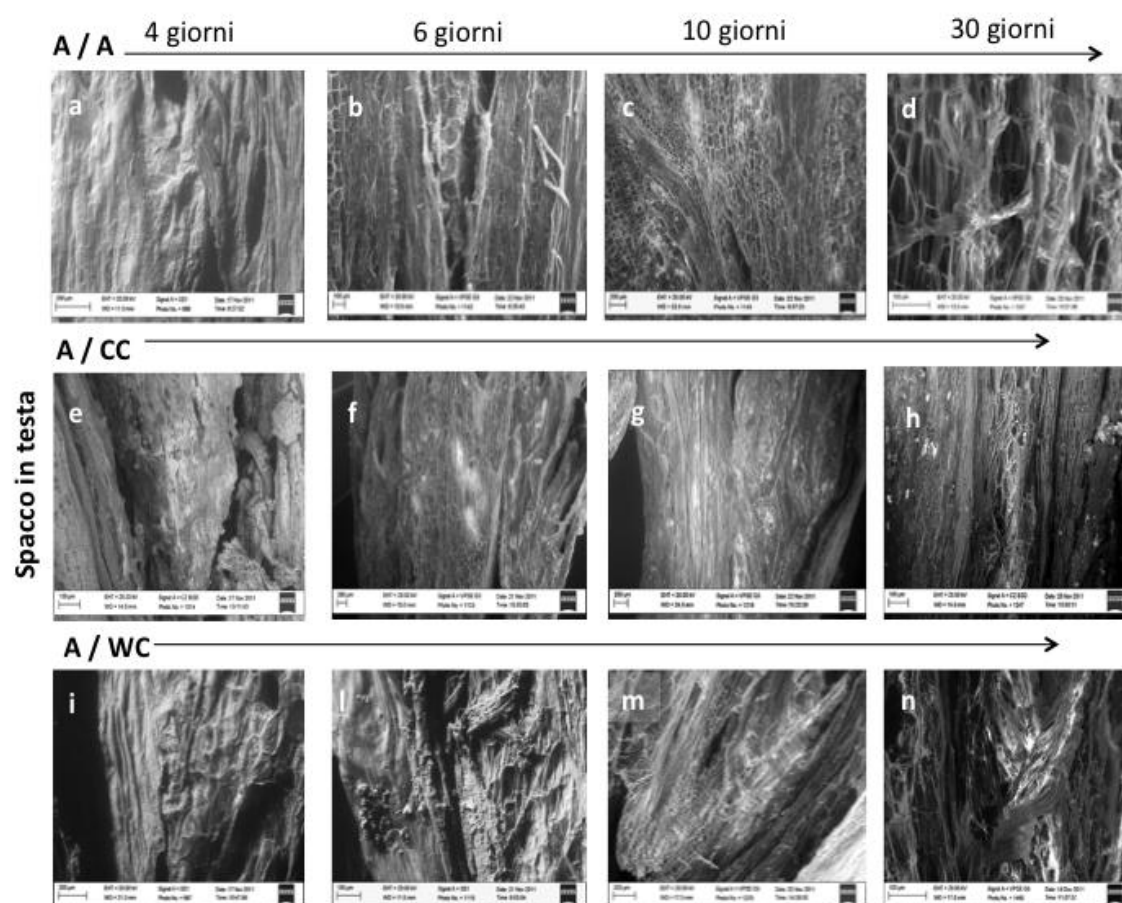


Fig. 2.4.24 – Formazione dell'unione d'innesto a spacco in testa tra le combinazioni A/A (a-d), A/CC (e-h) e A/WC (i-n) al 4°, 6°, 10° e 30° giorno.

Il confronto tra le due tecniche alternative d'innesto ha permesso di mettere in evidenza diverse importanti osservazioni. In primo luogo, entrambi hanno confermato la seguente "scala di affinità": $A/A > A/WC > A/CC$, come attestato dalla comparsa della giunzione d'innesto dopo rispettivamente 4 (in A/A e le combinazioni A/WC) e 6 giorni (in A/CC). In secondo luogo, nella tecnica a spacco inglese, la formazione dell'unione d'innesto è stata preceduta dalla formazione dei plasmodesmi tra i tessuti opposti nelle combinazioni A/C e A/WC. Nella tecnica a spacco in testa, per le stesse combinazioni, non è stato invece possibile rilevarli, probabilmente a causa del processo di unione d'innesto avvenuto più velocemente che nello spacco inglese. Tutto ciò forse a causa della maggiore superficie di contatto tra bionti che ha favorito la prima formazione dei ponti orizzontali (hb, *Fig. 2.4.24 a, i e l*) a discapito del plasmodesma, suo precursore (p, *Fig. 2.4.23 e, i*). Inoltre, dal momento che nell'innesto a spacco in testa il rischio di scivolamento dei tessuti tra i due bionti è stato ridotto, la resistenza dell'interazione portainnesto/nesto alle sollecitazioni meccaniche era maggiore rispetto allo spacco

inglese. L'ottima adesione dei tessuti nel punto d'innesto, utilizzando la tecnica a spacco in testa, potrebbe essere dovuta anche alla ridotta disidratazione che invece ha favorito la traslocazione dei nutrienti. Questa ipotesi è stata confermata dalla perdita d'acqua registrata nell'interfaccia dell'innesto a spacco inglese per la combinazione A/WC dopo 60 giorni; tale perdita non è stata rilevata nel corrispondente innesto a spacco in testa nel punto di unione portinnesto/nesto. Nella *Figura 2.4.25* è visibile il tessuto danneggiato dalla mancanza di acqua lungo la giunzione d'innesto riscontrato solo nell'innesto a spacco inglese e nella combinazione A/WC.

A / WC, 60th giorno

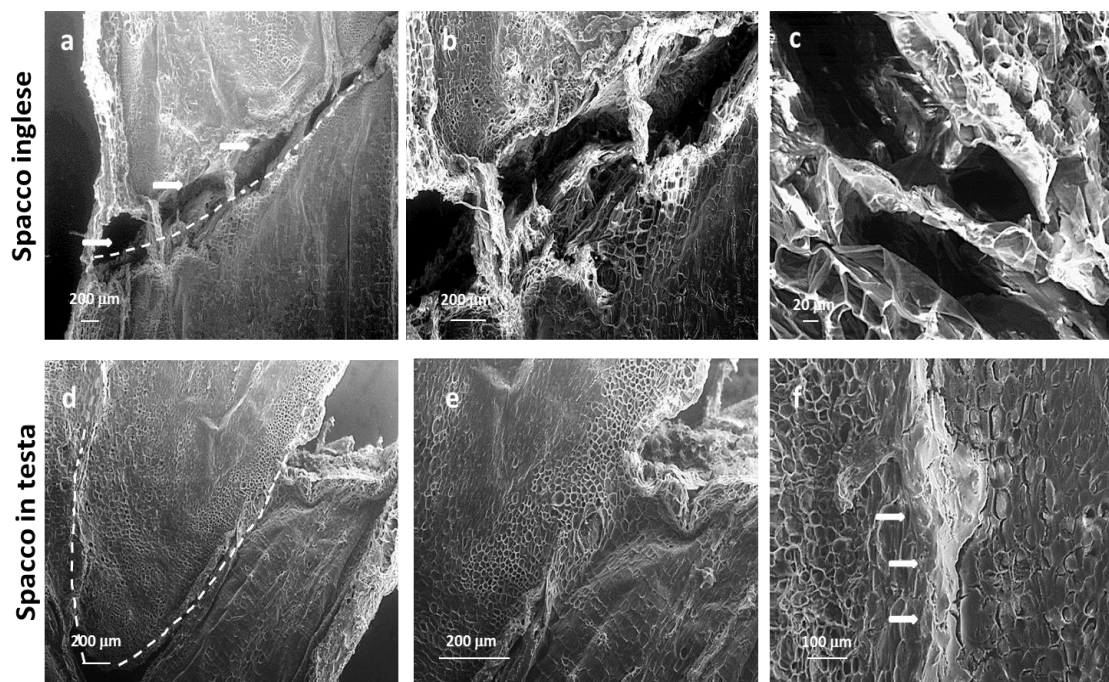


Fig. 2.4.25 – La perdita d'acqua sui tessuti nella giunzione d'innesto a spacco inglese (a-c) per la combinazione A/WC e l'integrità corrispondente degli stessi tessuti dopo lo spacco in testa (d-f), entrambi a 60 giorni dall'innesto.

È un dato di fatto che la maggior presenza di materiale ceroso (Trinchera *et al.*, 2013) in corrispondenza del punto di unione dell'innesto A/WC, nella tecnica a spacco in testa (*Fig. 2.4.25 d, e*), evita la perdita di acqua e quindi anche la separazione meccanica tra i bionti. Tutto ciò garantisce la riuscita dell'innesto, se mantenuti alle stesse condizioni sperimentali, e dopo due mesi dall'inizio dell'esperimento risulta ben unito. L'unione realizzata tra i due bionti opposti è stato efficacemente migliorato dalla presenza di questo materiale sulla zona della cicatrice, che appariva coperta da una

sostanza di colore bianco solo in corrispondenza del punto di unione dell'innesto e del tessuto calloso (*Fig. 2.4.25 f*).

Per valutare l'effetto della diversa tecnica d'innesto sulla formazione unione, in particolare in relazione all'evoluzione dei ponti orizzontali e delle connessione vascolari, abbiamo confrontato la combinazione A/A dopo 30 giorni, alternativamente innestato con la tecnica a spacco inglese ed a spacco in testa (*Fig. 2.4.26*). Questo "controllo" potrebbe essere considerato come un potenziale "sistema modello", in cui l'affinità tra la marza ed il portainnesto potrebbe essere considerato come stabilito .

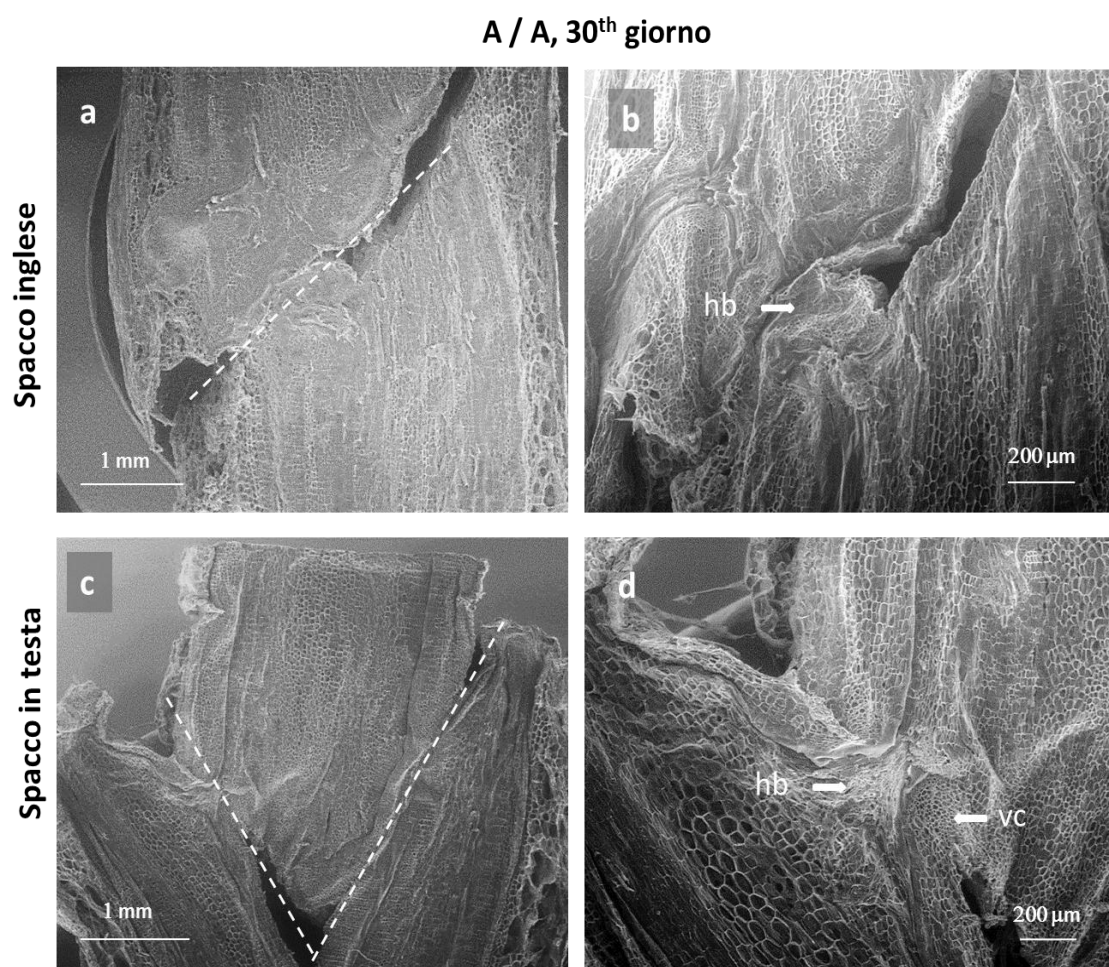


Fig. 2.4.26 – Ingrandimento di ponti orizzontali nella combinazione di innesto A/A spacco inglese (a, b) e spacco in testa (c, d) dopo 30 giorni dall'innesto.

L'unione dell'innesto nello spacco inglese è stata raggiunta dopo la formazione dei ponti orizzontali (HB), ma è evidente che dopo 30 giorni avviene anche il riarrangiamento dei tessuti vascolari nella combinazione carciofo/carciofo, considerata quella a più elevata compatibilità. Questa riorganizzazione sembrava ancora non essere

avvenuta nell'innesto a spacco in testa, dove è stata riscontrata discontinua e non ordinamento dei diversi tessuti.

Guardando le cellule dei tessuti contrapposti nell'innesto a spacco in testa, è evidente la formazione di un tessuto cambiale continuo (vc) nella combinazione A/A, che potrebbe essere considerato come la prova effettiva del successo dell'innesto. Se si guarda alla minor affinità della combinazione d'innesto A/WC, sempre nello spacco in testa, i ponti orizzontali costituiscono il primo cambiamento anatomico rivolto a promuovere la giunzione tra portinnesto e il nesso. In *figura 2.4.27* è riportato un ingrandimento di un ponte orizzontale, che attesta la continuità delle cellule del tessuto parenchimoso sulla superficie del cilindro, che dovrebbe portare ad una rigenerazione di nuovo tessuto vascolare per ristabilire la continuità del sistema di trasporto.

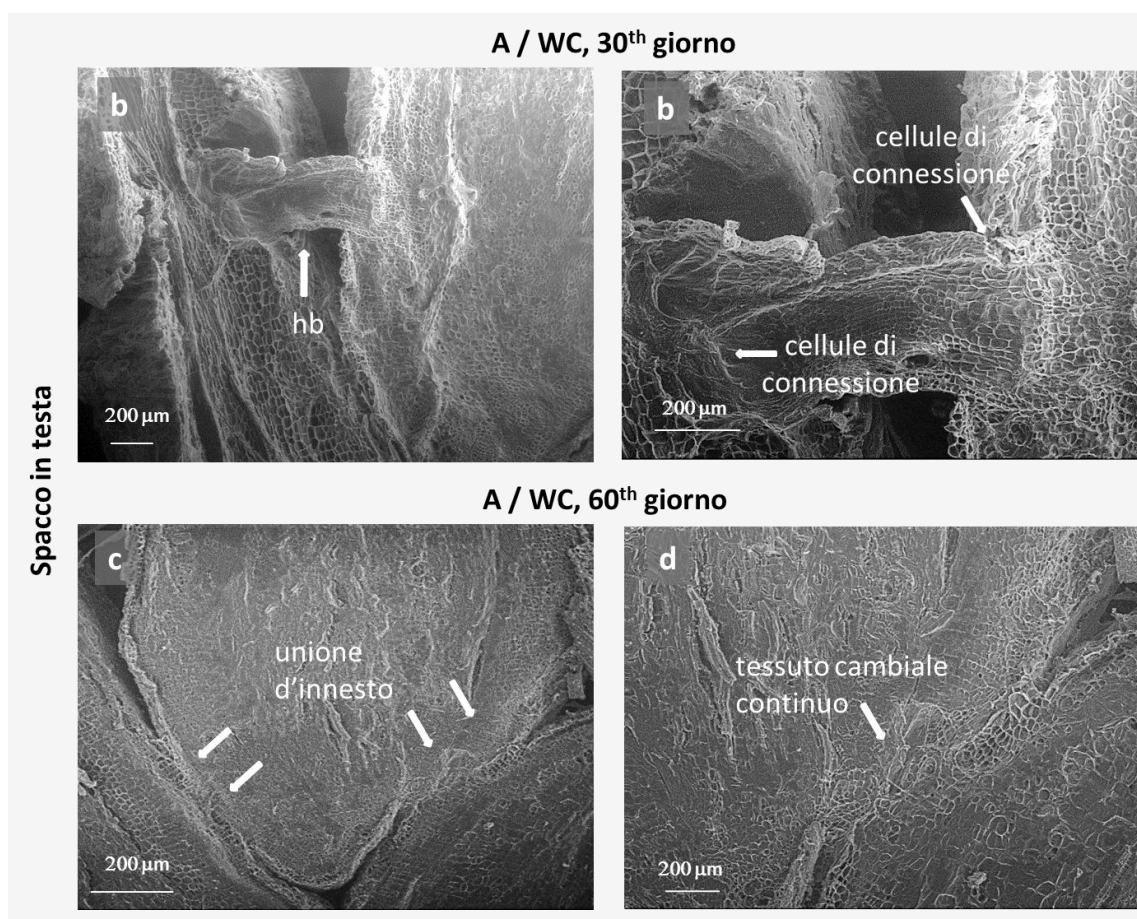


Fig. 2.4.27 – Ingrandimento di un ponte orizzontale nella combinazione d'innesto A/WC innestata a spacco intesta (a, d) dopo 30 giorni dall'innesto.

d) Valutazione della compatibilità

La caratterizzazione anatomica nel punto d'innesto ha mostrato che la rigenerazione e la differenziazione degli elementi vascolari era simile ma si è presentata

con tempistiche diverse in entrambe le tecniche d'innesto e nelle diverse combinazioni di esse.

Attraverso l'assorbimento di coloranti quali la safranina e il blu di metilene, è stato possibile vedere che, dopo 20 giorni dall'innesto, le piantine hanno ripristinato la vascolarizzazione tra portainnesto e nesto. Infatti, appena dopo 2 ore di assorbimento, il colorante era facilmente riscontrabile su tutta la porzione del nesto (*Fig. 2.4.28*). L'assorbimento migliore e più rapido è stato evidenziato con la soluzione acquosa di safranina allo 0.5%. Per questo motivo gli esperimenti successivi sono stati effettuati soltanto con tale colorante rosso per tutte e due le tipologie d'innesto.

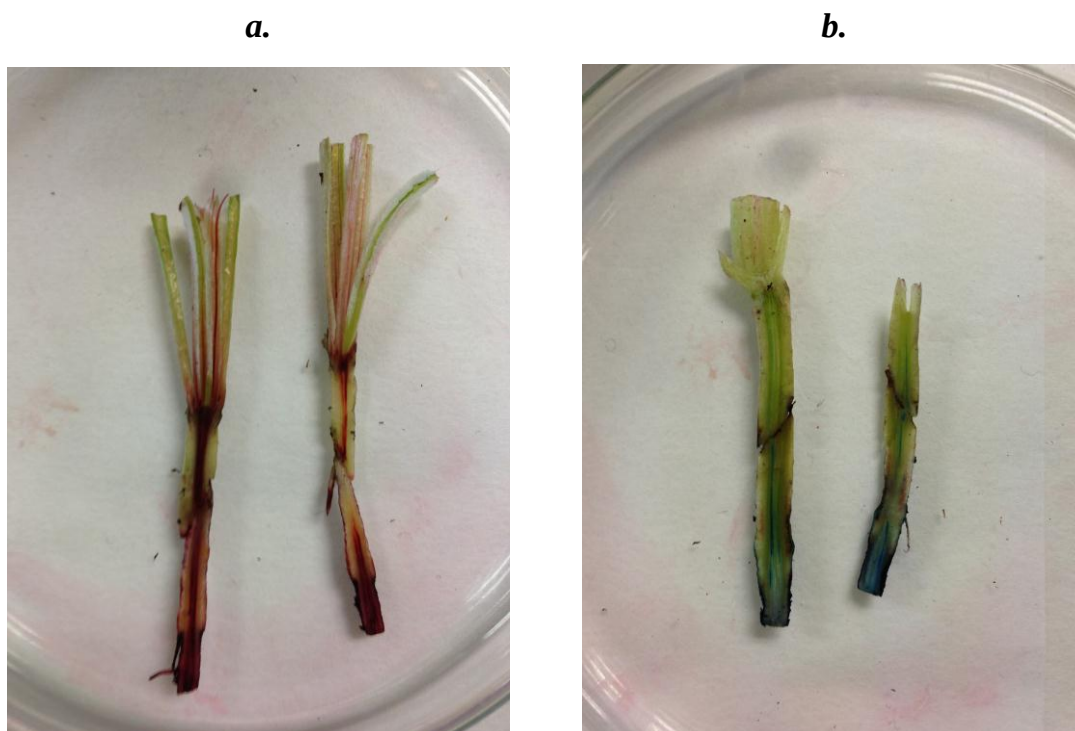


Fig. 2.4.28 – **a.** Assorbimento di safranina e **b.** blu di metilene in due piantine innestate a spacco inglese.

La fase del taglio longitudinale, eseguito con una lama da bisturi ben affilata sulla porzione dell'innesto, è stata la più importante nella preparazione del materiale da analizzare in quanto è stata riscontrata la necessità di riuscire a tagliare il tessuto vascolare neo-formato dall'unione dei due bionti ormai avvenuta. In diversi casi, questo non è stato reso possibile dalla ripresa della vascolarizzazione che avviene tramite ponti orizzontali i quali, nel corso dei giorni dopo l'innesto, tendono a differenziarsi sempre di più rimanendo però protetti dai tessuti cambiali formati durante la cicatrizzazione. Questo ci ha impedito di individuare nettamente le strutture di vascolarizzazione ed in

particolare i ponti orizzontali dove la circolazione di acqua e nutrienti è stata ripristinata.

Spacco inglese

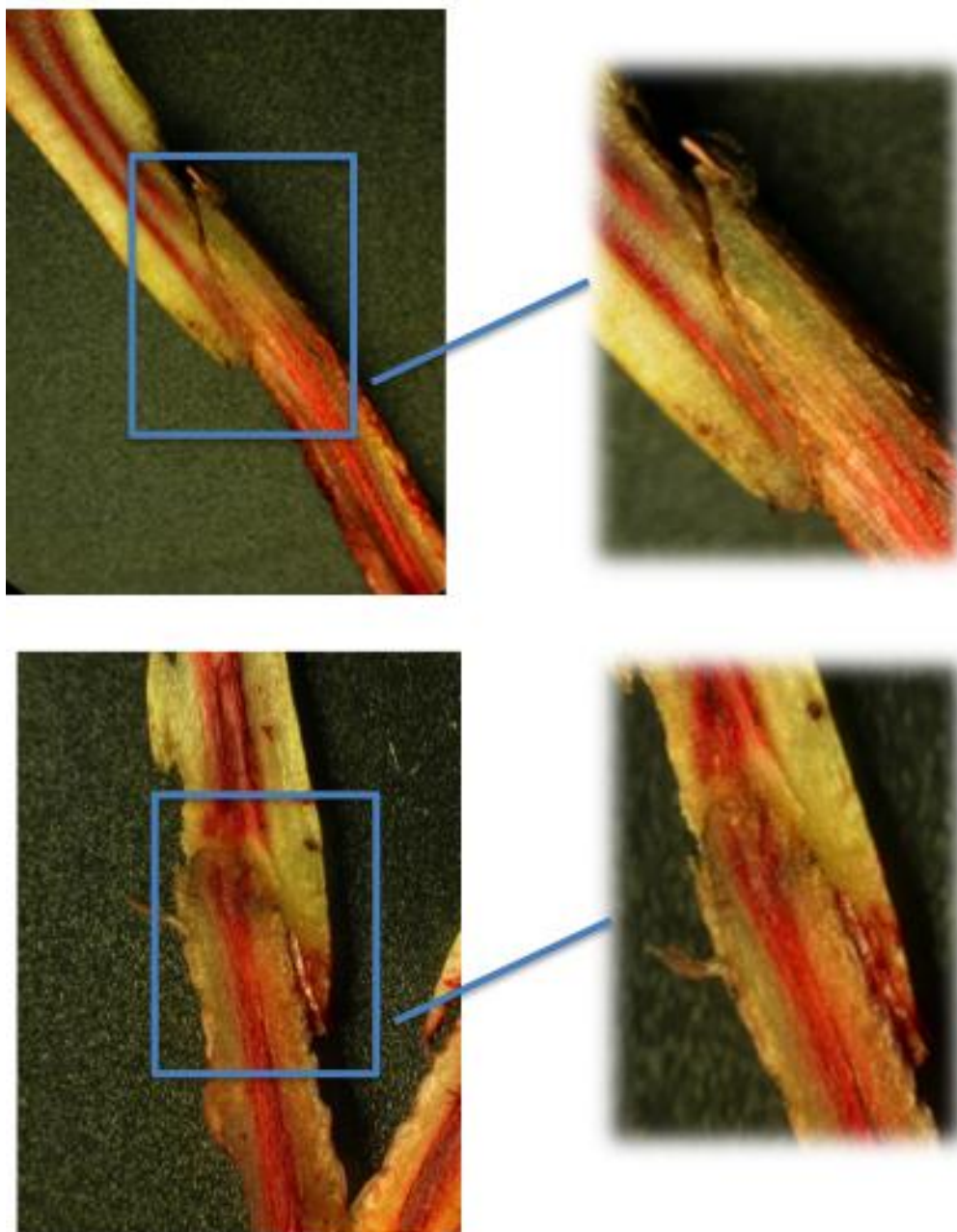


Fig. 2.4.29 – Assorbimento di safranina nel caso di piante innestate a spacco inglese.

In entrambe le tecniche di innesto, è stato possibile notare l'effettivo passaggio di soluti tramite la colorazione in rosso della safranina presente su portainnesto e nesto (*Figg. 2.4.29 e 2.4.30*). Tuttavia, allo stesso tempo, non è stato possibile individuare il

ponte di saggio nella giunzione dell'innesto, anche se messa a fuoco con ingrandimenti maggiori.

Spacco in testa

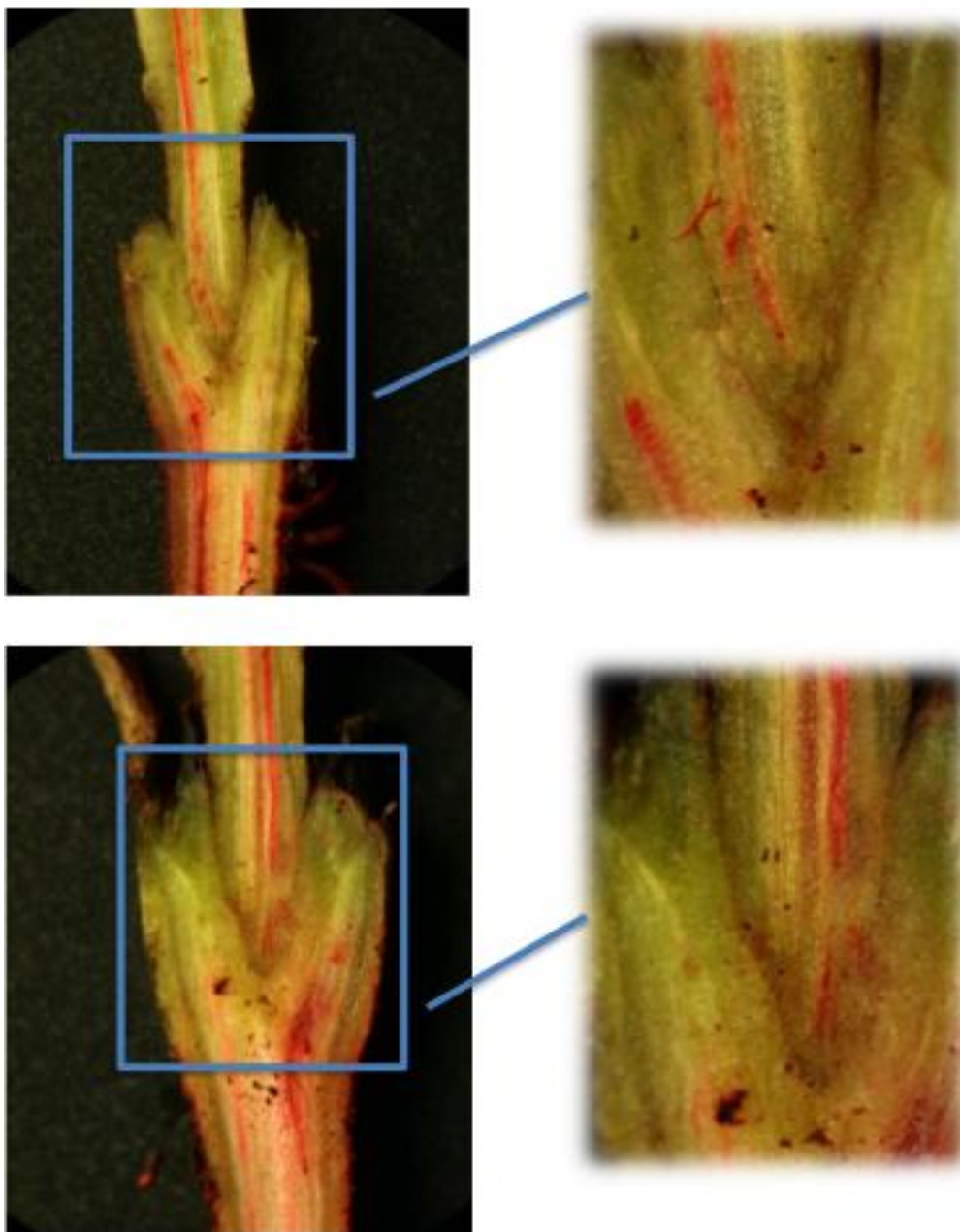


Fig. 2.4.30 – Assorbimento di safranina nel caso di piante innestate a spacco in testa.

Oltre alla valutazione del ripristino dei tessuti vascolari tra nesto e portainnesto, è stato importante verificare se ci sono state differenze significative tra la distribuzione dei fasci connettivi all'interno del fusto per i diversi genotipi utilizzati negli innesti. Per questo motivo, sono state analizzate allo stereomicroscopio diverse sezioni,

estremamente sottili, di fusti di carciofo (R), cardo coltivato (CC) e cardo selvatico (CW).

Nella *figura 2.4.31* sono illustrate tre diverse sezioni di fusti ed i relativi ingrandimenti e sono quindi ben evidenti le differenze nel numero e nella distribuzione dei fasci vascolari tra il cardo selvatico ed il carciofo. Al contrario, è lampante l'affinità tra il cardo coltivato ed il carciofo. Tale risultato dovrebbe dimostrare che, in funzione della distribuzione dei fasci vascolari, la combinazione carciofo/cardo coltivato dovrebbe avere una compatibilità maggiore rispetto a quella carciofo/cardo selvatico. Questa conclusione va contro a quanto ottenuto dall'analisi anatomico-fisiologica effettuata nella nostra ricerca, in quanto la combinazione R/CW ha manifestato una buona compatibilità e velocità di cicatrizzazione, seconda soltanto alla combinazione R/R presa come riferimento e controllo.

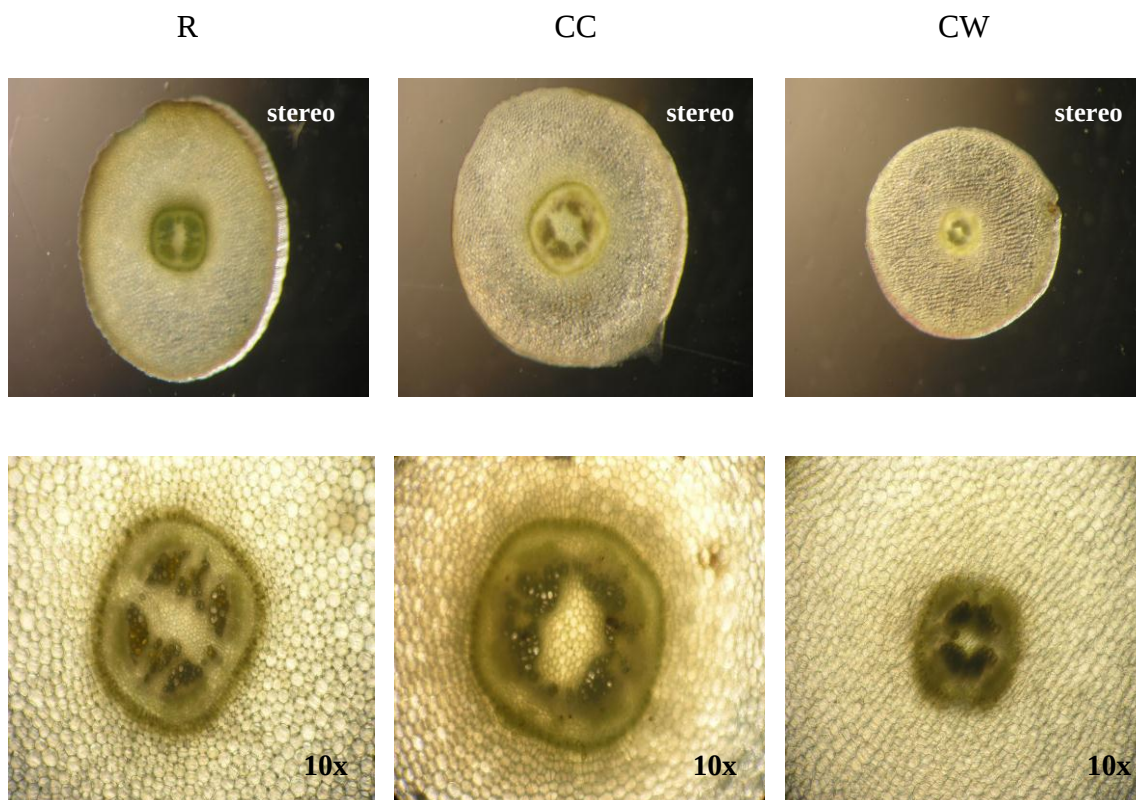


Fig. 2.4.31 – Sezioni trasversali dei genotipi utilizzati per le diverse tipologie e combinazioni d'innesti.

Tutto ciò ha portato alla stessa conclusione avuta al momento dell'applicazione della tecnica d'innesto in quanto lo sviluppo della pianta di cardo selvatico necessita una semina anticipata, rispetto al carciofo ed al cardo coltivato, per l'ottenimento di piantine di grandezze compatibili. Disporre di piantine con sviluppo diverso diminuisce l'attecchimento dell'innesto a causa dell'incompatibilità strutturale e meccanica.

e) Analisi qualitativa

Preliminarmente, l'estratto preparato da ogni combinazione d'innesto è stato analizzato per il contenuto di macro e micro-elementi. Il risultato di queste analisi è riportato nelle figure 2.4.32 e 2.4.33.

Si specifica il significato delle sigle riportate nelle figure:

Combinazione	Sigla	Combinazione	Sigla
Romolo	R	Opal	O
Romolo/Romolo	R/R	Opal/Opal	O/O
Romolo/Cardo coltivato Belgio	R/CcB	Opal/Cardo coltivato Belgio	O/CcB
Romolo/Cardo selvatico Sardo	R/CsS	Opal/Cardo selvatico Sardo	O/CsS
Romolo/Cardo selvatico Siena	R/CsSi	Opal/Cardo selvatico Siena	O/CsSi
Romolo/Cardo coltivato Versi	R/CcV	Opal/Cardo coltivato Versi	O/CcV

Per quanto riguarda i macroelementi, le combinazioni innestate con il carciofo Romolo non hanno manifestato sostanziali differenze rispetto al controllo non innestato. Solo nel caso del fosforo e del calcio, le combinazioni innestate hanno avuto un calo più accentuato nelle combinazioni con i cardi selvatici (Fig. 2.4.32).

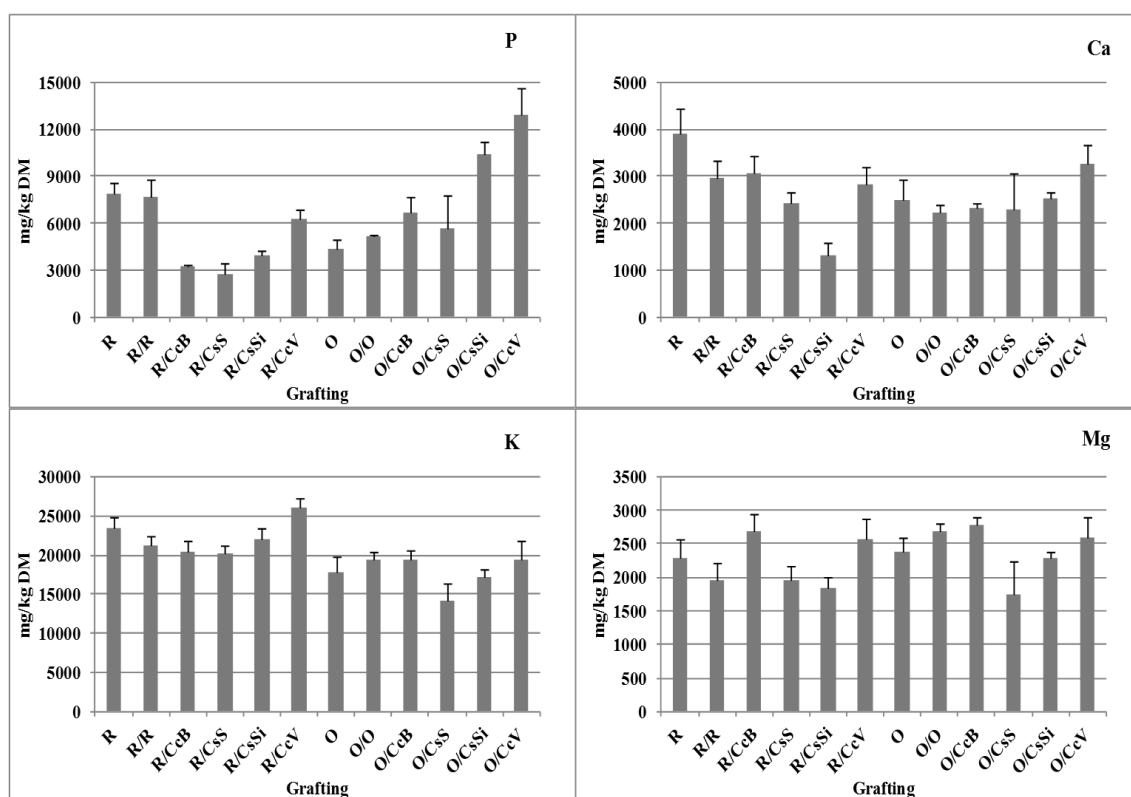


Fig. 2.4.32 – Elaborazione grafica del contenuto di macro-elementi nelle diverse combinazioni d'innesto e nei controlli.

Le combinazioni effettuate con il carciofo Opal si sono mantenute costanti per quanto riguarda il potassio, il calcio ed il magnesio, mentre è andato aumentando notevolmente il fosforo nelle piante innestate fino al culmine ottenuto con il cardo coltivato Versi (Fig. 2.4.32).

Nel caso dei microelementi, la combinazione Romolo/cardo coltivato Versi ha avuto dei valori più alti di tutte le combinazioni analizzate con una incidenza maggiore per il rame, zinco e ferro (Fig. 2.4.32).

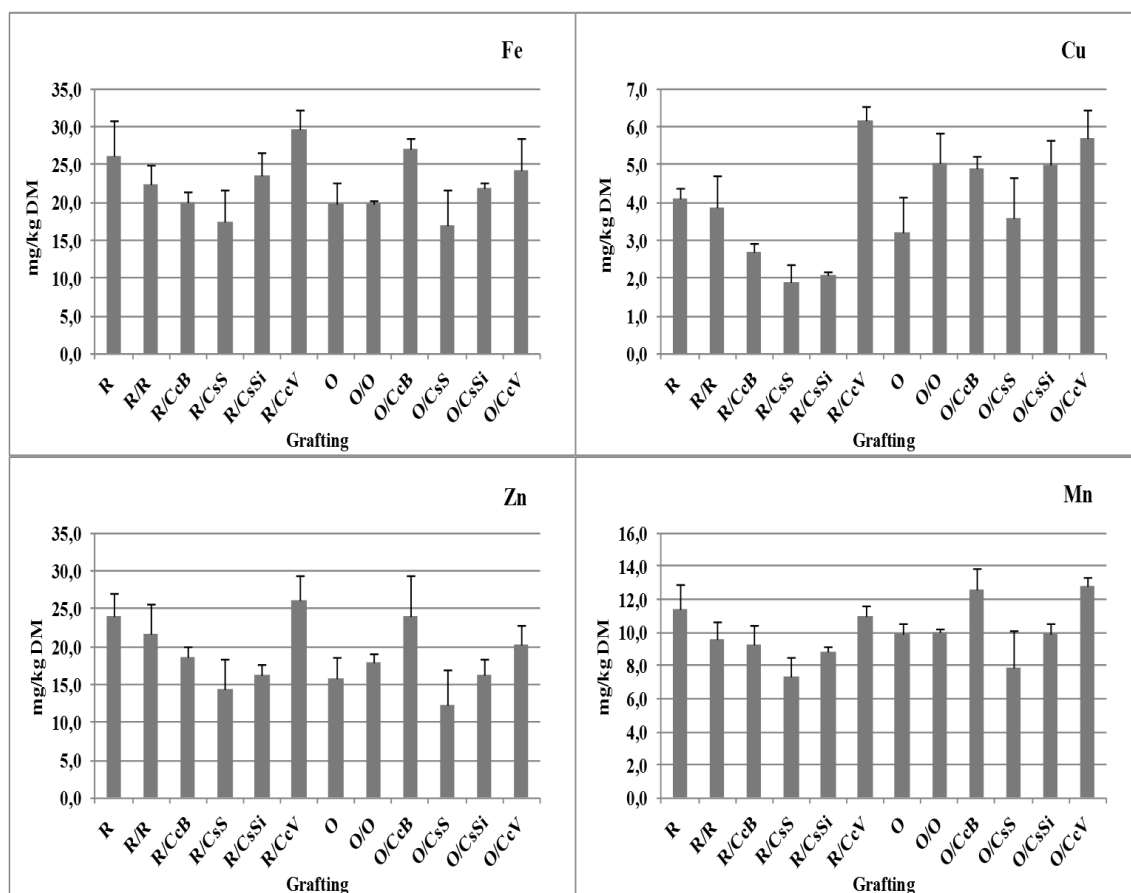


Fig. 2.4.33– Elaborazione grafica del contenuto di micro-elementi nelle diverse combinazioni d'innesto e nei controlli.

Tra le combinazioni con Opal, il cardo coltivato Belgio ha dato un contenuto dei micro-elementi, da noi valutati, più alto rispetto alle altre distinguendosi nettamente (Fig. 2.4.33).

– Determinazione dell'attività antiossidante:

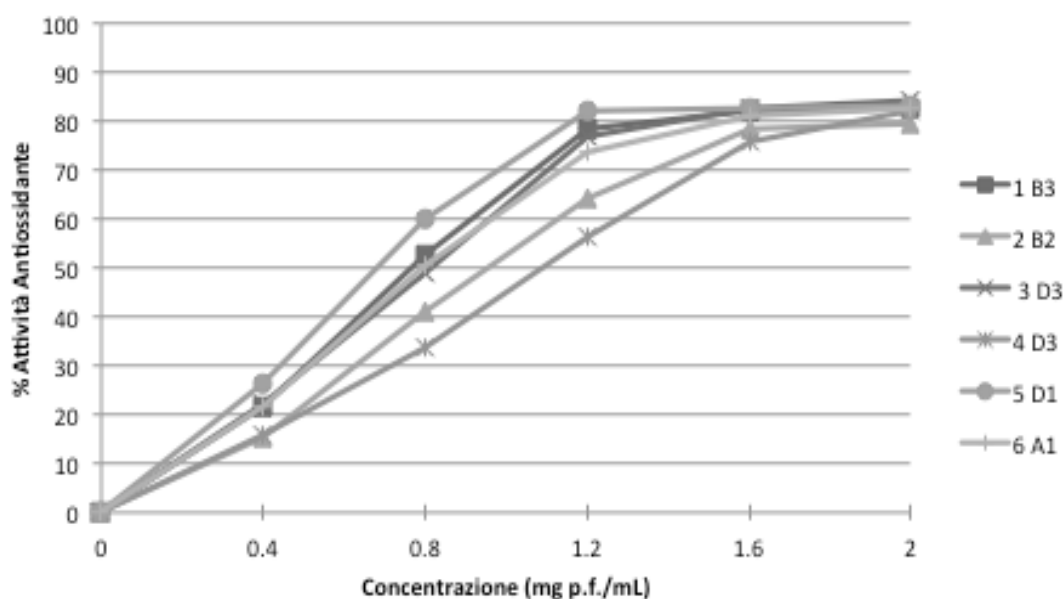


Fig. 2.4.34 – Attività antiossidante delle combinazioni d'innesto con Romolo.

La combinazione che ha dato una risposta migliore tra quelle effettuate con il carciofo Romolo è stata quella con il cardo selvatico Siena, seguita dal Romolo non innestato. L'innesto con il cardo selvatico Sardo ha il quantitativo più basso (Fig. 2.4.34).

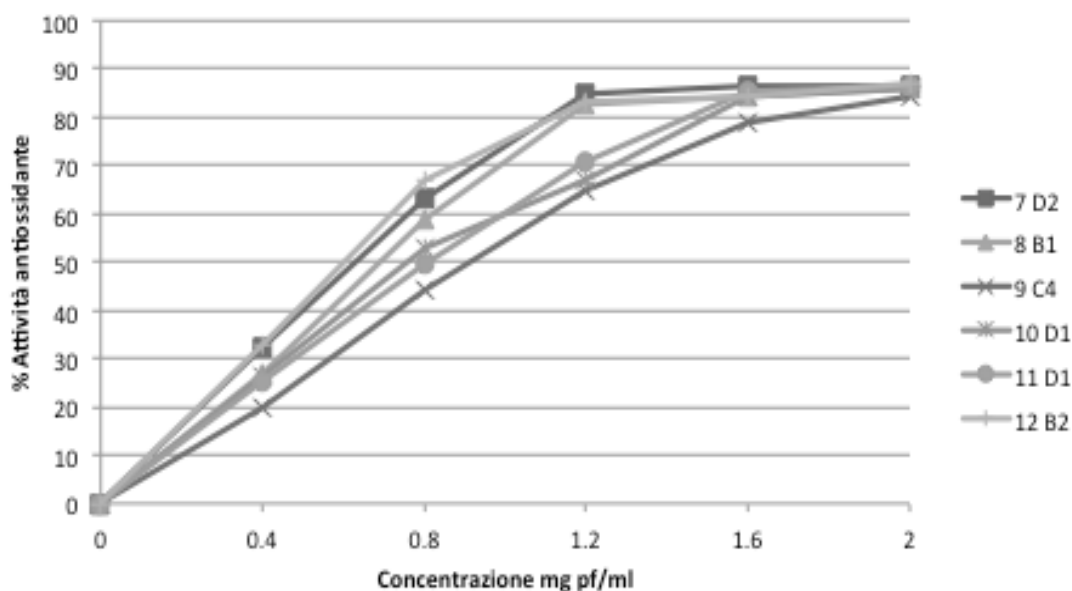


Fig. 2.4.35 – Attività antiossidante delle combinazioni d'innesto con Opal.

Tra le combinazioni con Opal, il risultato migliore c'è stato con il carciofo da solo non innestato e la combinazione con il cardo coltivato Versi, mentre la combinazione peggiore è stata quella con il cardo coltivato Belgio (*Fig. 2.4.35*).

– Determinazione del contenuto di fenoli totali: L'analisi della qualità si è completata con la determinazione del quantitativo dei fenoli totali per tutte le combinazioni d'innesto prese in considerazione. La *figura 2.4.36* rappresenta un riepilogo del quantitativo di polifenoli e dell'attività antiossidante, fatto in modo da facilitare le comparazioni tra le combinazioni d'innesto.

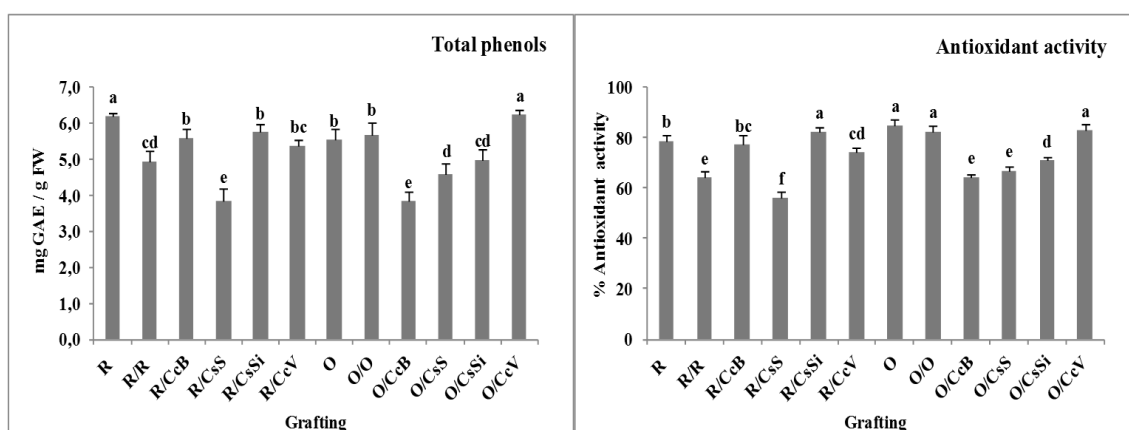


Fig. 2.4.36 – Comparazione tra il quantitativo di fenoli totali e l'attività antiossidante.

Come è facilmente prevedibile, le combinazioni non innestate di carciofo (controlli) hanno dei valori abbastanza alti che tendono a ridursi notevolmente in alcune combinazioni d'innesto (*Fig. 2.4.35*). In particolare, le combinazioni cardo selvatico Sardo e cardo coltivato Belgio, con entrambi gli ibridi F_1 di carciofo Romolo e Opal, hanno i quantitativi più bassi, mentre le combinazioni con i cardo Siena (selvatico) e Versi (coltivato) sono risultati i migliori con livelli di fenoli ed attività anti ossidante vicine ai controlli.

f) Caratterizzazione agronomica

La sperimentazione sull'innesto si è completata con la valutazione in campo di tutte le combinazioni studiate secondo i parametri presi in considerazione sia per il cardo che per il carciofo (UPOV). L'innesto preso in considerazione in questa sperimentazione è stato lo spacco in testa, in quanto le alte temperature del periodo estivo in cui è stato effettuato ha causato gravi danni alle piantine innestate con lo spacco inglese. Uno dei primi parametri esaminati è stato il numero dei germogli (carducci) emessi dai cardo utilizzati come portainnesto per valutare la percentuale di ricaccio da questi.

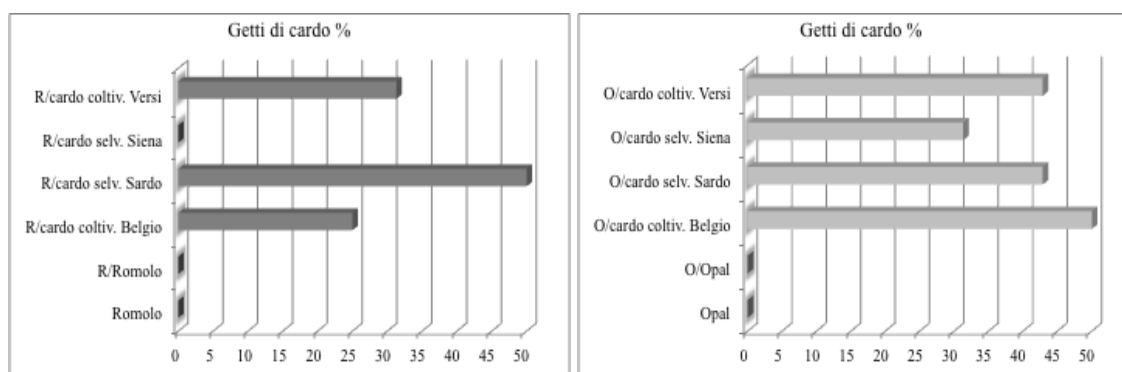
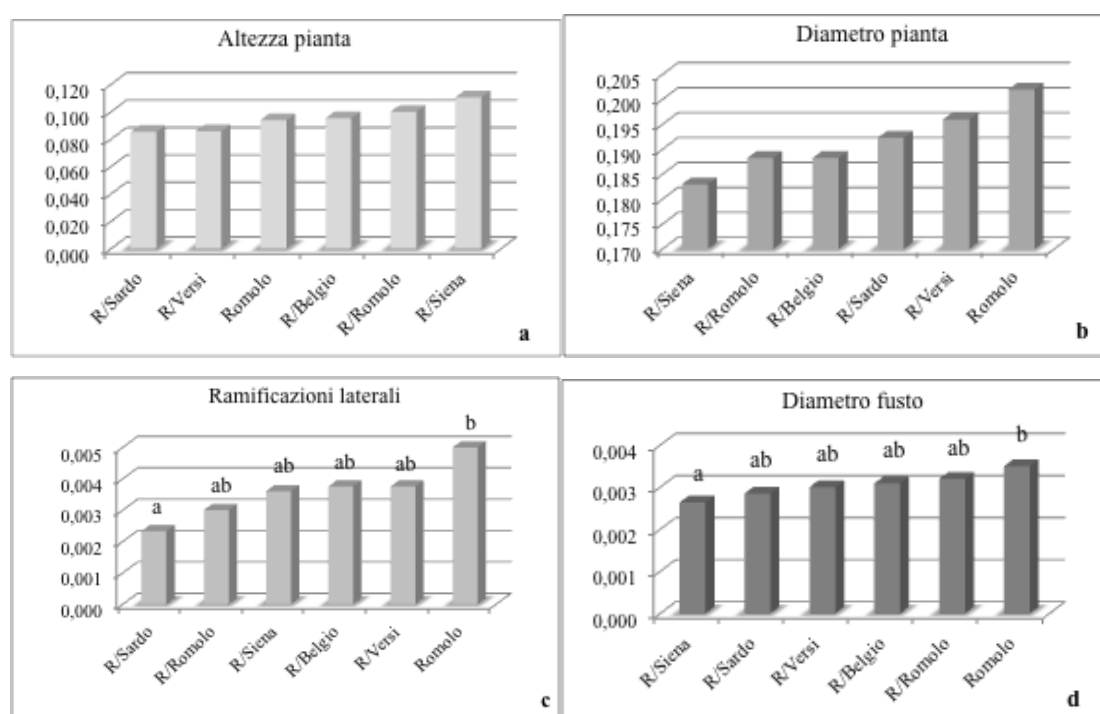


Fig. 2.4.37 – Numero di getti di cardo prodotti per combinazione.

Gli innesti hanno prodotto notevoli quantità di germogli laterali, anche dovuto al fatto che l'innesto a spacco in testa presenta questa problematica, ma non è stata riscontrata una sostanziale differenza tra le diverse combinazioni se non per la combinazione Romolo/cardo selvatico Siena che non ha prodotto carducci di cardo (Fig. 2.4.37). Per quanto riguarda gli altri parametri relativi alle combinazioni ottenute con il carciofo Opal, non è stato possibile rilevare i dati dalle singole piante e, per questo motivo, saranno di seguito illustrati solo quelli ottenuti con il nesso Romolo.



Secondo il test di Tukey, i valori corrispondenti alle lettere sono significativamente diversi per $P \leq 0,05$.

Fig. 2.4.38 – Analisi delle combinazioni d'innesto con il Romolo relativi alla pianta.

L'altezza della pianta ed il suo diametro, sono stati altri parametri che, attraverso l'analisi statistica effettuata hanno generato dei risultati non significativi con il test di Tukey. Infatti, tra le diverse combinazioni, non sono state riscontrate differenze sostanziali di grandezza (*Fig. 2.4.37a, b*).

Le differenze relative al diametro del fusto ed al numero di ramificazioni laterali presenti per pianta sono state invece significative. L'effetto dell'innesto riduce il diametro del fusto ed anche il numero di ramificazioni laterali, con una maggiore incidenza utilizzando i cardi selvatici Sardo e Siena (*Fig. 2.4.38 c, d*).

Tra i parametri analizzati che riguardano il capolino, soltanto il peso del capolino principale ha dato risultati significativi (*Fig. 2.4.39 c*). Al contrario la lunghezza, il diametro del cimario e il numero totale dei capolini non ha dato differenze significative tra le combinazioni d'innesto (*Fig. 2.4.39*).

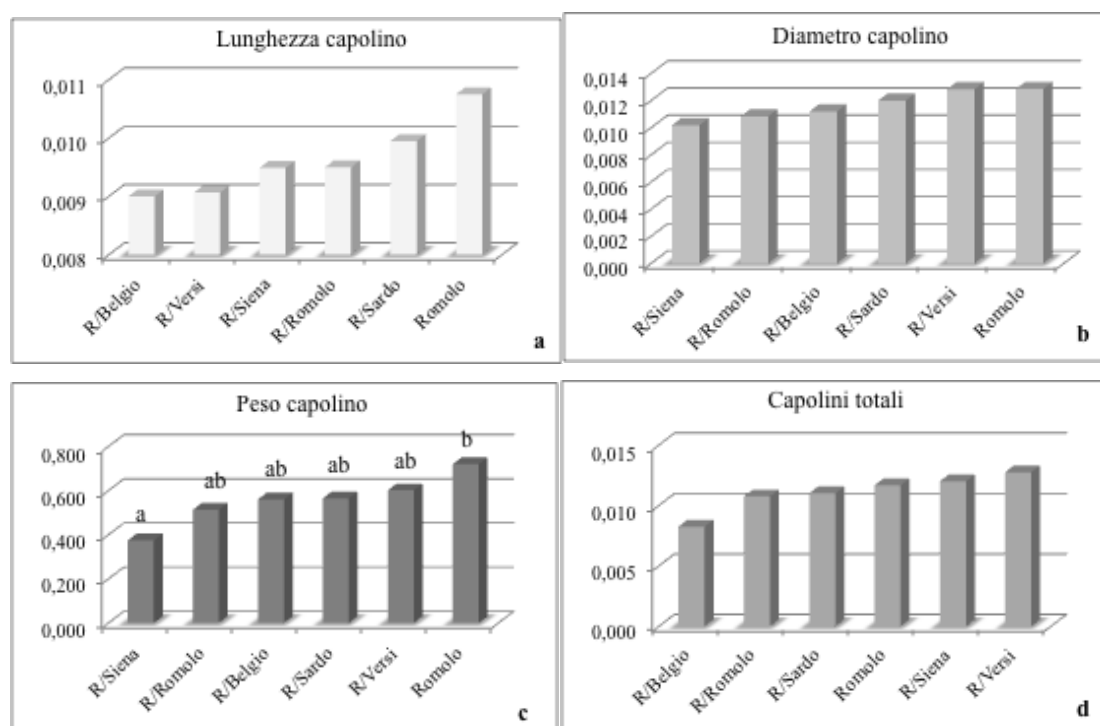


Fig. 2.4.39 – Analisi statistica delle combinazioni d'innesto con il Romolo relativi ai capolini.

Concludendo, l'innesto non ha provocato variazioni notevoli sulla grandezza della pianta e sulle sue principali dimensioni ma quello che è variato è stato il peso del capolino, il diametro del fusto ed il numero di ramificazioni laterali che si sono ridotti rispetto alla pianta non innestata.

2.5 OBIETTIVO A LUNGO TERMINE: IBRIDAZIONI

2.5.1 INTRODUZIONE

L'attività di miglioramento genetico del carciofo è iniziata con i primi studi sulla biologia fiorale effettuati da Jannaccone (1967) ed è stata successivamente limitata a poche ricerche sul controllo genetico di alcuni caratteri (Scarascia Mugnozza *et al.*, 1981; Pécaut, 1993; Lòpez Anido *et al.*, 1998; Cravero *et al.*, 2004). È stato riportato un determinismo poligenico per la dimensione, la forma e il peso del capolino, la grandezza della pianta, la lunghezza del peduncolo, la precocità mentre l'assenza di spine (*sp*), insieme alla "foglia gialla" (*j*) ed al "fiore bianco" (*b*), sono caratteri recessivi.

La base genetica per il colore antocianico del capolino, influenzato anche dalla temperatura, è piuttosto complessa a causa di una serie di geni modificatori che si aggiungono a 1-2 geni *major* (Basniski e Zohary, 1994); inoltre, due loci recessivi e dominanti con effetto epistatico sarebbero coinvolti rispettivamente nell'espressione del colore e della compattezza del capolino (Cravero *et al.*, 2005).

La maschiosterilità sarebbe invece controllata da un gene recessivo (*ms*) in materiale californiano (Principe, 1984) ma altri due geni non allelici recessivi (*ms*₂ e *ms*₃) sono stati individuati in germoplasma di provenienza diversa (Bazniski e Zohary, 1994); un determinismo oligogenico è stato anche riportato da Stamigna *et al.* (1984) in genotipi di origine francese.

Studi recenti effettuati da Portis *et al.* (2014; 2012) su carciofo hanno consentito di identificare caratteri QTL legati alla produzione che, assieme a marcatori molecolari associati, sono di interesse nei programmi di miglioramento genetico assistito.

Non sono disponibili invece, in letteratura studi analoghi sul cardo come mancano anche informazioni sulla variabilità genetica inter e intra-accessione (Lahoz *et al.*, 2011). Molti genotipi presenti in Italia sono spesso indicati con il nome della località di coltivazione, senza alcuna identificazione genetica; la stessa cosa tra l'altro si riscontra spesso anche per il carciofo.

Il miglioramento genetico del carciofo e cardo presenta tuttavia delle problematiche dovute all'allogamia e proterandria delle specie nonché alla depressione da *inbreeding* che si verifica dopo cicli di autofecondazione. La produzione commerciale di carciofo si basa infatti soprattutto sull'impiego di popolazioni locali eterogenee, ad eccezione di alcuni cloni 'Romanesco' (Ancora, 1986), 'Violetto' (Campanelli *et al.*, 2013) e 'Spinoso

sardo' (Tavazza *et al.*, 2004) ottenuti mediante micropropagazione. L'unica vera novità nella coltivazione del carciofo è rappresentata dallo sviluppo di nuove cultivar da seme, compresi gli ibridi F₁ (Basnizki e Zohary, 1994) che stanno diventando popolari in alcune parti del mondo. Le ricerche in questo settore sono iniziate in Francia alla metà degli anni '60 ma i più grandi progressi sono stati raggiunti, durante gli anni '90, in Israele e negli Stati Uniti (Basnizky e Zohary, 1994). Attualmente sono stati ottenuti risultati interessanti mediante ibridazioni tra cloni maschiosterili e germoplasma italiano (Stamigna *et al.*, 2004; Lo Bianco *et al.*, 2012; Saccardo *et al.*, 2013).

Tra gli ibridi F₁, ottenuti nell'ambito di una collaborazione Italia-USA e selezionati in due ambienti diversi (italiano e californiano), quello denominato "Romolo" è stato richiesto per l'iscrizione al registro Nazionale delle Varietà e sono in corso le prove di valutazione presso l'ENSE. Sono inoltre riportate in letteratura valutazioni agronomiche di ibridi diffusi in Italia (Calabrese *et al.*, 2012; Calabrese e Carito, 2013) e studi fenologici effettuati su materiali propagati via seme (Virdis *et al.*, 2014).

In Italia, il carciofo da seme può rappresentare una valida alternativa all'uso del materiale a propagazione vegetativa tradizionalmente coltivato e presenta elevate potenzialità per far fronte a problemi di malattie, salinità e aridità.

Il ricorso a risorse genetiche tolleranti/resistenti rappresenta la strategia più economica e sostenibile per il controllo di questi stress biotici e abiotici ma, ad eccezione di qualche dato disponibile in letteratura sulla resistenza a *V. dahliae* e a stress salino e idrico (Cirulli *et al.*, 1994; Ciccarese *et al.*, 2012; Raccuia *et al.*, 2004; Ciccarese *et al.*, 2012), non esistono sinora genotipi di carciofo o cardo utilizzati in un programma di miglioramento genetico mirato.

Dal momento che non sono disponibili genotipi di carciofo resistenti al fungo e avendo selezionato 9 accessioni di cardo resistenti alla sindrome tracheomicotica causata da *V. dahliae* (v. cap. 2), si è cercato di trasferire mediante ibridazioni queste fonti di resistenza da cardo in carciofo, previa caratterizzazione morfologica preliminare del germoplasma di cardo utilizzato. Tale attività è stata basata principalmente, oltre che sull'uso di cloni maschiosterili di carciofo, anche sulla selezione clonale all'interno del germoplasma locale di cardo, sulle ibridazioni, autofecondazioni e interincroci. È stato inoltre tentato di individuare nuovi genotipi maschiosterili.

2.5.2 MATERIALI E METODI

a) Materiale vegetale e condizioni colturali

La costituzione di ibridi F_1 è stata basata preliminarmente sull'impiego di linee pure di genotipi maschiofertili (MF) e maschiosterili (MS), precedentemente ottenute, da utilizzare come parentali negli incroci. Il maschiosterile MS6 di carciofo utilizzato nel lavoro del dottorato era stato a suo tempo ottenuto e selezionato da una popolazione francese analizzata dall'ENEA e dall'Università degli Studi della Tuscia (Stamigna *et al.*, 2004). L'attività successiva svolta su questo parentale è stata quella di propagare le piante, sia *in vitro* che vegetativamente, e quindi utilizzarle in diverse combinazioni di incrocio. Il genotipo MS6, ritenuto geneticamente stabile, è attualmente impiegato con successo nello sviluppo di ibridi F_1 di carciofo.

Nel capitolo numero 2.3 “Reperimento del germoplasma e screening per stress biotici”, è stato specificato il materiale di cardo collezionato nell'ambito delle attività del dottorato di ricerca e le istituzioni da cui proviene. Non è stato tuttavia utilizzato nel programma di ibridazioni tutto il germoplasma disponibile, in quanto l'attività è stata concentrata sui genotipi con un quantitativo di seme tale da permettere le sperimentazioni ed analisi previste. Non è stato possibile neanche limitare i genotipi a quelli effettivamente resistenti a *V. dahliae* in quanto si tratta di lavori effettuati contemporaneamente e, nell'attesa, si è voluto affrontare le problematiche legate alle ibridazioni carciofo x cardo. In particolare, i genotipi di cardo utilizzati come parentali nella realizzazione di ibridi F_1 sono stati i seguenti:

- | | | |
|-------------|--------|--------|
| • Cerveteri | • AFFG | • AFM |
| • 33 | • AFSI | • AFN |
| • 32 | • AFGI | • AFSA |
| • FS | • AFB | |

L'ENEA e l'Università degli Studi della Tuscia, nel corso degli anni e dei progetti di ricerca che si sono susseguiti su cardo e carciofo, hanno selezionato inoltre, ulteriore materiale genetico di carciofo che è stato propagato vegetativamente. A riguardo, sono state utilizzate tre linee di carciofo (linee 7, 14 e 21) stabili che sono state anche utilizzate come parentali MF negli incroci con il cardo, in questo caso usato come parentale femminile. Dal momento che diversi cicli di autofecondazione determinano la depressione da *inbreeding*, con effetti negativi sulla vigoria della pianta, sul numero e

dimensione dei capolini, sulla qualità e la quantità del polline e sul numero di semi vitali, per ottenere parentali stabili sono stati alternati cicli di autofecondazione con interincroci, propagazione vegetativa e micropropagazione.

I parentali MS e MF sono stati coltivati presso i campi sperimentali dell'azienda dimostrativa ARSIAL, a Tarquinia (Viterbo), come avvenuto per le piante innestate. I trapianti si sono susseguiti, durante i tre anni del dottorato, nel periodo agosto-settembre 2011, 2012 e 2013, applicando i parametri di coltivazione già specificati nel capitolo numero "2.4 Obiettivo a breve termine: Innesto", 1 paragrafo 2.4.3 Materiali e metodi, con distanza tra le file pari a 1 m; distanza sulla file di 0.80 m, distanza tra le parcelle di 2 m. Il terreno era a medio impasto; sono state inoltre effettuate l'irrigazione a goccia con manichetta forata e le fresature per il controllo delle erbe infestanti.

b) Caratterizzazione dei parentali

Le linee parentali di cardo utilizzate nel programma di incroci sono state preliminarmente caratterizzate da un punto di vista genetico-agronomico applicando dei descrittori morfologici specifici proposti da Lahoz *et al.* (2011) e dalla Dott.ssa Romana Bravi del C.R.A. sulla base del protocollo tecnico CPVO-OCVV TP/184/2 Final su carciofo e cardo del 27/2/2013.

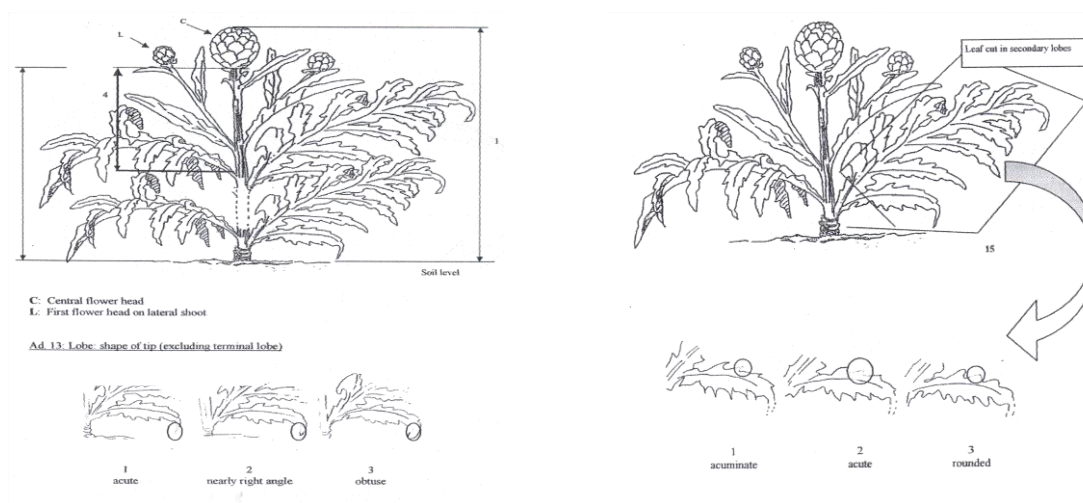
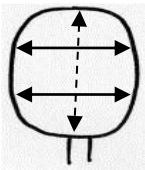
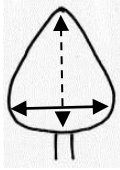
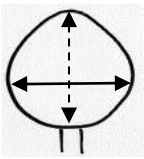
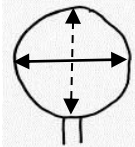
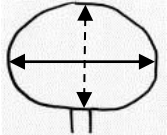


Fig. 2.5.1 – Altezza della pianta compreso il capolino (a) e caratteristiche dei lobi della foglia espressi in numero di lobi e forma dei lobi

Di seguito vengono anche riportati i principali parametri che sono stati rilevati sui capolini e sulle brattee sempre per il carciofo.

CAPOLINO PRINCIPALE:

- forma della sezione longitudinale

		Posizione della parte più ampia di seguito centrale		
		sotto la metà		in mezzo
		chiaramente	leggermente	
Rapporto lunghezza/larghezza	allungato			 3 oblungo
		 1 triangolare	 2 ovato	 4 circolare
	compresso			 5 schiacciato

- forma dell'apice



1
acuto



2
circolare



3
piatto



4
depresso

- densità delle brattee interne



3
sparse

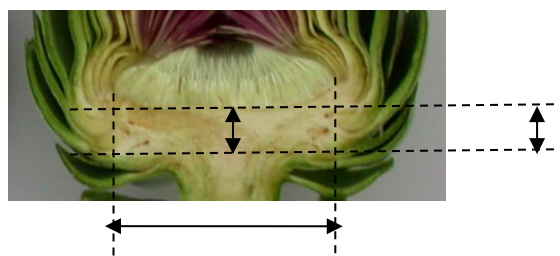


5
medie



7
Fitte

- diametro e spessore del ricettacolo



- forma sella sezione longitudinale del ricettacolo



1
piatto o leggermente depresso



2
moderatamente depresso

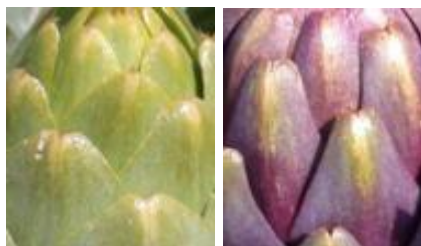


3
fortemente depresso

- colore del lato esterno dell'apice delle brattee



1
verde



2
bronzo



3
grigio

- colore delle brattee esterne



- | | | | | |
|---------------------------|--------|-------|-------|-------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| assente o
molto debole | debole | medio | forte | molto forte |

- forma dell'apice delle brattee



- 1
acuta



- 2
piatta



- 3
Rientrante

- profondità del rientro dell'apice delle brattee



- 1
superficiale

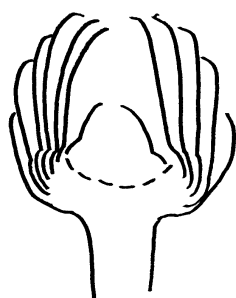


- 3
medio

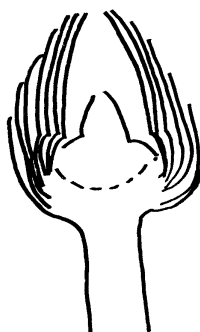


- 5
profondo

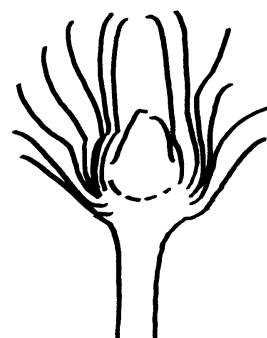
- flessione della punta delle brattee



- 1
verso l'interno

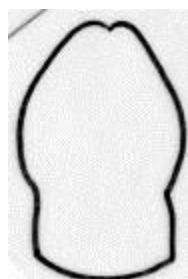


- 2
dritto

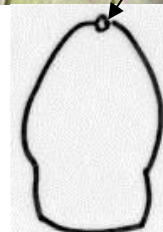


- 3
verso l'esterno

- mucrone sulle brattee

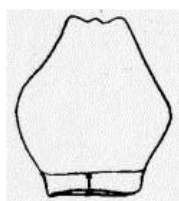


1
assente

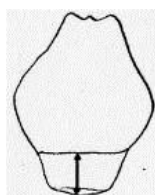


9
Presente

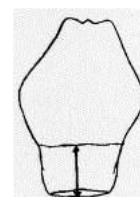
- lunghezza della base delle brattee



3
corta



5
media



7
Lunga

- spessore della base delle brattee



1
sottile



2
medio



3
spesso

- spessore della base delle brattee

Fig. 2.5.2 – Parametri di classificazione del carciofo proposti dal CPVO.

Alcuni dei parametri di caratterizzazione del cardo sono in comune con il carciofo, quali ad esempio l'altezza della pianta, il diametro, il numero di ramificazioni laterali, il diametro del fusto principale, la grandezza e forma del capolino principale, il numero totale dei capolini, il colore delle brattee. Ci sono invece dei parametri che differenziano

il cardo dal carciofo ma che sono molto caratteristici del primo, l'intensità dei lobi e la costolatura delle foglie. A riguardo, i descrittori presi in considerazione sono stati: 1) intensità dei lobi fogliari, 2) lunghezza della costolatura della foglia dalla base al punto in cui diventa larga 2 cm, 3) larghezza della costolatura fogliare a 5 cm e 4) a 35 cm, 5) spessore della costolatura a 35 cm, 6) profilo della costolatura e 7) presenza di spine sulle costole della foglia.

Per il parametro 1) sono state considerate tre diverse intensità della frastagliatura quali debole **a.**, media **b.** e forte **c.**, come illustrato nella *figura 2.5.3*.

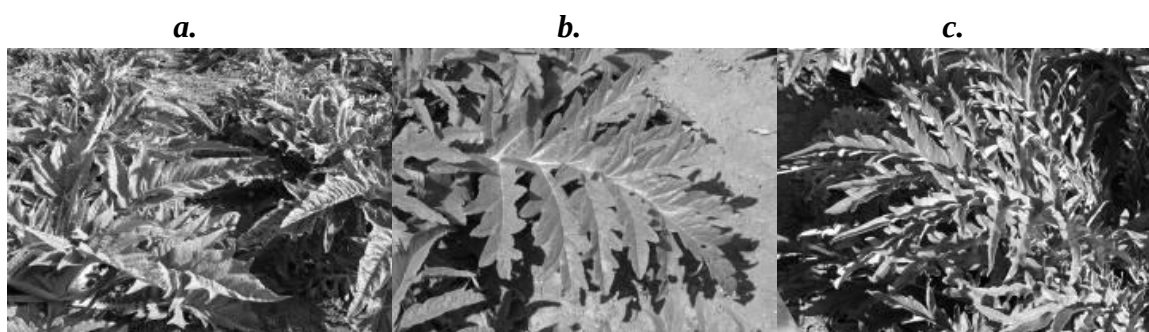


Fig. 2.5.3 – Parametro 1) intensità dei lobi fogliari.

La *figura 2.5.4 a. e b.* definisce i punti dove rilevare la lunghezza del parametro 2) e le larghezze della costolatura sulla foglia secondo i parametri 3) e 4).

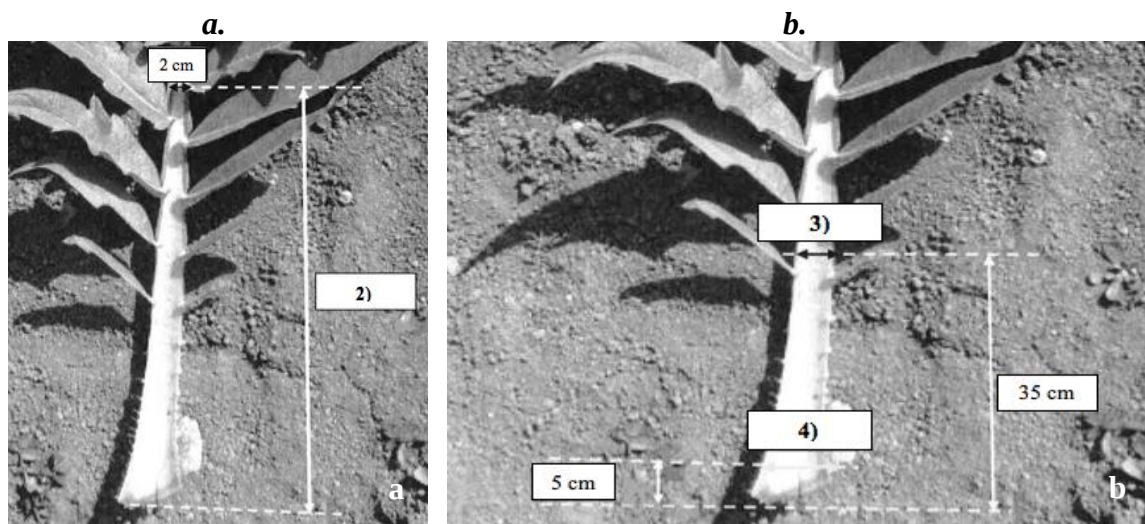


Fig. 2.5.4 – Parametri 2) figura a, 3) e 4) figura b.

Altro parametro estremamente importante è stato lo spessore della costolatura a 35 cm dalla base della foglia che può pertanto essere classificata in molto sottile, sottile **a.**, media **b.**, spessa **c.** e molto spessa (*Fig. 2.5.5*).

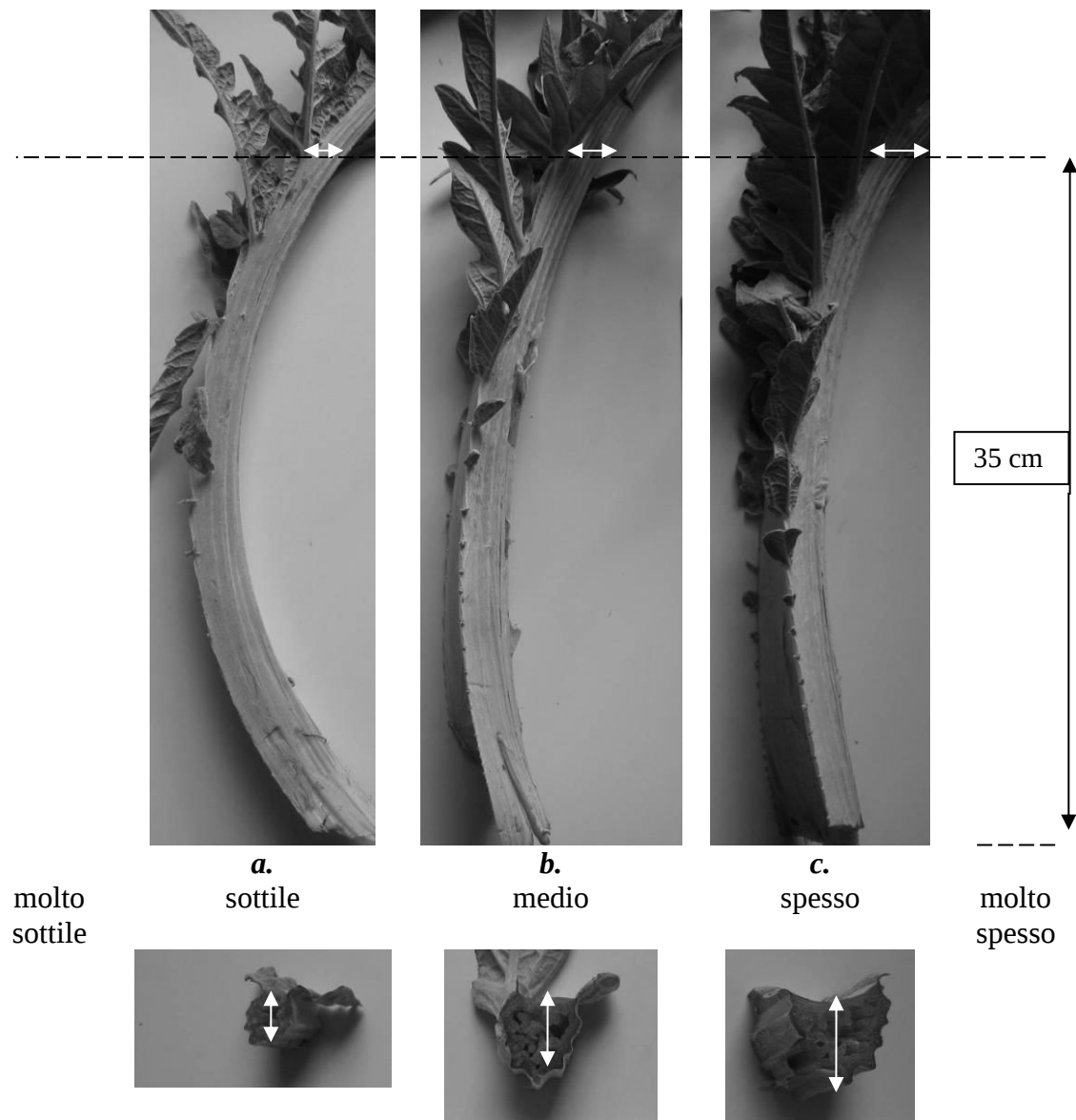


Fig. 2.5.5 – Spessore della costolatura – parametro 5).

E infine la lunghezza delle spine sulla costolatura è stata valutata come corte **a.**, medie e lunghe **b.** (*Fig. 2.5.6*).



Fig. 2.5.6 – Lunghezza delle spine – parametro 6).

Nello specifico, i parametri analizzati per il cardo sono stati:

- altezza della pianta;
- diametro della pianta;
- lobi fogliari;
- colore della costolatura;
- lunghezza della costolatura;
- larghezza della costolatura a 5 cm;
- larghezza della costolatura a 35 cm;
- spessore della costolatura a 35 cm;
- profilo della costolatura;
- presenza di spine sulla costolatura;
- altezza del fusto principale;
- forma del capolino principale;
- diametro del fusto principale;
- lunghezza del capolino principale;
- diametro del capolino principale;
- numero dei capolini.

c) Ricerca di nuovi genotipi maschiosterili

La ricerca di nuovi genotipi maschiosterili è stata effettuata mediante analisi di popolazioni F_2 ottenute autofecondando degli ibridi F_1 , quali il MISA, SAMI, Big Red e lo stesso Romolo. È stata valutata la vitalità delle microspore mediante colorazione dei granuli pollinici con carminio acetico.

Per la preparazione del carminio acetico è stato fatto sciogliere 1 g di carminio acetico in 100 ml di acido acetico al 45%. La soluzione è stata fatta bollire per 2-3 minuti, filtrata e quindi conservata in una bottiglia scura. Al momento dell'uso, è stata aggiunta glicerina in parti uguali (1:1). La colorazione è stata quindi effettuata adagiando sul vetrino una goccia di carminio acetico e su di esso è stata schiacciata l'antera per lasciare uscire il polline da analizzare. Dopo qualche secondo, il preparato è stato coperto con un vetrino coprioggetto e successivamente, dopo qualche minuto, quando il colorante era ormai ben penetrato all'interno del campione, si è proceduto all'osservazione del preparato al microscopio ottico. Il polline vitale appariva di colore rosso intenso, a differenza di quello che non vitale che rimaneva incolore (*Fig. 2.5.7*).



Fig. 2.5.7 – Osservazione al microscopio e differenza tra polline vitale e non.

d) Incroci

Il passo più importante per lo sviluppo di un ibrido F_1 è consistito nell'ottimizzare la tecnica di produzione del seme mediante impiego di cloni MS come genitori femminili, eliminando così il costo delle operazioni manuali per la demasculazione. Possono essere applicate diverse tecniche di impollinazione, dallo sfregamento del capolino, all'uso del pennello o degli insetti pronubi (bombi oppure api). Gli insetti sono impollinatori efficienti anche dei fiori dei cloni MS di carciofo e, in particolare, i bombi o le api mellifere sono i mezzi di impollinazione più efficaci valutati dai ricercatori italiani e americani (Lo Bianco *et al.*, 2012). Rispetto all'uso del pennello e dello sfregamento del capolino, in alcuni casi, l'uso di piccole famiglie di api ha permesso di ottenere un maggiore numero di semi per capolino (Lo Bianco *et al.*, 2012).

In particolare, nei nostri esperimenti, sono state applicate le prime due tecniche, come mostrato dalle seguenti *figure 2.5.8 a) e b)*.



*Fig. 2.5.8 – Metodo di impollinazione con lo sfregamento del capolino **a.** e con l'uso del pennello **b.***

Le impollinazioni sono state effettuate su piante anticipatamente isolate rispetto alla fioritura dei capolini, in condizioni di campo aperto, in isolatori o mediante singoli cappucci con reti antinsetto (*Fig. 2.5.9 a., b., c., d.*).



Fig. 2.5.9 – Metodo di impollinazione e di isolamento a. in pieno campo, b. in tende, c. piante singole e d. singoli capolini.

Le immagini *c.* e *d.* identificano i metodi d'isolamento utilizzati nel nostro esperimento. Nella nostra ricerca, non sono stati utilizzati insetti pronubi per l'impollinazione ma sono stati applicati gli altri metodi quale lo strofinamento dei capolini, avendo cura di ripeterli più volte per aumentare la possibilità di fecondazione dei fiori femminili e ottenere più seme. Per mantenere un'elevata efficienza, le impollinazioni sono state effettuate tutte durante le prime ore della mattina in quanto, da diversi studi, questo è risultato il momento più idoneo della giornata, anche per la conservazione della vitalità pollinica (Lo Bianco *et al.*, 2012).

Altra fase essenziale per produrre ibridi stabili è stato l'utilizzo di cloni MS e linee pure MF, ottenute mediante autofecondazioni e interincroci.

In particolare, in funzione del numero di piante disponibili in campo, sono state effettuate le seguenti combinazioni di incrocio e reciproci:

CARDO x LINEE di CARCIOFO

- AFB (pt. A3) x Linea 7 (pt. B3)
- AFM (pt. A3) x Linea 7 (pt. A4)
- AFB (pt. C1) x Linea 1 (pt. B2)
- AFM (pt. B3) x Linea 14 (pt. B2)
- AFB (pt. C3) x Linea 21 (pt. C3)
- AFM (pt. B1) x Linea 21 (pt. C3)

LINEE di CARCIOFO x CARDO

- Linea 7 (pt. B4) x AFB (pt. A2)
- Linea 14 (pt. C2) x AFB (pt. C1)
- Linea 14 (pt. E3) x AFM (pt. B3)
- Linea 21 (pt. C1) x AFB (pt. C3)

Ogni anno le piante del genotipo MS6 disponibili in campo sono state incrociate con i seguenti cardì sia coltivati che selvatici:

AFN, AFB, AFM, AFFF, AFFG, AFSI, AFSA, Cerveteri, 32 e 33.

e) Metodi di elaborazione statistica

Per i caratteri morfologici, i dati sono stati analizzati mediante ANOVA, utilizzando la procedura GLM (Generalized Linear Model), Principal Component Analysis (PCA) e Correlazione analisi del software SPSS versione 15.0. La separazione delle medie è stata eseguita con il test di Duncan. Il livello di significatività accettato è stato $P \leq 0.05$.

2.5.3 RISULTATI

a) Caratterizzazione carciofi e cardì

I risultati ottenuti sulla caratterizzazione morfologica del cardò sono riferiti a due anni di analisi, il 2012 e il 2013; la loro elaborazione statistica ha prodotto dei dati significativi sia in termini di identificazione dei descrittori in grado di discriminare i genotipi che in termini di classificazione e caratterizzazione di questi.

Dopo aver analizzato mediante PCA i dati separatamente per i due anni di sperimentazione, è stato ottenuto che le prime tre componenti spiegano il 72 e il 74% della varianza totale rispettivamente per il 2012 e il 2013 (*Tab. 2.5.1*). Il primo fattore PC (35% della varianza nel 2012 e 40% nel 2013) includeva il contributo di descrittori principali quali l'altezza della pianta, la lunghezza base-apice della costolatura, la larghezza della costolatura a 5 cm dalla base, lo spessore della costolatura a 35 cm dalla base, il profilo interno della costolatura e l'altezza dello stelo principale. La seconda componente, rappresentata dalla forma e dimensioni del capolino, ha spiegato il 20%

della varianza sia per il 2012 che per il 2013 mentre il terzo fattore (17% per il 2012 e 15% per il 2013) ha incluso per lo più la lunghezza della costolatura con assenza di foglie. I descrittori che hanno dato un maggiore contributo sulle componenti sono stati per lo più gli stessi nei due anni, ad eccezione della larghezza e spessore della costolatura a 35 cm dalla base che hanno contribuito nella prima componente per spiegare la varianza dei dati del 2012 e non di quelli del 2013.

Tab. 2.5.1 – Varianza totale spiegata mediante PCA e descrittori che hanno contribuito a spiegarla secondo le prime tre componenti per i dati rilevati nel 2012 e nel 2013.

Componente	Varianza (%)		Varianza cumulata (%)		Descrittori principali con contributo maggiore sulla componente
	2012	2013	2012	2013	
1	35,173	39,515	35,17,3	39,515	Altezza pianta, lunghezza base-apice costolatura, larghezza costolatura a 5 cm dalla base, spessore costolatura a 35 cm dalla base, profilo interno costolatura a 5 cm dalla base, altezza stelo principale.
2	20,090	19,653	55,263	59,168	Forma, altezza e diametro del capolino principale.
3	16,713	14,855	71,977	74,023	Lunghezza della costolatura con assenza di foglioline.
4	8,993	8,920	80,969	82,943	
5	6,865	5,535	87,834	88,478	
6	3,681	4,107	91,515	92,586	
7	3,255	3,020	94,769	95,606	
8	0,398	2,241	97,255	97,846	
9	0,293	1,405	99,087	99,251	
10	0,146	0,749	100,00	100,00	

Sulla base delle prime tre componenti, i genotipi analizzati si sono distribuiti spazialmente secondo quanto è riportato nelle *Fig. 2.5.10* e *2.5.11*, riferite rispettivamente al 2012 e 2013. Entrambi i grafici hanno evidenziato come i diversi genotipi di cardo si differenziano gli uni dagli altri, generando dei raggruppamenti che tuttavia presentano qualche differenza nei due anni di sperimentazione. Questo può essere attribuito in parte anche alle condizioni ambientali differenti che hanno determinato uno sviluppo diverso delle piante. In particolare, durante il 2013, è stato

difficile controllare le malerbe che indubbiamente hanno creato dei problemi alle piante; queste infatti sono risultate più piccole rispetto all'anno precedente.

Sulla base della PCA e per entrambi gli anni, i genotipi di cardo coltivati FS e Cerveteri e quelli denominati 32, 33, Nizza e Belgio hanno determinato due raggruppamenti localizzati al centro a destra e in basso a sinistra. In particolare, nel 2012, i genotipi di cardo coltivato che si allontanano da tutti gli altri e che quindi geneticamente risultano diversificarsi dal resto sono stati AFGI e AFFG. Ciò dimostra che, per i caratteri da noi valutati, questi genotipi risultano diversi e non comparabili con gli altri cardo e generano delle popolazioni ben distinte dalle altre. I cardo FS ed FS1 risultano geneticamente vicini, ciò conferma il fatto che il secondo è stato moltiplicato e autofecondato dalla selezione di piante interessanti e ritenute ottimali a partire dalla popolazione base FS. Dall'analisi statistica, inoltre, AFB e AFN hanno delle caratteristiche in comune che li contraddistinguono e ad essi si avvicinano, pur rappresentando comunque popolazioni abbastanza distinte, il 32 e il 33. Infine i cardo AFSA e AFSI si discostano dalle altre accessioni, essendo selvatici, anche se la loro differenziazione non è risultata del tutto netta in quanto, dopo anni di selezioni, hanno ormai perso dei caratteri negativi a vantaggio di piante più alte e senza spine. In realtà, si tratta di accessioni su cui sono state già effettuate, oltre a selezioni pianta, anche autofecondazioni e interincroci.

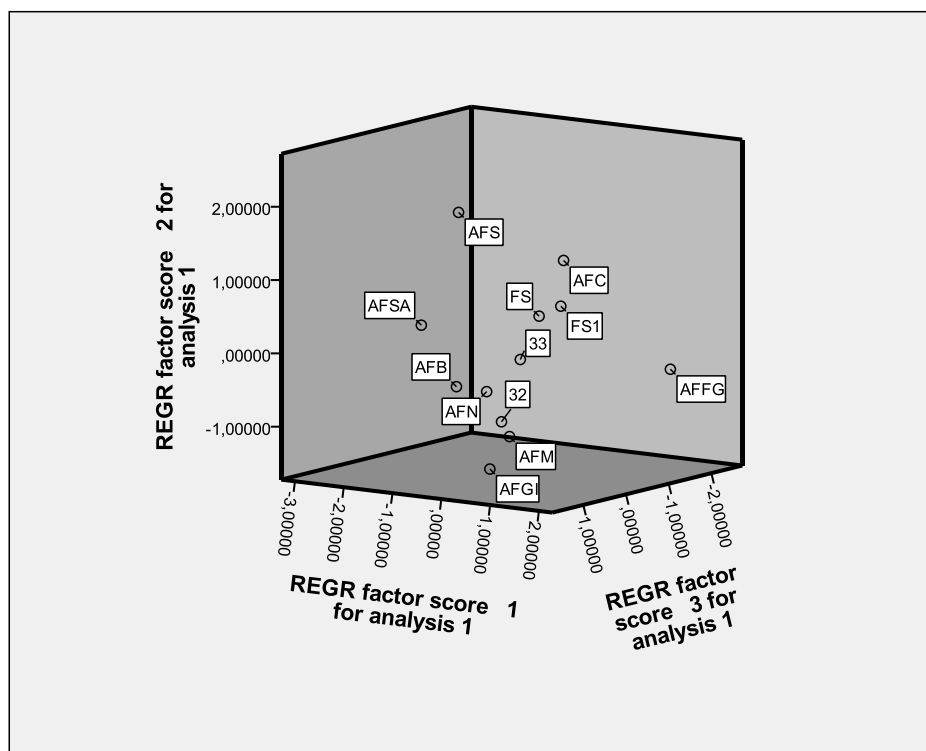


Fig. 2.5.10 – Grafico a dispersione dall'analisi dei dati 2012.

L'analisi statistica dei dati rilevati nel 2013 sulle popolazioni di cardo autofecondate e seminate l'anno dopo ha più o meno dato risultati simili rispetto a quelli dell'anno precedente (*Fig. 2.5.7*). Infatti, i cardo AFSI e AFFG sono ancora quelli che hanno manifestato una diversificazione maggiore dagli altri genotipi. I gruppi di appartenenza che si generano dall'analisi statistica sono pertanto costituiti da Cerveteri, FS, 33 e AFGI e da AFB, AFN, 32 e AFM. I cardo selvatici AFSI e AFSA si sono collocati tra loro in una posizione simile a quella del grafico 2012, anche se AFSI è risultato meglio differenziato.

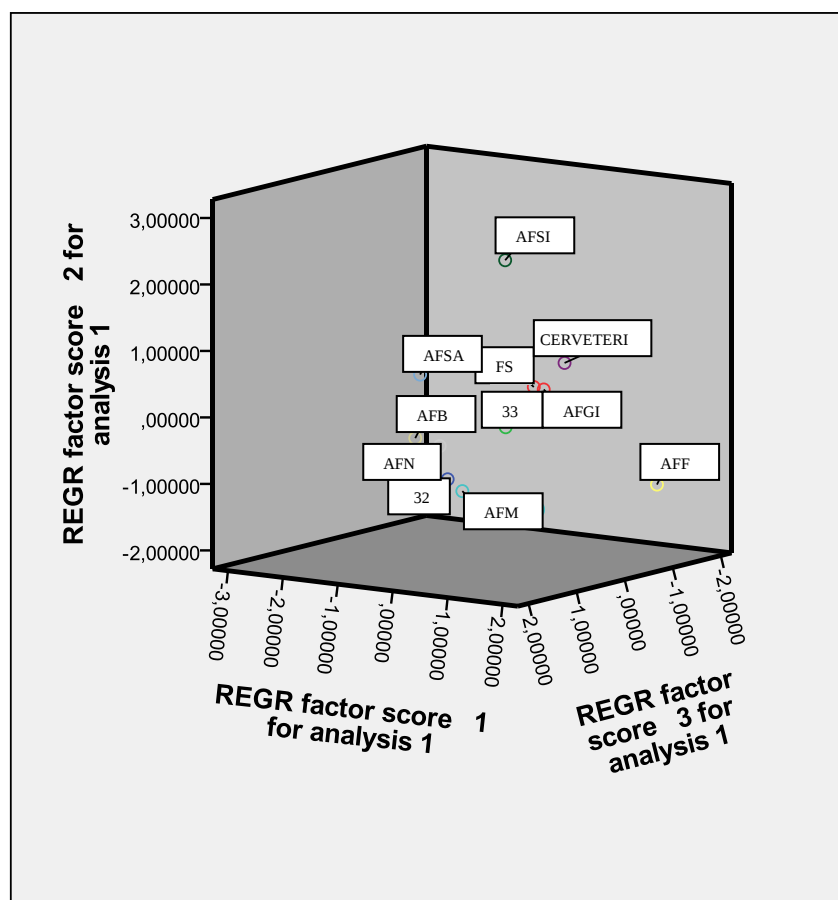


Fig. 2.5.11 – Analisi Cluster dei dati 2013.

In *Tab. 2.5.2* sono riportati i dati della caratterizzazione morfologica dei genotipi di cardo limitati però ai descrittori che, dalla PCA, sono risultati idonei per spiegare la varianza dei risultati di entrambi gli anni e quindi per differenziare i genotipi. Sulla base dei caratteri morfologici, sono state inoltre trovate correlazioni positive essenzialmente tra altezza della pianta e dello stelo principale, tra la lunghezza della costolatura, la sua larghezza e spessore a 5 e 35 cm dalla base e il diametro dello stelo (coefficiente di correlazione di Pearson = $r \geq 0.6$; $P \leq 0.05$).

Tab. 2.5.2 – Parametri rilevati dai cardi nelle annualità 2012 e 2013 statisticamente significativi.

Genotipo	Altezza pianta (cm)	Lunghezza senza foglie	Lunghezza base-apice	Larghezza 5 cm dalla base	Spessore 35 cm dalla base	Profilo 5 cm dalla base	Stelo base-cap.	Forma in sez.	Altezza principale	Diametro principale	Numero totali
2012											
FS	160,67 ± 16,756	16,167 ± 3,420	115,00 ± 8,505	5,48 ± 0,521	1,95 ± 0,256	3,67 ± 0,667	154,00 ± 17,039	1,00 ± 0,000	6,50 ± 0,289	7,46 ± 0,031	17,67 ± 0,333
FS1	192,67 ± 6,360	13,833 ± 1,590	124,00 ± 5,686	4,59 ± 0,700	1,62 ± 0,133	3,00 ± 0,000	185,17 ± 6,701	3,00 ± 0,000	7,50 ± 0,361	7,30 ± 0,200	19,33 ± 1,202
32	171,33 ± 4,807	14,067 ± 2,100	106,00 ± 3,606	3,71 ± 0,183	1,73 ± 0,170	1,00 ± 0,000	165,23 ± 4,829	3,00 ± 0,000	6,10 ± 0,265	6,48 ± 0,502	16,67 ± 2,667
33	157,10 ± 3,919	10,100 ± 2,100	104,00 ± 1,000	3,49 ± 0,234	1,63 ± 0,108	1,40 ± 0,400	142,56 ± 5,949	1,00 ± 0,000	5,36 ± 0,108	6,86 ± 0,440	20,00 ± 4,393
AFB	155,60 ± 8,292	12,000 ± 1,517	108,00 ± 7,396	2,62 ± 0,169	1,38 ± 0,107	1,80 ± 0,490	149,10 ± 8,199	4,80 ± 0,200	6,50 ± 1,083	7,46 ± 0,697	11,00 ± 1,140
AFM	198,00 ± 10,408	12,667 ± 2,587	111,33 ± 11,667	3,27 ± 0,425	1,76 ± 0,238	2,33 ± 0,667	196,60 ± 10,209	1,00 ± 0,000	5,47 ± 0,318	5,87 ± 0,260	10,00 ± 2,517
AFN	198,80 ± 11,373	15,900 ± 1,913	112,00 ± 2,345	2,71 ± 0,205	1,50 ± 0,055	2,60 ± 0,400	193,14 ± 11,215	5,00 ± 0,000	5,66 ± 0,298	7,62 ± 0,218	15,20 ± 1,393
AFGI	208,00 ± 5,568	23,167 ± 2,804	145,67 ± 19,877	3,04 ± 0,298	1,80 ± 0,104	1,00 ± 0,000	202,77 ± 5,630	3,00 ± 0,000	5,23 ± 0,167	6,40 ± 0,351	13,33 ± 0,333
AFSI	194,50 ± 19,500	15,000 ± 1,000	122,50 ± 18,500	4,60 ± 0,800	2,00 ± 0,500	3,00 ± 0,000	185,95 ± 18,450	6,00 ± 1,000	8,55 ± 1,050	7,75 ± 0,550	19,00 ± 2,000
AFGG	171,67 ± 4,096	2,000 ± 0,000	131,67 ± 4,372	4,48 ± 0,023	2,40 ± 0,080	3,00 ± 0,000	167,20 ± 3,936	1,00 ± 0,000	4,47 ± 0,186	5,73 ± 0,467	17,67 ± 1,667
AFSA	98,25 ± 8,557	8,500 ± 2,327	82,75 ± 7,487	1,60 ± 0,248	1,10 ± 0,147	1,00 ± 0,000	91,28 ± 8,468	5,50 ± 0,500	6,98 ± 0,357	5,78 ± 0,674	21,50 ± 3,617
Cervetani	155,67 ± 4,372	6,000 ± 0,577	100,33 ± 1,667	4,10 ± 0,503	1,72 ± 0,160	3,00 ± 0,000	149,63 ± 4,338	9,00 ± 0,000	6,03 ± 0,145	7,23 ± 0,273	20,33 ± 2,603
2013											
FS	144,13 ± 5,273	8,00 ± 0,736	65,75 ± 4,571	1,23 ± 1,127	,57 ± 0,101	5,00 ± 0,816	137,63 ± 5,471	2,00 ± 0,000	6,28 ± 0,243	6,96 ± 0,202	6,00 ± 1,581
32	153,00 ± 2,000	6,00 ± 1,061	57,25 ± 4,131	,91 ± 1,168	,59 ± 0,936	5,00 ± 0,000	151,88 ± 3,319	2,00 ± 0,000	6,11 ± 0,309	5,83 ± 0,250	12,50 ± 1,258
33	153,75 ± 10,266	6,13 ± 0,657	65,50 ± 4,941	1,03 ± 1,117	,65 ± 0,937	5,00 ± 0,000	146,75 ± 10,105	1,75 ± 0,250	6,31 ± 0,209	6,68 ± 0,415	9,50 ± 1,258
AFB	126,13 ± 6,845	4,00 ± 1,080	60,63 ± 5,879	1,14 ± 1,128	,61 ± 0,186	5,00 ± 0,000	120,13 ± 6,362	1,75 ± 0,250	6,71 ± 0,885	7,18 ± 0,457	8,00 ± 1,780
AFM	153,63 ± 5,673	8,38 ± 1,405	69,75 ± 2,496	1,18 ± 0,027	,78 ± 0,034	5,00 ± 0,000	147,75 ± 5,706	2,50 ± 0,500	6,14 ± 0,172	6,29 ± 0,214	7,75 ± 2,462
AFN	136,88 ± 10,158	6,13 ± 0,473	56,50 ± 3,969	,78 ± 0,223	,51 ± 0,075	4,50 ± 0,500	130,88 ± 10,353	2,25 ± 0,479	6,19 ± 0,401	7,01 ± 0,681	7,50 ± 0,645
AFGI	176,75 ± 2,203	10,98 ± 1,789	82,50 ± 3,926	1,69 ± 0,178	1,20 ± 0,151	5,00 ± 0,000	170,00 ± 2,072	2,00 ± 0,000	6,68 ± 0,361	7,62 ± 0,237	9,50 ± 1,555
AFSI	99,69 ± 3,815	4,50 ± 0,500	60,50 ± 2,500	1,37 ± 0,065	,54 ± 0,040	3,00 ± 0,000	93,00 ± 4,500	3,00 ± 0,000	6,71 ± 0,190	5,52 ± 0,485	4,50 ± 0,500
AFGG	136,50 ± 2,000	1,50 ± 0,500	73,00 ± 3,000	1,78 ± 0,020	1,02 ± 0,050	5,00 ± 0,000	130,50 ± 2,000	2,00 ± 0,000	5,47 ± 0,130	6,79 ± 0,240	12,50 ± 3,500
AFSA	119,75 ± 9,250	,00 ± 0,000	73,00 ± 1,000	1,32 ± 0,015	,86 ± 0,035	4,00 ± 1,000	113,50 ± 10,000	4,00 ± 0,000	6,55 ± 0,450	7,15 ± 0,150	11,00 ± 4,000
Cervetani	166,38 ± 4,947	7,25 ± 2,869	84,75 ± 4,871	1,54 ± 0,247	1,21 ± 0,131	6,00 ± 0,577	159,50 ± 4,826	1,50 ± 0,289	7,16 ± 0,688	7,60 ± 0,712	10,00 ± 0,707

b) Maschiosterili

La ricerca di nuovi genotipi maschiosterili è stata concentrata sull'analisi della vitalità pollinica effettuata tramite carminio acetico su popolazioni F_2 ottenute dall'autofecondazione di individui F_1 . Questo è dovuto alla segregazione del carattere recessivo della maschiosterilità che tende a segregare ed a manifestarsi soltanto in seconda generazione.

L'analisi ha permesso di individuare ulteriori piante maschiosterili oltre al genotipo MS6 già esistente: questi appartengono sempre alla tipologia carciofo e non cardo. Una pianta maschiosterile di cardo potrebbe rendere possibile, senza operazioni di demasculazione, combinazioni d'incrocio con parentali maschili di carciofo commerciali e produttivi.

Nella *figura 2.5.12* è ben visibile la distinzione riscontrata tra polline sterile e polline fertile. Il primo tende a non assorbire il carminio acetico per cui, oltre ad essere di piccole dimensioni, rimane poco colorato. Il secondo si colora invece in maniera netta ed intensa e ha una dimensione maggiore (*Fig. 2.5.12*).

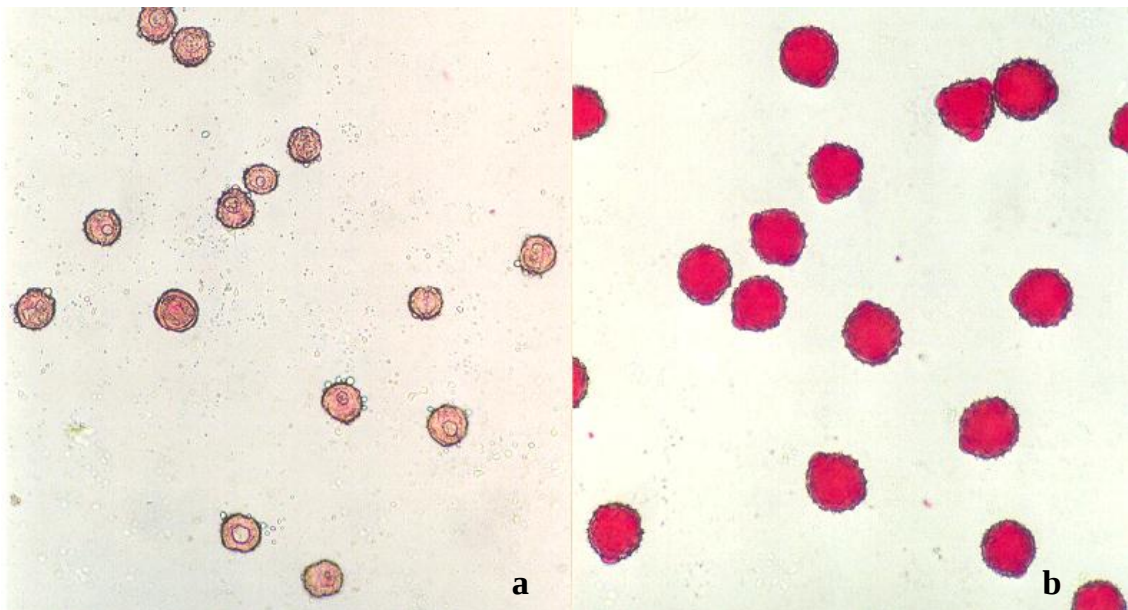


Fig. 2.5.12 – Colorazione del polline con carminio acetico nel genotipo **a.** maschiosterile e **b.** maschiofertile (x 10).

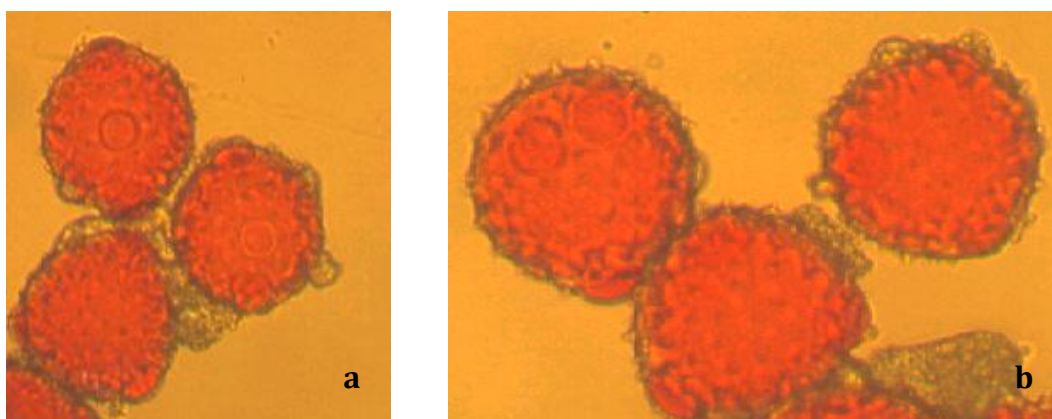


Fig. 2.5.13 – Aspetto del polline mono **a**. e binucleato **b**. osservato nelle piante maschiofertili (x 25).

Nel corso dei 3 anni di attività di ricerca, sono state analizzate circa 273 piante appartenenti a 9 diverse popolazioni F₂ da autofecondazione di ibridi F₁ selezionati sia in Italia sia nell'ambito di una collaborazione Italia-USA. Dall'analisi della vitalità pollinica, sono stati individuati 6 nuovi maschiosterili. Dalla *tabella* 2.5.3 è possibile vedere nel dettaglio quante piante sono state valutate per combinazione e da quali di esse sono stati ottenuti i maschiosterili.

I 6 nuovi genotipi MS, individuati nel corso degli anni di sperimentazione, sono stati anche caratterizzati geneticamente.

Tab. 2.5.3 – Genotipi, numero di piante analizzate e numero di MS individuati.

Genotipo F ₁	Piante analizzate	Individui MS selezionati
Sami	40	2
Misa	40	1
Chiara	40	-
Double one	40	-
CA	35	-
Big Red	30	1
7	8	1
Ibridi cardo	30	1
Totale	273	6

Le piante MS, individuate annualmente per mezzo della valutazione della vitalità pollinica, sono state comunque oggetto di conferma e saranno moltiplicate *in vitro* e per carducci.

c) Incroci effettuati

Si è cercato di utilizzare parentali stabili e quindi ottenuti da successivi cicli di autofecondazioni e interincroci per non accentuare troppo la depressione da *inbreeding* che i diversi cicli di autofecondazione tendono a generare. Per ogni accessione di cardo si è infatti continuato ad effettuare diverse autofecondazioni e contemporaneamente anche interincroci; le libere impollinazioni hanno consentito di mantenere la massa di ogni genotipo a cui attingere per ogni eventuale problema. Attualmente sono in campo le seguenti discendenze:

Tab. 2.5.4 – Elenco del materiale di cardo, carciofo ed ibridi suddiviso per tipologia di incrocio effettuato.

Genotipo	Autofecondazioni	Interincroci	Libere impollinazioni
32	X	X	X
33	X		X
AFC	X	X	X
AFFG	X	X	X
AFB	X	X	X
FS	X	X	X
FS1	X		
AFGI	X	X	X
AFSI	X		
AFSA	X	X	
AFM	X	X	X
AFN	X	X	
Romolo E1	X		
MS6 x AFFG A3	X		
MS6 x AFFG A1	X		
MS6 x AFFG A2	X		
MS6 x AFGI A3	X		
MS6 x AFGI A1	X		

In particolare, sono di seguito riportate le tipologie di nuovi interincroci effettuati in campo lo scorso anno e che, a causa del ritardo nel trapianto, non è stato sinora possibile valutare con i descrittori morfologici:

- AFB A3 x A1
- AFM (c2xb2) (a2xa4)
- AFM (c2xb2) (a1xb1)
- AFSA D4xB4
- FS (D1xD2) A3 x A2
- FS (A1xD1) B1xA1
- AFB (c2xd2) A1xA2
- AFB (c3xc2) a5xa6
- Nizza bianco c1xa1
- Nizza bianco a1xc1
- AFN c3xa4 pt 1
- AFN (b1xa1) (a1xb2)
- AFN B3 A5xB6
- AFGI (B4xpt1) A3 x A1
- AFGI (pt1xB4) A1xA3
- AFC (pt1xD2)A1xA2
- AFC (pt1A1xD2)
- AFC (d2xa2) (a4xb4)
- AFC (d2xa2) b4xa4
- 32 (c3xd4) b2xa3
- 32 (c3xd4) b1xa1
- 32 (c3xd4) a1xb1
- 33 (b1xa1) a5xb4
- Bianco b3a2 (a6xb6)
- AFB pt3 (c2xd2) a2xa1

I cardi, utilizzati per lo più come parentali MF e quindi donatori di polline nel programma di ibridazioni, sono stati scelti tra quelli più stabili e risultati resistenti, anche se parzialmente a *V. dahliae*; gli stessi sono stati utilizzati anche come parentali portaseme non MS in alcune combinazioni con le linee 7, 14 e 21 di carciofo, come specificato nel paragrafo sui Materiali e Metodi di questo capitolo. Utilizzando una pianta MF come parentale femminile, gli ibridi prodotti da queste combinazioni di incrocio potrebbero essere stati il frutto dell'autofecondazione della pianta portaseme e non solo dell'effettiva ibridazione avvenuta con l'altro parentale. Nelle nostre condizioni, questo è stato valutabile soltanto attraverso la caratterizzazione e valutazione morfologica della progenie ottenuta che, in molti casi, ha confermato l'ibridazione avvenuta vista la presenza spesso di caratteristiche tipiche del cardo (parentale maschile) in piante di carciofo (parentale femminile).

Le piante del genotipo MS6 di carciofo disponibili in campo sono state incrociate con i seguenti cardi sia coltivati che selvatici:

AFN, AFB, AFM, AFFF, AFFG, AFSI, AFSA, Cerveteri, 32 e 33.

Su un totale di 20 combinazioni ibride effettuate con l'utilizzo di piante MS6 già in nostro possesso e su quelle effettuate tra le linee denominate 7, 14, 21 di carciofo e le linee AFB e AFM di cardo, sfortunatamente il quantitativo di seme ottenuto nelle diverse annualità di sperimentazione è stato abbastanza limitato. Questo è stato probabilmente dovuto alle condizioni climatiche al momento dell'impollinazione che, in alcuni casi, sono state troppo piovose o eccessivamente calde, alla tecnica di impollinazione che ha previsto l'utilizzo di pennelli e lo sfregamento del capolino impollinante invece delle api o bombi (metodo di impollinazione risultato più efficiente

in precedenti lavori ma non utilizzato nel nostro caso) ed anche della presenza di ditteri parassiti le cui larve si nutrono del capolino e dei semi stessi.

È stato pertanto possibile effettuare delle valutazioni preliminari solo degli ibridi ottenuti nel 2012 e 2013 e riportati in *Tab. 2.5.5*. Per la caratterizzazione di quelli tra i cardì AFB e AFM e le linee di carciofo, sono stati applicati i descrittori del carciofo in quanto le piante sembravano apparentemente intermedie tra carciofo e cardo ma con caratteri simili al carciofo. Oltre a questi ibridi, sono stati valutati anche gli altri due ottenuti nel 2013 tra il genotipo MS6 di carciofo e le linee di cardo AFFG e AFGI (*Fig. 2.5.14 a. e b.*).





Fig. 2.5.14 – Pianta, capolino e parcella di due ibridi carciofo x cardo: **a.** MS6 x AFFG e **b.** MS6 x AFGI.

Sulla base della caratterizzazione morfologica degli ibridi precedenti con cui erano stati utilizzati i descrittori del carciofo che non sono sembrati soddisfacenti, in questo caso sono stati utilizzati i descrittori proposti per il cardo. Consapevole che questo possa generare confusione, è stato pensato che si tratta di esperienze preliminari comunque valide su cui ci può basare senza alcun elemento di conclusione. Ovviamente si tratta di attività che meritano di essere ulteriormente e ampiamente sviluppate per arrivare a dei risultati definitivi.

Le piante degli ibridi ottenuti sono state moltiplicate vegetativamente in campo e saranno oggetto di nuova valutazione il prossimo anno.

Tab. 2.5.5 – Parametri rilevati dagli ibridi carciofo x cardo nelle annualità 2012 e 2013 statisticamente significativi.

2012														
Genotipo	Pianta n.	Altezza pianta (cm)	Incisioni foglia	Intensità verde	Tonalità verde	Spina capolino	Lungh. spine sulla costatura	Punta capolino	Forma capolino pri in sez. longitudinale	Diametro stelo princ.	Altezza capolino principale	Diametro capolino principale	Numero capolini totali	
BelgioB2 x itnea14	3	161,33 ± 2,848	9,00 ± 0,000	4,33 ± 0,667	3,00 ± 0,000	7,00 ± 0,000	9,00 ± 0,000	1,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	3,67 ± 0,333	7,67 ± 0,333	7,33 ± 0,333	10,67 ± 1,450	
BelgioB1 x itnea7	3	147,67 ± 2,404	9,00 ± 0,000	5,67 ± 0,667	1,00 ± 0,000	5,67 ± 0,667	9,00 ± 0,000	1,67 ± 0,667	4,33 ± 0,333	4,00 ± 0,000	7,00 ± 0,000	8,33 ± 0,333	8,33 ± 0,880	
BelgioB1 x itnea21	3	133,67 ± 10,171	9,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	3,00 ± 0,000	5,67 ± 1,333	9,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	3,67 ± 0,333	5,67 ± 0,333	7,33 ± 0,333	12,67 ± 1,333	
Linea21 x BelgioB1	1	116,00	9,00	5,00	1,00	5,00	1,00	2,00	2,00	3,00	6,00	7,00	14,00	
Madrid x itnea14	2	166,50 ± 7,500	9,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	1,00 ± 0,000	4,00 ± 1,000	1,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	7,50 ± 0,500	8,00 ± 0,000	10,00 ± 1,000	
Linea4 x Madrid	2	121,50 ± 5,500	9,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	1,00 ± 0,000	7,00 ± 0,000	9,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	3,00 ± 0,000	7,00 ± 0,000	8,00 ± 0,000	7,00 ± 0,000	
2013														
Genotipo	Pianta n.	Altezza pianta (cm)	Intensità lob. foglia (3-5-7)	Colore costolatura (1-7)	Lungh. costola senza foglie (3-7)	Lungh. costola base-apice	Largh. costola 5 cm dalla base	Largh. costola 35 cm dalla base	Spessore costola a 35 cm dalla base					
MS6 x AFFG	3	159,17 ± 2,920	5,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	14,67 ± 1,764	26,00 ± 7,234	3,21 ± 0,327	1,87 ± 0,332	1,97 ± 0,240					
MS6 x AFGI	3	150,33 ± 5,239	5,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	9,83 ± 0,928	27,33 ± 4,333	2,85 ± 0,275	1,91 ± 0,246	2,02 ± 0,169					
Genotipo	Pianta n.	Profillo costol. parte interna 5 cm dalla ba	Lungh. spine sulla costolatura (1-7)	Stelo principale base-capolino princ.	Diametro stelo princ.	Forma capolino pri in sez. longitudinale	Altezza capolino principale	Diametro capolino principale	Numero capolini totali					
MS6 x AFFG	3	5,00 ± 0,000	1,00 ± 0,000	152,33 ± 2,682	4,32 ± 0,415	2,00 ± 0,000	7,64 ± 0,515	9,82 ± 0,480	13,67 ± 0,882					
MS6 x AFGI	3	3,00 ± 0,000	1,00 ± 0,000	141,67 ± 5,263	4,14 ± 0,503	2,00 ± 0,000	9,01 ± 0,049	10,37 ± 0,762	11,00 ± 3,055					

2.5.4 STAGE IN CALIFORNIA

a) Attività

Nell'ambito di una collaborazione Italia (Università degli Studi della Tuscia, ENEA) e Stati Uniti (Big Heart Seed Company, Brawley - Ca), durante i 3 anni di dottorato di ricerca sono stati effettuati 3 periodi di stage in California della durata di 10/15 giorni/anno sullo sviluppo di ibridi F₁ di carciofo utilizzando materiale genetico italiano e californiano.

Lo scopo della collaborazione è stato lo svolgimento di un'attività di miglioramento genetico e la realizzazione di nuovi ibridi da registrare sia a livello italiano che internazionale.

L'attività di selezione di parentali stabili ed ottimali da utilizzare negli incroci svolge un ruolo estremamente importante e, nel corso degli anni di collaborazione, questa è stata per lo più svolta, da parte italiana, con il supporto di dottorandi che hanno operato con la supervisione del professore Francesco Saccardo, responsabile scientifico del progetto. Il materiale genetico utilizzato consiste in selezioni di carciofo di tipo Romanesco, ma anche appartenenti a tipologie verdi, spinose e di diversa forma di capolino, adatte ai mercati genere americano e italiano.

L'obiettivo di questi stage è stato quello di approfondire le problematiche e metodologie del miglioramento genetico convenzionale, parte applicata nello svolgimento del programma di tesi per raggiungere l'obiettivo a lungo termine, in un ambiente ottimale per le *Cynara* spp. e con delle *facilities* che solo una grande ditta attrezzata e un team scientificamente qualificato possono fornire. È con il referente scientifico, Prof. Saccardo, infatti che è stato svolto il lavoro di selezione e valutazione degli ibridi prodotti dalla ditta sementiera nel corso degli anni.

b) Risultati

Pur non essendo direttamente inerenti all'attività del dottorato, i risultati ottenuti hanno permesso di applicare su larga scala le attività di miglioramento genetico già svolte nei campi sperimentali di Tarquinia, verificando il lavoro a livello di una ditta sementiera.

Le elevate disponibilità di superfici, di manodopera e di capacità finanziaria della ditta hanno permesso di svolgere le diverse fasi, dall'isolamento in strutture costruite con reti antiafidi (*Fig. 2.5.15*), all'impollinazione effettuata con famiglie di api posizionate in arnie nei bordi degli appezzamenti (*Fig. 2.5.16*) ed ai macchinari di estrazione dei semi (*Fig. 2.5.17*). Questo ha generato anche risultati estremamente interessanti in termini di numero di semi prodotti e di stabilità degli ibridi generati. Testimonianza tangibile è l'ibrido F_1 Romolo della tipologia romanesca, prodotto in California e commercializzato in Italia di discreto successo ed in espansione nella sua coltivazione.



Fig. 2.5.15 – Isolatori costruiti con reti anti-afidi su intelaiature metalliche.



Fig. 2.5.16 – Arnie di api posizionate ai bordi dei campi.



Fig. 2.5.17 – Macchinario per l'estrazione dei semi.

L'ibrido F_1 Romolo viene prodotto in un appezzamento di terreno isolato e lontano da altre coltivazioni di carciofo in modo da eliminare le possibilità di inquinamento di polline di altri carciofi trasportato dalle api. L'appezzamento è stato creato alternando più file di piante MS con una fila dell'impollinatore (*Fig. 2.5.18*), partendo da materiale sano micropropagato che assicura una stabilità ed omogeneità delle piante.



Fig. 2.5.18 – Appezzamento per la produzione di seme ibrido in cui si alternano due file di piante MS ed una fila di piante MF.

Durante lo stage, sono stati valutati più di 600 ibridi e caratterizzati parentali stabili ed ottimali da utilizzare negli incroci. Nella figura 2.5.19 sono state riportate diverse tipologie di ibridi caratterizzati per colore, forma del capolino e delle brattee.



Fig. 2.5.19 – Tipologie di ibridi stabili individuate durante la selezione.

È stato possibile allo stesso tempo apprendere le tecniche su grande scala utilizzate dalla ditta sementiera nella produzione di ibridi commerciali e nuove varietà da seme.

2.6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi del contenuto di DNA e la caratterizzazione citogenetica di carciofo e cardo hanno riguardato la parte iniziale del presente dottorato e soprattutto hanno rappresentato degli studi preliminari delle specie oggetto della ricerca, considerando la mancanza di informazioni in merito in letteratura.

Il cardo e carciofo sono specie affini e precedenti studi hanno individuato nel cardo selvatico un possibile progenitore del carciofo coltivato (Sonnante *et al.*, 2012), con il quale è completamente incrocio-compatibile e forma ibridi totalmente fertili (Rottenberg *et al.*, 1995). Il contenuto simile di DNA, così come la caratterizzazione citogenetica confermano in parte tale affinità. Infatti il complemento cromosomico di entrambe le specie è costituito da 34 cromosomi, con una preponderanza di cromosomi sub-metacentrici, 26 su 34 in carciofo e 24 su 34 in cardo. Tuttavia nel corso dell'evoluzione si sono probabilmente verificate mutazioni quali delezioni o inserzioni e riarrangiamenti cromosomici che hanno determinato una lieve riduzione nel contenuto di DNA di cardo (o un incremento in quello di carciofo) con conseguente differenziazione tra le due specie nella morfologia di alcuni cromosomi. Il cardo, infatti, presenta cromosomi di dimensioni leggermente inferiori, rispetto a carciofo, tra cui alcuni cromosomi acrocentrici assenti in quest'ultimo. Anche l'analisi FISH ha evidenziato somiglianze e differenze. Entrambe le specie mostrano segnali d'ibridazione con le sequenze utilizzate come sonde e nella maggior parte dei casi con un pattern d'ibridazione molto simile. La sonda (GAA)₇, ad esempio, è tuttavia apparsa leggermente più abbondante in cardo rispetto a carciofo, sebbene la qualità dei preparati microscopici possa influire sul numero di segnali visibili. In conclusione, questa ricerca ha permesso di definire, per la prima volta, il cariotipo di cardo e carciofo e di iniziare a caratterizzare i cromosomi delle due specie con l'ausilio della FISH. Per una caratterizzazione citogenetica sempre più avanzata e approfondita, è auspicabile un ulteriore approfondimento nella ricerca ai fini di avere l'identificazione di sequenze specifiche di cardo e carciofo e il miglioramento delle procedure di sincronizzazione e di preparazione dei preparati citologici.

L'obiettivo a breve termine del lavoro di tesi, l'impiego dell'innesto, ha permesso di utilizzare immediatamente le resistenze a *V. dahliae* individuate nella collezione di germoplasma di cardo analizzata utilizzando questi genotipi come portainnesti nelle diverse combinazioni effettuate. È stata comunque messa a punto la tecnica ottimale

d'innesto e valutate le condizioni per un ottimale attecchimento dei due bionti. La tecnica a spacco inglese è stata un buon approccio per l'innesto del carciofo in quanto assicura un adeguato contatto tra nesto e portainnesto, favorendo così la loro interazione e agevolando la loro unione. In tutti gli esperimenti è stata dimostrata un'alta affinità tra carciofo e cardo, con alcune differenze tra i genotipi principalmente associate al tempo di cicatrizzazione dei due bionti. Le immagini al SEM delle sezioni longitudinali della porzione nesto/portainnesto hanno rivelato, già a 3 giorni dopo l'innesto, la comparsa di molte strutture di interconnessione tra i due componenti dell'innesto, seguita da un riarrangiamento vascolare e una proliferazione di callo durante la cicatrizzazione assieme ad una successivamente differenziazione dei tessuti a contatto con la zona del taglio. La nuova formazione di molti plasmodesmi tra la marza e il portainnesto ha confermato un'elevata compatibilità tra di loro, osservata in particolare nella combinazione A/WC.

In sintesi, i risultati hanno mostrato che:

(1) le prime due settimane dopo l'innesto sembravano essere il tempo minimo necessario per garantire una adeguata formazione di unione d'innesto in combinazioni carciofo/cardo;

(2) la durata del processo d'innesto nella fase iniziale potrebbe non essere influenzata soltanto dalla compatibilità marza/portainnesto ma anche dalle condizioni stagionali, in quanto il processo di cicatrizzazione è favorito da temperature più basse e da un ridotto fotoperiodo luce/buio;

(3) l'elevata affinità R/WC potrebbe essere spiegata con la capacità elevata che il WC ha di accumulare sostanze pectiche e sostanze zuccherine nell'interfaccia portainnesto/nesto, per evitare la perdita di acqua e prevenire la disidratazione dei bionti, soprattutto in condizioni climatiche più calde e secche.

Per quanto riguarda invece la comparazione delle due tecniche d'innesto, è possibile dire che lo spacco in testa, avendo una maggiore area di contatto tra i due bionti, risulta avere una cicatrizzazione più veloce, in grado di garantire una maggiore resistenza meccanica dell'innesto stesso. Questo non accade invece nello spacco inglese che risulta essere molto più delicato alle sollecitazioni esterne e alla disidratazione. Agronomicamente invece lo spacco in testa, essendo praticato al di sopra dei cotiledoni, presenta una problematica già lungamente trattata nei risultati di questo studio, che riguarda l'emissione dei germogli laterali da parte del portainnesto. Questo causa successivi interventi di eliminazione di questi germogli laterali perché andrebbero a

diminuire la vigoria della pianta stessa e tra l'altro non darebbero origine a capolini commerciali di carciofo ma a capolini di cardo. Per questi motivi la tecnica migliore per l'innesto carciofo/cardo risulta lo spacco inglese che, applicato al di sotto dei cotiledoni, non ha problemi di emissione di germogli dal cardo, soprattutto se applicato in periodi stagionali che facilitano l'attecchimento dell'innesto e la loro cicatrizzazione.

L'obiettivo a lungo termine ha invece rappresentato un'attività iniziale di incroci per trasferire da cardo in carciofo soprattutto la resistenza individuata a *V. dahliae* o ad altri stress. Attualmente il materiale ibrido di carciofo da seme risulta nuovo e ancora di uso limitato in Italia. Alcuni ibridi commerciali esteri sono entrati nel mercato italiano di questa specie vegetale ma con problemi di ritardo di produzione. I nuovi ibridi potrebbero aprire ulteriori opportunità in termini di esportazioni di prodotti freschi e trasformati ai mercati esteri. Con il sistema ibrido carciofo x cardo, si ha anche la possibilità di produrre varietà resistenti a malattie e a diverse tipologie di stress. Inoltre, la coltura da seme annuale rende il carciofo adatto per facilitare la coltivazione in regime biologico e quindi accedere a finanziamenti della Comunità Europea, come previsto per le produzioni biologiche. In California i carciofi biologici di successo sono già prodotti a partire da semi ibridi F₁ (Lo Bianco *et al.*, 2012).

L'attività di ricerca di questo dottorato ha permesso di individuare e caratterizzare più di 11 genotipi di cardo, tra coltivato e selvatico, e di utilizzare diversi carciofi maschiosterili e non come parentali stabili nelle diverse combinazioni di incrocio. È stato confermato che l'utilizzo di parentali stabili geneticamente genera una progenie più uniforme e più adatta alla commercializzazione. Disporre di individui maschiosterili e maschioferti stabili è una condizione senza la quale non si può procedere e quindi, preliminarmente, prima di proseguire con lo sviluppo di ibridi F₁, è necessario lavorare in tal senso per rendere stabili i parentali da utilizzare. È noto che il lavoro di miglioramento genetico è piuttosto lungo e, nel caso del carciofo e cardo, è reso abbastanza complesso dalla facilità con cui entrambe le specie vanno incontro a depressione da *inbreeding* (è stato visto, in precedenti lavori effettuati dal Dr. Temperini dell'Università della Tuscia, che già con un ciclo di autofecondazioni la produzione di seme ha⁻¹ si riduce del 40%). L'impiego di metodologie complementari (es.: impiego di coltura *in vitro* e marcatori molecolari) può contribuire a rendere più brevi i tempi per raggiungere gli obiettivi prefissi. Le analisi molecolari, oltre a fornire uno strumento di caratterizzazione del germoplasma e la possibilità di identificare e proteggere le linee da utilizzare come parentali, possono dare utili indicazioni

previsionali per la costituzione degli ibridi. Inoltre, la ricerca di nuovi genotipi maschiosterili può consentire di ampliare le tipologie disponibili oltre all'unico clone MS6 sinora esistente e utilizzato. L'attività richiede comunque ulteriori anni di lavoro per ottenere un quantitativo maggiore di materiale di base MS e MF, per effettuare in maniera ottimale gli incroci e valutare quindi la possibilità di trasferimento di geni di resistenza dal cardo al carciofo.

Nonostante le condizioni ambientali avverse non abbiano consentito di raggiungere risultati di successo sulla quantità di seme prodotto dalle diverse combinazioni di incrocio tentate, pochi ibridi sono stati ottenuti e valutati. Certamente questi non possono considerarsi un traguardo raggiunto ma solo un primo tentativo di procedere in tal senso. Anche la stessa caratterizzazione morfologica effettuata ha seguito in un caso i descrittori del carciofo e nell'altro quelli del cardo. Probabilmente gli stessi descrittori vanno ulteriormente ottimizzati in quanto ci si trova in una situazione con caratteri intermedi tra carciofo e cardo.

Va anche considerato che il sistema di impollinazione è un ulteriore parametro importante per il successo dell'ottenimento di ibridi F_1 e, a riguardo, è stato osservato che la tecnica basata sull'impiego di genotipi maschiosterili e insetti pronubi (api o bombi) è risultata la migliore, in carciofo, in termini di resa produttiva rispetto a quella manuale (Lo Bianco *et al.*, 2011; Saccardo *et al.*, 2013).

L'uso innovativo del seme ibrido ad determina in generale un vantaggio economico con un abbattimento di circa il 50% del costo delle piantine. Il seme non necessita infatti del risanamento da virus e il vivaista può quindi disporre di materiali certificati e sani che, in base alle normative europee, possono essere commercializzati in maniera più sicura e remunerativa.

2.7 RINGRAZIAMENTI

Molti ringraziamenti alla Dott.ssa Paola Crinò, mio tutor anche ai tempi della tesi di laurea, per l'opportunità che mi ha dato di svolgere all'ENEA il dottorato di ricerca; grazie per il suo supporto, aiuto e grande competenza che ha sempre manifestato nei miei confronti e nel lavoro che svolge.

Grazie al Prof. Francesco Saccardo per il suo sostegno nello svolgimento del dottorato, per la sua dedizione all'attività di ricerca e per la possibilità che mi ha sempre dato di accrescere le mie conoscenze e fare nuove esperienze formative.

Molte grazie al mio secondo tutor Dott. Olindo Temperini per il sostegno scientifico negli esperimenti, per il suo supporto e disponibilità manifestata nel corso degli anni.

Molte grazie ai colleghi ENEA, al Dott. Sergio Lucretti, alla Dott.ssa Anna Farina e alla Dott.ssa Valentina Grosso, che mi hanno accolto nel loro laboratorio a braccia aperte e con infinita disponibilità; in particolare alla Dott.ssa Debora Giorgi, che con infinita pazienza è sempre stata al mio fianco, si è dedicata incessantemente nell'applicazione delle sue conoscenze ad una specie per lei nuova come il carciofo.

Molte grazie ai miei colleghi di dottorato, Eva Švecová, per il grande supporto nello svolgimento delle prove di resistenza a malattie e ad Anna Ciancolini, per aver collaborato in modo costruttivo in ogni attività del mio dottorato, creando una bella amicizia.

Molte grazie ai colleghi del CRA-RSP, alla Dott.ssa Elvira Rea, per la disponibilità manifestata e soprattutto alla Dott.ssa Alessandra Trinchera, per la sua grande professionalità e collaborazione mostrata nel corso dello svolgimento delle attività del dottorato.

Grazie alla Ditta sementiera “Big Heart Seed Company” ed in particolare al Sig.re Rusty Jordan per la splendida opportunità a me concessa di approfondire il lavoro di “breeding” in altri contesti lavorativi e soprattutto per la gentile accoglienza e massima

disponibilità dimostrata. Grazie anche al Dott. Nestor A. Rey per la sua collaborazione e per il materiale fotografico fornito.

Grazie al Dott. Roberto Mariotti ed agli altri colleghi di ARSIAL per aver messo a disposizione i campi sperimentali ed il sostegno tecnico per lo svolgimento delle sperimentazioni di pieno campo.

Il lavoro di dottorato è stato eseguito nell'ambito del progetto nazionale CAR-VARVI (Valorizzazione di germoplasma di carciofo attraverso la costituzione varietale e il risanamento da virus) finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali e coordinato dal Prof. Francesco Saccardo.

2.8 BIBLIOGRAFIA

- Acquadro A., Portis E., Lee D., Donini P. and Lanteri S., 2005. Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L. *Genome* 48: 217- 225.
- Aloni B., Karni L., Deventurero G., Levin Z., Cohen R., Katzir N., Lotan-Pompan M., Edelstein M., Aktas H., Turhan E., Joel D.M., Kapulnic Y., 2008. Physiological and biochemical changes at the rootstock–scion interface in graft combinations between *Cucurbita* rootstocks and a melon scion. *J Hort Sci Biotechnol*; 83: 777–83.
- Amenduni M., Cirulli M., D’Amico M., Colella C., 2005. Verticillium wilt of artichoke caused by *Verticillium dahliae* Kleb. *Acta Hort*; 681: 603–6.
- Ancora G., 1986. Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture & forestry*, vol 2, Crops. Springer Verlag, Berlin: 471–484.
- Andras S.C., Hartman T.P.V., Marshall J.A., Marchant R., Power J.B., Cocking E.C. and Davey M.R., 1999. A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free mitotic preparations from plants with small chromosomes. *Chromosome Research* 7: 641-647.
- Andrews P.K., Marquez C.S., 1993. Graft incompatibility. *Hort Rev*; 15: 183–218.
- Armengol J., Berbegal M., Giménez-Jaime A., Romero S., Beltrán R., Vicent A., Ortega A., García-Jiménez J., 2005. Incidence of *Verticillium* wilt of artichoke in eastern Spain and role of inoculum sources on crop infection. *Phytoparasitica*; 33: 397–405.
- Arce P., López B. and Puerta F., 2007. Artichoke (*Cynara scolymus*) ‘explants’ behavior in culture media concentration gradient of the lyophilized mycelium of *Verticillium dahliae* by in vitro culture techniques. *Acta Hort*. 730: 59-65.
- Basnizky J., Zohary D., 1994. Breeding of seed-planted artichoke. *Pl. Breed R*.12: 253-269.
- Bazinet C., Pavillard M.E. e Jouy C., 2009. Carciofo in Francia. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana *Coltura&Cultura*, Ed. Script Bologna, 378-385.
- Bhat R.G., Smith R.F., Koike S.T., Wu B.M., Subbarao K.V., 2003. Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Dis*; 87: 789–97.
- Botha C.E.J., Van Bel A.J.E., 1992. Quantification of symplastic continuity as visualised by plasmodesmograms: diagnostic value for phloem-loading pathways. *Planta*; 187: 359–66.
- Calabrese N., Bianco V.V., Marzi V., Sonnante G., 2007. Varietà precoci richieste dal mercato. *L’Informatore Agrario*, 22: 40-42.
- Calabrese N., 2009. Impianto. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana *Coltura&Cultura*, Ed. Script Bologna, 168-171.
- Calabrese N., Carito A., Boari F., Cantore V., De Palma E., Damato G., 2012. Agronomical evaluation of artichoke cultivars propagated by seed. *Acta Horticulturae* 942: 153-158.
- Calabrese N., Carito A., 2013. Yield evaluation of new seed propagated artichoke cultivars. *Acta Horticulturae* 983: 393-398.

- Campanelli A., Tagarelli A., De mastro G., Morone Fortunato I., Ruta C., 2013. Innovative large-scale production of early artichoke transplants. *Acta Horticulturae* 983: 331-336.
- Cantore V. e Boari F., 2009. Irrigazione e Salinità. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 190-199.
- Cebolla V., Navarro C., Miguel A., Llorach S., Monfort P., 2004. The control of *Verticillium dahliae* on artichokes by chemical and non chemical soil disinfection methods. *Acta Hort*; 660:473–8.
- Ciancolini A., Munoz N.A., Pagnotta M.A. e Crino` P., 2012. Characterization of Italian spring globe artichoke germplasm: morphological and molecular profiles. *Euphytica*; 186: 433–443.
- Ciccarese F., Crinò P., Raccuia S.A. e Temperini A., 2011. Use of resistance cardoons as rootstock for the control of *Verticillium* wilt in globe artichoke. *Acta Hort*. 942: 201-205.
- Ciccarese F., Crinò P., Raccuia S.A., Temperini A., 2012. Use of resistant cardoons as rootstocks for the control of verticillium wilt in globe artichoke. *Acta Horticulturae* 942: 201-206.
- Cipriani G., 2007. Il cardo, un ortaggio oggi poco usato che si raccoglie da ottobre a fine inverno. *Vita in Campagna*; 10: 21-25.
- Cirulli M., Ciccarese F. e Amenduni M., 1994. Evaluation of Italian clones of artichoke for resistance to *Verticillium dahliae*. *Plant Disease*, V78, 7, 680-682.
- Cirulli M., Amenduni M., 2000. La verticilliosi del carciofo, gravissima malattia in continua diffusione nelle colture di carciofo. *Quaderni di agricoltura*; 1:37–41.
- Cirulli M., Bubici G., Amenduni M., Armengol J., Berbegal M., del Mar Jiménez-Gasco M., *et al.*, 2010. *Verticillium* wilt: a threat to artichoke production. *Plant Dis*; 94(10):1176–87.
- Cravero V.P., Lopez Anido F.S., Asprelli P.D. e Cointy E.L., 2004. Diallel analysis for traits of economic importance in globe artichoke (*Cynara scolymus*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 32 (2): 159-16
- Cravero, V.P., Picardi, L.A., Cointy, E.L., 2005. An approach for understanding the heredity of two quality traits (head color and tightness) in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Genetics and Molecular Biology* 28 (3), pp. 431-434.
- Cravero V., 2007. Genetic Diversity in *Cynara cardunculus* determined by sequence-related amplified polymorphism markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132(2): 208-212.
- Cremonini R., Colonna N., Stefani A., Galasso I., Pignone D., 1994. Nuclear DNA content, chromatin organization and chromosome banding in brown and yellow seeds of *Dasypyrum villosum* (L.) P.Candargy. *Heredity* 72: 365-373.
- Crino` P., Tavazza R., Rey Munoz N.A., Trionfetti Nisini P., Saccardo F., Ancora G., Pagnotta M.A., 2008. Recovery, morphological and molecular characterization of globe artichoke ‘Romanesco’ landraces. *Genet Resour Crop Evol*; 55: 823–833.
- Cuadrado A., Cardoso M. and Jouve N., 2008. Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications.

- De Lillo E., 2009. Roditori. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 241-217.
- Delrio G., 2009. Parassiti animali. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 200-213.
- Edelstein M., Burger Y., Horev C., Porat A., Meir A., Cohen R., 2004. Assessing the effect of genetic and anatomic variation of Cucurbita rootstocks on vigour, survival and yield of grafted melons. J Hort Sci Biotechnol; 79(3): 370–4.
- Eldin M.S., 2009. Carciofo in Egitto. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 392-395.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologies 331: 372–379.
- FAOSTAT 2011. <http://faostat.fao.org/>
- Farmacista33. www.farmacista33.it.
- Fernandez C.M., Bertrand C.S., 1988. Verticilosis: Principal problema de la alcachofa en la V Región. IPA La Platina; 50: 6–9.
- Fernandez-Garcia N., Carvajal M., Olmos E., 2004. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. Ann Bot; 93: 53–60.
- Gerlach W. e Bedbrook J., 1979. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5s ribosomal-RNA genes. Nucleic Acids Res 8:4851–4865.
- Gallitelli D. e Mascia T., 2009. Virosi. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 232-245.
- Gamborg O.L. and Wetter L.R., 1975. Plant Tissue Culture Methods. Saskatoon, SK: National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory.
- Giorgi D., Pandozy G., Farina A., Grosso V., Lucretti S., Crinò P. and Saccardo F., 2013. Karyotype of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. scolymus): Preliminary Studies to Define Its Chromosome Morphology. ISHS Acta Hort; 983: 133–138.
- Graifenberg. A. e Mauromiclae G., 2009. Concimazione. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 172-189.
- Hanato T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T., 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects, Chem. Pharm. Bull. 36: 2090–2097.
- Harbaoui Y., 1982. Multiplication in vitro et assainissement viral del’artichaut, *Cynara scolymus* L. Thèse Doct. Sci. Agron., Rijksuniversiteit Gent, 1 S9.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R.L., 2002. Plant propagation. Principles and practices. 7th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; ISBN 0-13-679235-9. p. 849.

- Heslop-Harrison J.S. and Schwarzacher T., 2011. Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant Journal* 66: 18-33.
- Istituto Nazionale della Nutrizione. <http://www.Fruttilandia.it/>
- INEA. www.inea.it/
- ISTAT. www.istat.it/
- Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M., Ayed F., El Mahjoub M., 2008. First report of verticillium wilt of artichoke caused by *Verticillium dahliae* in Tunisia. *Plant Pathol*; 57: 377.
- Jannaccone A., 1967. Avvicendamenti, metodi di propagazione e durata della carciofaia. Atti I Cong. Int. Carciofo, Bari. Ed. Minerva Medica. Torino pp. 9-16.
- Jeffree C.E., Yeoman M.M., 1983. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. *New Phytol*; 9: 491–509.
- Jiménez-Díaz R.M., Mercado-Blanco J., Olivares-García C., ColladoRomero M., Bejarano- Alcázar J., Rodríguez-Jurado D., Giménez-Jaime A., García-Jiménez J., Armengol J., 2006. Genetic and virulence diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting artichoke in eastern central Spain. *Phytopath.*; 96: 288–98.
- Khalidi S., Hidalgo O., Garnatje T. e El Gazzah M., 2014. Karyological and genome size insights into cardoon (*Cynara cardunculus* L., Asteraceae) in Tunisia. *CARYOLOGIA: Int. J. of Cyt., Cytosyst. and Cytogen.*. 67: 57-62.
- Kiernan J.A., 1999. Histological and histochemical methods: theory and practice, Ed. 3, Butterworth Heinemann, Oxford, UK.
- Kollmann R., Glockmann C., 1991. Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface. *Protoplasma*;165: 71–85.
- Kollmann R., Glockmann C., 1985. Studies on graft unions. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma*;124: 224–35.
- Kukic J., Popovic V., Petrovic S., Mucaji P., Ciric A., Stojkovic D., Sokovic M., 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry* 107: 861–868.
- Lanteri S., Di Leo I., Ledda L., Mameli M.G. e Portis E., 2001. RAPD variation within and among populations of globe artichoke cultivar ‘Spinoso sardo’. *Plant Breed* 120: 243–246.
- Lanteri S., Saba E., Cadinu M., Mallica G.M., Baghino L. e Portis E., 2004. Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke. *Theor Appl Genet* 10: 1534–1544.
- Lanteri S., Acquadro A., Comino C., Mauro R., Mauromicale G. e Portis E., 2006. A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1532-1542.
- Lahoz I., Fernandez J.A., Migliaro D., Macua J.I., Egea-Gilabert C., 2011. Using molecular markers, nutritional traits and field performance data to characterize cultivated cardoon germplasm resources. *Sci Hortic.* 127: 188–197.
- Lee J., Kubota C., Tsao S.J., Bie Z., Echevarria P.H., Morra L., *et al.*, 2010. Current

- status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. *Sci Hort* 2010;127(2): 93–105.
- Lo Bianco C., Saccardo F., Olimpieri, I., Mazzucato, A. e Crinò P., 2012. Floral biology in male sterile clones of globe artichoke [*Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* (L.) hegi]. *Acta Horticulturae* 942: 159-164
- López Anido F.S., Firpo I.T., García S.M. e Cointry E.L., 1998. Estimation of genetic parameters for yield traits in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Euphytica*, 103 (1): 61-66.
- Macua I. e Lahoz I., 2009. Carciofo in Spagna. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 370-377.
- Marie D. e Brown S.C., 1993. A cytometry exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biological cellular*, 78, 41-51.
- Marras F.S. e Cirulli M., 2009. Malattie. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 218-231.
- Martínez-Ballesta M.C., Alcaraz-López C., Muries B., Mota-Cadenas C., Carvajal M., 2010. Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Sci Hort*; 127: 112–8.
- Mauromicale G. e Ierna A., 2000. Panorama varietale e miglioramento genetico del carciofo. *L'Informatore Agrario*, 56, 39-45.
- Micozzi F., Morono Fortunato I., Cardarelli M., Colla G., Temperini O. e Saccardo F., 2004. Innovazione nella propagazione del carciofo per lo sviluppo del settore vivaistico. *Italus Hortus* ISSN 1127-3496, 4646-48.
- Miller H., Barnett J.R., 1993. The structure and composition of bead-like projections on Sitka spruce callus cells formed during grafting and in culture. *Ann Bot*; 72: 441–8.
- Moore R., Walker D.B., 1981. Study of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural studies of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (Crassulaceae). *Am J Bot*; 68(6): 820–30.
- Montemurro P., 2009. Gestione delle malèrbe. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 266-283.
- Overall R., Blackman L., 1996. A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends Plant Sci*; 1(9): 307–11.
- Pagnotta M.A., Cardarelli M.T., Rey Muñoz N.A., Tucci M. and Saccardo F., 2004. Assessment of genetic variation in artichoke of “Romanesco” type by molecular markers. *Acta Hort.* 660: 99-104.
- Pagnotta M.A., Saccardo F., Temperini O., Rey N.A., Noorani A., Bianco C.L., Crinò P., Tavazza R., Cuozzo L., Papacchioli V., Sonnante G., Pignone D., Morgese A., Sarli G., De Lisi A., Racchia S., Di Venere D., Jacob A.-M., Bazinet C., Boury S., Artes F., Egea-Gilabert C., Fernández J.A., Macua J.I., Lahoz I., Jouy C., Alercia A., 2012. Characterization of the *Cynara* European Genetic Resources. *Acta Hort.* (ISHS) 942: 89-93.
- Pécaut P., 1993. Globe artichoke *Cynara scolymus* L. Genetic improvements of vegetable crops. Pergamon Oxford. pp. 737-746.

- Pignone D. e Sonnante G., 2009. Origine ed evoluzione. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 2-11.
- Pina A., Errea P., Martens H.J., 2012. Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. *Sci Hort*;143:144–50.
- Pina A., Errea P., Schulz A., Martens H.J., 2009. Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures. *Tree Phys*; 29: 809–18.
- Principe J. A., 1984. Male-sterility in artichoke. *Hort Science*, 19 (6): 864.
- Portis E., Mauromicale G., Mauro R., Acquadro A., Scaglione D. and Lanteri S., 2009. Construction of a reference molecular linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). *Theoretical and Applied Genetics* 120: 59-70.
- Portis E., Acquadro A., Scaglione D., Lanteri S., Mauro R., Mauromicale G., 2012. A reference molecular linkage map for globe artichoke. *Acta Hort.* 942, pp. 73-80.
- Portis E., Mauro R.P., Barchi L., Mauromicale G., Lanteri S. (in press), 2014. Mapping yield-associated QTL in globe artichoke. *Molecular Breeding*.
- Raccuia S.A., Mainolfi A., Mandolino G., Melilli M.G., 2004. Genetic diversity in *Cynara cardunculus* revealed by AFLP markers: comparison between cultivars and wild types from Sicily. *Plant Breed.* 123: 280–284.
- Roberts A.G., Oparka K.J., 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ*; 26: 103–24.
- Rottenberg A. and Zohary D., 1995. The wild relatives and the wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43: 53-58.
- Saccardo F., 2009. Miglioramento genetico. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 287-288.
- Saccardo F., Jordan J.R., Jordan A., Crinò P., Mocozzi F., Lo Bianco C., Temperini A., Rey N.A. e Pagnotta M., 2013. Innovative strategy to obtain F1 hybrids fo Globe Artichoke, Proc. (th IS on Artichoke, Cardoon and their relatives. Ed.: Pagnotta M.. *Acta Hortcoturae* 983: 159-172.
- Scaglione D., Acquadro A., Portis E., Tirone M., Knapp S.J. and Lanteri S., 2012. RAD tag sequencing as a source of SNP markers in *Cynara cardunculus* L. *BMC Genomics* 3:13:3.
- Scarascia Mugnozza G.T., 1967. Primi risultati di studi di genetica e radiogenetica del carciofo. *Atti del Convegno Internazionale di studi sul Carciofo*, pp. 97-116.
- Scarascia Mugnozza G.T., De Pace C. e Pacucci G., 1981. Analisi comparata di cloni di carciofo da incrocio e prospettive sul loro impiego come nuove cultivar di tipo parentali. p.751-764. In: V. Marzi and V. Lattanzio (eds.), *Studi sul Carciofo*, Bari. Industria Grafica Laterza, Bari.
- Schwarzacher T. and Heslop-Harrison P., 2000. *Practical in situ hybridization*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Singh R.J., 2003. *Plant Cytogenetics*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2 edition.
- Singleton V.L., Rossi J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-

- phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Sonnante G., De Paolis A., Lattanzio V. e Perrino P., 2002. Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol* 49: 247–252.
- Sonnante G., Gatto A., Morgese A., Montemurro F., Sarli G., Blanco E. e Pignone D., 2011. Genetic map of artichoke × wild cardoon: toward a consensus map for *Cynara cardunculus*. *Theor. Appl. Genet.* 123: 1215–1229.
- Sonnante G., Morgese A. and Pignone D., 2012. The evolution of *Cynara*: diversity and domestication of artichoke and cardoon. *Acta Hort.* 942: 61-66.
- Stamigna C., Micozzi F., Pandozy G., Crinò P. e Saccardo F., 2004. Produzione di ibridi F1 di carciofo mediante di cloni maschiosterili. *Italus Hortus*, 11: 29-33.
- Tavazza R., Papacchioli V., Ancora G., 2004. An improved medium for in vitro propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. “Spinoso sardo”. *Acta Hort.* 660: 91–97.
- Temperini O., 2009. Carciofo nel Lazio. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 144-157.
- Temperini A., Ercolani F., Temperini O., Colla G. e Saccardo, F., 2009. L’innesto erbaceo in carciofo. Atti Convegno naz. “Orticoltura di qualità per un mercato in evoluzione”, Foggia 30/04/09, p.20.
- Tiedemann R., 1989. Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Cucurbita ficifolia*. *J Plant Physiol*; 134: 427–440.
- Trinchera A., Pandozy G., Temperini A., Caprio F., Rea E., Rinaldi S., Svecová E., Crinò P. e Temperini O., 2013. Grafting of globe artichoke plants onto wild and cultivated cardoon: agronomical and physiological aspects. *ISHS Acta Hort*; 983: 231–5.
- Trinchera A., Pandozyb G., Rinaldia S., Crinò P., Temperini O., Rea E., 2013. Graft union formation in artichoke grafting onto wild and cultivated cardoon: An anatomical study. *Journal of Plant Physiology* 170: 1569– 1578.
- Virdis A., Motzo R., Giunta F., 2014. The phenology of seed-propagated globe artichoke. *Annals of Applied Biology* 164, (1): 128–137.
- Wiklund A., 1992. The genus *Cynara* L.. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 109, 75-123.
- White R.G., 1994. Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma*; 180: 169–84.
- Yang S., Glockmann C., 1985. Studies on graft unions. II. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interface. *Protoplasma*; 126: 19–29.
- Zaniboni R., 2009. Ibridi commerciali. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 160-167.